



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

[Q*] Facultat de Farmàcia

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

DESARROLLO GALÉNICO E INNOVACIÓN TERAPÉUTICA EN FARMACIA
HOSPITALARIA: SIRÓLIMUS TÓPICO LIPOSOMAL EN EL TRATAMIENTO DE
LOS ANGIOFIBROMAS FACIALES ASOCIADOS A ESCLEROSIS TUBEROSA

Tesis Doctoral

CLARA CORTELL FUSTER

Dirigida por:

Mónica Climente Martí
Ana Cristina Cercós Lletí
María Amparo Martínez Gómez

Valencia, mayo de 2024.



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

[Q*] Facultat de Farmàcia

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Dña. Mónica Climente Martí, tutora, directora y PDI asociada de la Universitat de València, Dña. Ana Cristina Cercós Lleti, directora, y Dña. María Amparo Martínez Gómez, directora.

CERTIFICAN:

Que el proyecto presentado por la Lda. CLARA CORTELL FUSTER, titulado *“Desarrollo galénico e innovación terapéutica en farmacia hospitalaria: sirólimus tópico liposomal en el tratamiento de los angiofibromas faciales asociados a esclerosis tuberosa”*, para obtener el grado de Doctora, ha sido realizado bajo su dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo bibliográfico y experimental, autorizan la presentación de la Tesis Doctoral, a fin de que sea evaluada por el tribunal correspondiente.

En Valencia, 29 de abril de 2024.

Dña. Mónica Climente Martí	Dña. Ana Cristina Cercós Lleti	Dña. María Amparo Martínez Gómez
----------------------------	--------------------------------	----------------------------------

A mi familia y amigos.

A mis compañeros y directoras.

A los pacientes.

La energía y la persistencia conquistan todas las cosas.

Benjamin Franklin

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABLAS	XIX
PRÓLOGO	XXIII
CONTRIBUCIONES A CONGRESOS	XXV
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	XXVIII
RESUMEN	XXXIII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	1
JUSTIFICACIÓN Y CONTEXTO	9
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO PRINCIPAL	13
OBJETIVOS SECUNDARIOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	17
ASPECTOS ÉTICOS	17
FASES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	18
FASE I: REVISIÓN SISTEMÁTICA	19
ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA	20
CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	21
NIVELES DE EVIDENCIA CIENTÍFICA Y GRADOS DE RECOMENDACIÓN	22
DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS ESTUDIOS CLÍNICOS	23
FASE II: OPTIMIZACIÓN GALÉNICA	24
MEJORA DEL PRINCIPIO ACTIVO: SIRÓLIMUS COMO MATERIA PRIMA	24
MEJORA DEL DISOLVENTE: TRANSCUTOL® P	26
MEJORA DEL VEHÍCULO PRINCIPAL: PROPUESTA Y DISEÑO DE NUEVAS FORMULACIONES	27
FORMULACIÓN POMADA	30
FORMULACIÓN EMULSIÓN	31
FORMULACIÓN GEL	32
FORMULACIÓN LIPOSOMAL	33
COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS LIPOSOMAS	34

ELABORACIÓN DE LOS LIPOSOMAS	36
SOLUCIÓN LIPOSOMAL	37
COLESTEROL	37
MIRISTRATO DE ISOPROPILO	38
PROPILENGLICOL	38
NAOH	38
CARBOPOL	38
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD QUÍMICA	40
EQUIPO	40
CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	40
VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO	41
EXTRACCIÓN DE SIRÓLIMUS	44
CUANTIFICACIÓN DE SIRÓLIMUS	44
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD FÍSICA	46
CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS	46
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA	48
FASE III: EVALUACIÓN CLÍNICA	49
DISEÑO Y DESARROLLO	49
DESCRIPCIÓN Y FASES	50
CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	52
EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD	53
ESCALAS DE EVALUACIÓN OBJETIVA DE LOS ANGIOFIBROMAS FACIALES	53
ESCALA FASI	53
ESCALA IGA	54
CUESTIONARIO DE CALIDAD DE VIDA	55
EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD	56
HEMOGRAMA	56
FARMACOCINÉTICA	56
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58
CAPÍTULO PRIMERO	61
FASE I: REVISIÓN SISTEMÁTICA	61
TOPICAL RAPAMYCIN IN THE TREATMENT OF FACIAL ANGIOFIBROMAS IN TUBEROUS SCLEROSIS: A SYSTEMATIC REVIEW BASED ON EVIDENCE	61
ABSTRACT	62
INTRODUCTION	63
METHODS	65

RESULTS	67
DISCUSSION	76
REFERENCES	79
CAPÍTULO SEGUNDO	91
FASE II: OPTIMIZACIÓN GALÉNICA	91
OPTIMIZATION, FORMULATION AND STABILITY OF TOPICAL RAPAMYCIN USED FOR RARE TUBEROUS SCLEROSIS DISEASE: FROM OINTMENT TO LIPOSOMES	91
ABSTRACT	92
INTRODUCTION	94
METHODS	97
RESULTS	102
DISCUSSION	107
REFERENCES	110
CAPÍTULO TERCERO	117
FASE III: EVALUACIÓN CLÍNICA	117
EFFECTIVENESS AND SAFETY OF LIPOSOMAL RAPAMYCIN FOR THE TREATMENT OF FACIAL ANGIOFIBROMAS IN TUBEROUS SCLEROSIS	117
ABSTRACT	118
INTRODUCTION	120
METHOD	123
RESULTS	134
DISCUSSION	141
DISCUSIÓN	149
CAPÍTULO PRIMERO	149
FASE I: REVISIÓN SISTEMÁTICA	149
CAPÍTULO SEGUNDO	152
FASE II: OPTIMIZACIÓN GALÉNICA	152
CAPÍTULO TERCERO	155
FASE III: EVALUACIÓN CLÍNICA	155
CONCLUSIONES	163
PRINCIPALES LIMITACIONES	167
NUEVAS PERSPECTIVAS	171
ANEXOS	175
ANEXO A: PNT SIRÓLIMUS POMADA 0,4%	175
ANEXO B. PNT SIRÓLIMUS EMULSIÓN 0,4%	179

ANEXO C. PNT SIRÓLIMUS GEL 0,4%	183
ANEXO D. PNT SIRÓLIMUS LIPOSOMAL 0,4%	186
ANEXO E. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE	189
ANEXO F. CUESTIONARIO DE CALIDAD DE VIDA DLQI	191
ANEXO G. EJEMPLOS DE APARIENCIA DE LOS ANGIOFIBROMAS FACIALES ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO	193
BIBLIOGRAFÍA	197
APÉNDICE. ARTÍCULO PRIMERO, ARTÍCULO SEGUNDO Y CARTA DE ACEPTACIÓN Y PRUEBAS DE AUTOR DEL ARTÍCULO TERCERO	211

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AEs Adverse Events

AF Angiofibromas Faciales

API Agua Para Inyección

AIT Análisis por Intención de Tratar

CEBM Centre for Evidence-Based Medicine

CEIC Comité Ético de Investigación Clínica

CMIA Chemiluminescent Microparticle Immunoassay

c.s.p. cantidad suficiente para

DLS Dynamic Light Scattering

DLQI Dermatology Life Quality Index

EE Encapsulation Efficiency

EERR Enfermedades Raras

ET Esclerosis Tuberosa

FA Facial Angiofibromas

FASI Facial Angiofibroma Severity Index

Hema Haematology tests

HPLC High Performance Liquid Chromatography

HPLC-UV/Vis Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección Ultravioleta/visible

IGA Investigator's Global Assessment

ITT Intention-to-Treat

LUV Large Unilamellar Vesicles

LD Limit of Detection

LQ Limit of Quantification

MA Meta-Analysis

mAU Miliunidades de absorbancia

MBE Medicina Basada en la Evidencia

MeSH Medical Subject Headings

mTOR mammalian Target of Rapamycin

MLV Multilamellar Vesicles

mV Millivolts

NIOSH National Institute for Occupational Safety and Health

NA Not Applicable

NP Not Performed

NR Not Reported

OEI Objective Evaluation by Investigator

PdI Polydispersity Index

PedsQL Pediatric Quality of Life Inventory

PK Pharmacokinetics

PNT Procedimiento Normalizado de Trabajo

PREMs Patient-Reported Experience Measures

PROMs Patient-Reported Outcome Measures

q.s. a sufficient quantity

RCT Randomized Clinical Trial

rpm revoluciones por minuto

SD	Standard Deviation
SAE	Serious Adverse Event
SEFH	Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria
SEI	Subjective Evaluation by Investigator
SF-36	Short Form 36 Health Survey Questionnaire
SIGN	Scottish Intercollegiate Guidelines Network
SIS	Subjective Improvement Score
SUV	Small Unilamellar Vesicles
SR	Systematic Review
TS	Tuberous Sclerosis
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
URL	Uniform Resource Locator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WFI	Water For Injection
W/O	Water/Oil

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA B. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL SIRÓLIMUS. _____	4
FIGURA C. COMPRIMIDOS DE RAPAMUNE® Y SIRÓLIMUS COMO MATERIA PRIMA (ACOFARMA S.A.). _____	25
FIGURA D. MOLÉCULA DE TRANSCUTOL® P Y PRESENTACIÓN COMO EXCIPIENTE POR LABORATORIOS GUINAMA S.L.U. _____	26
FIGURA E. FORMULACIÓN POMADA DE SIRÓLIMUS AL 0,4%. _____	30
FIGURA F. FORMULACIÓN EMULSIÓN DE SIRÓLIMUS AL 0,4%. _____	31
FIGURA G. FORMULACIÓN GEL DE SIRÓLIMUS AL 0,4%. _____	32
FIGURA H. CLASIFICACIÓN DE LOS LIPOSOMAS: VESÍCULAS UNILAMELARES PEQUEÑAS (SUV), VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES (LUV) Y VESÍCULAS MULTILAMELARES (MLV). _____	34
FIGURA I. LIPOSOMAS UNILAMELARES Y CARGAS HIDROFÍLICAS O LIPOFÍLICAS. _____	35
FIGURA J. FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE SIRÓLIMUS AL 0,4%. _____	39
FIGURA K. RECTA DE CALIBRADO: POMADA, EMULSIÓN Y GEL. _____	43
FIGURA L. RECTA DE CALIBRADO: LIPOSOMAS. _____	43
FIGURA M. EXTRACCIÓN A PARTIR DE LAS FORMULACIONES Y ANÁLISIS DE SIRÓLIMUS POR HPLC. _____	45
FIGURA N. FASES DEL ESTUDIO CLÍNICO. _____	51
FIGURA O. ESCALA FASI DE VALORACIÓN OBJETIVA DE LOS ANGIOFIBROMAS FACIALES. _____	54
CAPÍTULO PRIMERO	
FIGURE 1. STUDIES SELECTION. _____	67
CAPÍTULO SEGUNDO	
FIGURE 1. OINTMENT, EMULSION, GEL AND LIPOSOMES CHROMATOGRAMS. _____	104
PHOTOGRAPH 1. LIPOSOMAL FORMULATION. _____	109
CAPÍTULO TERCERO	
FIGURE 1. PATIENT DISPOSITION. _____	135
FIGURE 2. BOX PLOTS OF FASI, IGA, AND DLQI SCORES BEFORE AND AFTER TREATMENT, N=11. _____	139
ANNEX 4. SUBJECTIVE EVALUATION BY INVESTIGATOR (SEI) BEFORE (1, 3) AND AFTER TREATMENT (2, 4). _____	139

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA A. PROPUESTA DE FORMULACIONES DE SIRÓLIMUS TÓPICO.	29
CAPÍTULO PRIMERO	
TABLE 1. LEVEL OF EVIDENCE (CEBM SCALE, OXFORD).	66
TABLE 2. SYSTEMATIC REVIEW OF LITERATURE.	69
TABLE 3. SYSTEMATIC REVIEW OF LITERATURE (2).	73
CAPÍTULO SEGUNDO	
TABLE 1. COMPOSITION OF RAPAMYCIN FORMULATIONS.	98
TABLE 2. CHEMICAL STABILITY RESULTS.	103
TABLE 3. PHYSICAL AND MICROBIOLOGICAL STABILITY RESULTS.	106
CAPÍTULO TERCERO	
ANNEX 1. SCHEDULE OF ASSESSMENTS.	125
ANNEX 2. FASI AND IGA SCORES.	127
ANNEX 3. DLQI QUESTIONNAIRE.	132
TABLE 1. PATIENT CHARACTERISTICS AT BASELINE (N=11).	135
TABLE 2. EVALUATION OF EFFECTIVENESS.	137

PRÓLOGO

PRÓLOGO

La presente Tesis Doctoral titulada “Desarrollo galénico e innovación terapéutica en farmacia hospitalaria: sirólimus tópico liposomal en el tratamiento de los angiofibromas faciales asociados a esclerosis tuberosa” se estructura atendiendo a los requisitos y directrices de la Escuela y el Programa de Doctorado en Biomedicina y Farmacia de la Universidad de Valencia. Se presenta en la modalidad de compendio de publicaciones, con tres artículos aceptados y publicados en revistas indexadas en el “Journal Citation Reports (JCR)” y posicionadas en el segundo, tercer y cuarto cuartil de sus respectivas categorías.

Consta de una introducción, que hace referencia a los aspectos y evidencias que actúan como punto de unión de las tres publicaciones, seguida de una descripción de los objetivos principales y secundarios de la Tesis Doctoral. El apartado materiales y métodos detalla el proceso de revisión bibliográfica y los procedimientos experimentales llevados a cabo en cada una de las fases. A continuación, se presentan a modo de resultados los tres capítulos correspondientes al trabajo desarrollado, seguidos de la discusión y las conclusiones globales de la investigación.

Cada capítulo coincide con el contenido publicado en cada uno de los tres artículos aceptados. De este modo, el capítulo primero corresponde a una revisión sistemática basada en la evidencia disponible sobre el tratamiento tópico de los angiofibromas faciales en la enfermedad rara denominada esclerosis tuberosa. El capítulo segundo aborda el proceso de optimización galénica del tratamiento estándar y validación de la formulación final según su

estabilidad química, física y microbiológica. Por último, el capítulo tercero hace referencia a la innovación terapéutica en farmacia hospitalaria, presentándose los resultados de efectividad y seguridad in vivo de la terapia optimizada.

Finalmente, se adjuntan como anexos cada uno de los artículos científicos en el formato exacto en el que se publicaron tras el proceso editorial.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

1. “Estabilidad química de pomada de sirólimus al 0,4% utilizando una base de fase externa oleosa como vehículo”.

Autores: Clara Cortell Fuster, María Amparo Martínez Gómez, Alfonso Ángel López Navarro, Javier Martínez Benavides, Ana Cristina Cercós Lleti y Mónica Climente Martí.

62 Congreso Nacional de Farmacia Hospitalaria 2017. Formato: póster.

URL: <https://www.sefh.es/eventos/62congreso/img/libro-comunicaciones-62-congreso-sefh.pdf>

2. “Estabilidad física, química y microbiológica de formulaciones tópicas de sirólimus 0,4%”.

Autores: Clara Cortell Fuster, María Amparo Martínez Gómez, Carlos Molina Casabán, Ana Cristina Cercós Lleti y Mónica Climente Martí.

63 Congreso Nacional de Farmacia Hospitalaria 2018. Formato: póster.

URL: <https://www.sefh.es/eventos/63congreso/img/libro-comunicaciones-63Congreso.pdf>

3. “Buscando la fórmula: oportunidad galénica en esclerosis tuberosa”.

Autor: Clara Cortell Fuster.

XI Jornada Sociedad Valenciana de Farmacia Hospitalaria (SVFH): Protagonista el Residente 2018. Formato: presentación oral.

4. “Physical, chemical and microbiological stability of sirolimus 0.4% in topical formulations”.

Autores: Clara Cortell Fuster, María Amparo Martínez Gómez, Carlos Molina Casabán, Ana Cristina Cercós Lleti, Mónica Climente Martí y Virginia Merino Sanjuán.

Congreso Europeo de Farmacia Hospitalaria 2019. Formato: póster.

URL: https://www.eahp.eu/sites/default/files/abstract_book_-_bar19.pdf

5. “Reformulación de sirólimus tópico: estabilidad química, física y microbiológica”.

Autores: Clara Cortell Fuster, María Amparo Martínez Gómez, Ana Cristina Cercós Lleti y Mónica Climente Martí.

67 Congreso Nacional de Farmacia Hospitalaria 2022. Formato: póster.

URL: <https://67congreso.sefh.es/img/libro-comunicaciones-67-congreso.pdf>

6. “Topical rapamycin in rare tuberous sclerosis disease: liposomal formulation stability”.

Autores: Clara Cortell Fuster, María Amparo Martínez Gómez, Ana Cristina Cercós Lleti y Mónica Climente Martí.

Congreso Europeo de Farmacia Hospitalaria 2022. Formato: póster.

URL: https://www.eahp.eu/sites/default/files/congresses/27ac_-_eahp_abstract_book_-_online_-_post_congress.pdf

7. “Efectividad y seguridad de sirólimus tópico en formulación liposomal para el tratamiento de los angiofibromas faciales en esclerosis tuberosa”.

Autores: Clara Cortell Fuster, María Amparo Martínez Gómez, Ana Cristina Cercós Lletí, Mónica Climente Martí, Tania Díaz Corpas y Almudena Mateu Puchades.

68 Congreso Nacional de Farmacia Hospitalaria 2023. Formato: comunicación oral. Seleccionada como una de las 8 mejores comunicaciones científicas.

URL: <https://68congreso.sefh.es/img/libro-comunicaciones-68-congreso.pdf>

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

PRIMER ARTÍCULO

Título: Topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis: a systematic review based on evidence.

Autores: Clara Cortell Fuster, María Amparo Martínez Gómez, Ana Cristina Cercós Lletí y Mónica Climente Martí.

Revista: Journal of Dermatological Treatment.

Aceptado: 15 de marzo de 2021.

Journal Impact Factor 2021 (JCR): 3,230.

Ranking: Q2 (Category: Dermatology).

Editorial: Taylor & Francis LTD.

DOI: 10.1080/09546634.2021.1905768

SEGUNDO ARTÍCULO

Título: Optimization, Formulation, and Stability of Topical Rapamycin Used for Rare Tuberous Sclerosis Disease: from Ointment to Liposomes.

Autores: Clara Cortell Fuster, María Amparo Martínez Gómez, Ana Cristina Cercós Lletí y Mónica Climente Martí.

Revista: Journal of Pharmaceutical Innovation.

Aceptado: 3 de noviembre de 2023.

Journal Impact Factor 2022 (JCR): 2,60.

Ranking: Q3 (Category: Pharmacology & Pharmacy).

Editorial: Springer.

DOI: 10.1007/s12247-023-09792-9

TERCER ARTÍCULO

Título: Effectiveness and safety of liposomal rapamycin for the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis.

Autores: Clara Cortell Fuster, María Amparo Martínez Gómez, Ana Cristina Cercós Lleti, Mónica Climente Martí, Tania Díaz Corpas, Almudena Mateu Puchades y Ángeles Revert Fernández.

Revista: Farmacia Hospitalaria.

Aceptado: 20 de abril de 2024.

Journal Impact Factor 2022 (JCR): 1,40.

Ranking: Q4 (Category: Pharmacology & Pharmacy).

Editorial: Aula Médica Ediciones.

DOI: 10.1016/j.farma.2024.04.023

RESUMEN

RESUMEN

Antecedentes

Los angiofibromas faciales asociados a la enfermedad rara de la esclerosis tuberosa son las manifestaciones cutáneas más frecuentes y constituyen un criterio fundamental de diagnóstico. El sirólimus tópico es el tratamiento farmacológico de elección para estas tumoraciones benignas y se elabora como fórmula magistral en los Servicios de Farmacia Hospitalaria. No obstante, al analizar la bibliografía disponible, existe una elevada variabilidad en la práctica clínica en términos de concentración, vehículo, posología, duración del tratamiento y evaluación de la efectividad, lo cual dificulta enormemente el poder establecer cuál es la fórmula más apropiada y sus condiciones óptimas de utilización.

Objetivos

Objetivo principal

Optimizar la fórmula magistral de sirólimus tópico para el tratamiento de los angiofibromas faciales asociados a la enfermedad rara de la esclerosis tuberosa, y establecer las condiciones idóneas de utilización de la formulación final que garanticen la efectividad y la seguridad de la terapia farmacológica.

Objetivos secundarios

→ Realizar una revisión sistemática de la literatura con el fin de establecer cuál es la concentración, posología, excipientes y forma farmacéutica idónea del sirólimus tópico

para los angiofibromas faciales asociados a la esclerosis tuberosa según la evidencia científica disponible.

- Definir la formulación galénica óptima de sirólimus tópico en base a sus excipientes y determinar el periodo de validez del preparado final según estudios de estabilidad química, física y microbiológica.
- Evaluar la efectividad mediante escalas objetivas y subjetivas de severidad de los angiofibromas y de calidad de vida; así como la seguridad de la formulación optimizada de sirólimus tópico en pacientes con angiofibromas faciales asociados a esclerosis tuberosa en condiciones de práctica clínica habitual.

Materiales y métodos

Revisión sistemática

Revisión retrospectiva de la literatura y recopilación de estudios clínicos desarrollados para la evaluación de la efectividad y seguridad del sirólimus tópico en las bases de datos electrónicas Medline (a través de Pubmed) y la biblioteca Cochrane. El nivel de evidencia para cada publicación se estableció según la escala CEBM de Oxford, siendo el nivel 1a el más recomendable (revisiones sistemáticas y metaanálisis de ensayos clínicos aleatorizados), y el nivel 5 el menos recomendable (opiniones de expertos). Cada estudio fue evaluado en detalle, abordando dos aspectos principales: efectividad, expresada según la mejoría subjetiva evaluada por el investigador, objetivamente mediante el uso de escalas validadas o cuestionarios de calidad de vida; y seguridad, evaluada principalmente según la notificación de eventos adversos.

Optimización galénica

1. Mejora del principio activo: sirólimus como materia prima.
2. Mejora del disolvente: Transcutol® P.
3. Mejora del vehículo principal: propuesta y diseño de formulaciones alternativas.
4. Determinación del periodo de validez según estudios estabilidad para cada formulación durante 56 días.
 - a. Estabilidad química: extracción del sirólimus con diferentes solventes y desarrollo y validación de un método HPLC-UV/Vis. Determinación del contenido porcentual de sirólimus remanente (%CR) a partir de las áreas de los picos presentes en el cromatograma. El parámetro T_{90} fue el criterio de estabilidad química.
 - b. Estabilidad física: evaluación de las propiedades galénicas de uniformidad, extensibilidad, ausencia de cristales y ausencia de separaciones de fases. Caracterización de los liposomas: determinación del tamaño medio de partícula, índice de polidispersión, potencial Z y eficiencia de encapsulación a tiempo = 0 días.
 - c. Estabilidad microbiológica: siembra e incubación de muestras en agar sangre.

Evaluación clínica

Estudio observacional, prospectivo y multicéntrico para evaluar la efectividad y la seguridad de la formulación final durante 24 semanas de tratamiento. La efectividad se evaluó principalmente a través de las escalas objetivas FASI e IGA y el cuestionario DLQI. Para determinar el perfil de seguridad se registraron las reacciones adversas y se realizaron

pruebas hematológicas y niveles sanguíneos de sirólimus durante el tratamiento. Análisis estadístico: análisis por intención de tratar, pruebas no paramétricas (test de Shapiro Wilk para muestras relacionadas, significación estadística: $p < 0,05$).

Resultados

Revisión sistemática

Los hallazgos de la revisión sistemática realizada fueron limitados: se incluyeron 30 artículos que evaluaron la terapia tópica con sirólimus para los angiofibromas faciales asociados a esclerosis tuberosa, de los cuales solo cuatro correspondieron a ensayos clínicos aleatorizados y el resto fueron series de casos o casos aislados. Este punto limitó la validez científica de los estudios analizados en su conjunto, ya que la mayoría de ellos se clasificaron en el nivel 4 de evidencia (recomendación C: recomendación favorable pero no concluyente) según la escala CEBM. La efectividad se evaluó mayoritariamente de manera subjetiva, según la opinión del investigador, sin embargo, se identificaron la escala FASI y el cuestionario DLQI como herramientas validadas, simples y reproducibles para determinar objetivamente la severidad de los angiofibromas faciales y evaluar la calidad de vida, respectivamente. En definitiva, la revisión bibliográfica posicionó al sirólimus como el tratamiento farmacológico más adecuado, asegurando su eficacia y seguridad en casi la totalidad de las experiencias clínicas. Para los ensayos restantes del presente proyecto y según la evidencia disponible, se decidió utilizar una concentración de sirólimus del 0,4% con una frecuencia de administración de tres veces por semana. Sin embargo, debido a la elevada variabilidad entre estudios, no fue posible establecer una forma farmacéutica idónea para la administración tópica.

Optimización galénica

La inclusión de sirólimus como materia prima condujo a mejoras en las características organolépticas del preparado final y a una reducción en el coste de la terapia en comparación con los comprimidos comercializados de sirólimus. La incorporación del Transcutol® P como disolvente permitió una distribución más homogénea del principio activo en el vehículo y una mayor biodisponibilidad del fármaco a través del estrato córneo, gracias a la elevada solubilidad del sirólimus en el Transcutol® P en contraste con la parafina líquida. El objetivo de mejorar el vehículo principal llevó a la propuesta y diseño de cuatro posibles formulaciones de sirólimus al 0,4%: pomada, emulsión, gel y formulación liposomal.

Los estudios de estabilidad demostraron que únicamente una de las cuatro opciones propuestas, la formulación liposomal, mantuvo su estabilidad química, física y microbiológica a lo largo de 56 días. Tras la ampliación del estudio de estabilidad, se le otorgó un período de validez de 84 días entre 2-8 °C, protegida de la luz. La estabilidad química de las formulaciones tipo pomada y gel se vio limitada por un T_{90} de 56 y 21 días, respectivamente. La formulación tipo emulsión perdió su estabilidad física a los 21 días por observarse una separación de fases y rotura definitiva de la emulsión. Todas las formulaciones mantuvieron su estabilidad microbiológica durante todo el período de muestreo.

La calidad de la formulación liposomal fue confirmada mediante la caracterización de los liposomas formados, demostrando la obtención de un sistema homogéneo, eléctricamente estable y con una elevada capacidad de encapsulación del sirólimus en las vesículas

liposomales. Tamaño medio de partícula = 178,9 nm, índice de polidispersión = 0,093, potencial Z = -41,1 mV y eficiencia de encapsulación = 89,19 %.

Evaluación clínica

La evaluación clínica demostró que el sirólimus tópico liposomal al 0,4% administrado tres veces por semana fue efectivo y seguro para el tratamiento de los angiofibromas faciales en 8 de 11 pacientes (73%). Las pruebas no paramétricas mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las puntuaciones FASI, IGA, y las subcategorías de eritema y tamaño de los angiofibromas antes y después del tratamiento. Cinco de los 11 pacientes (45%) mejoraron su calidad de vida según el cuestionario DLQI. En tres de ellos, la mejoría en el DLQI se consideró clínicamente relevante al obtener un cambio de al menos 4 puntos al finalizar el tratamiento, con una media de mejora de 7,6 puntos.

La formulación tópica liposomal fue bien tolerada, con efectos adversos leves como prurito o sensación de tirantez que desaparecieron al finalizar el tratamiento. En dos casos, el eritema fue reportado como un efecto adverso moderado que llevó a la interrupción prematura de la terapia. Ambos pacientes presentaban antecedentes de piel con tendencia atópica. Los resultados de las pruebas hematológicas y farmacocinéticas confirmaron la ausencia de absorción sistémica del sirólimus después de su administración tópica, lo que contribuyó a una mayor seguridad del sirólimus tópico liposomal.

Las condiciones idóneas de utilización del sirólimus tópico liposomal al 0,4% administrado tres veces por semana fueron: aplicación con guante de nitrilo de una película ligera hasta la completa desaparición de la formulación en la piel preferiblemente por la tarde o la noche.

Tras dos o tres horas desde la administración, lavar con agua y jabón neutro para eliminar cualquier residuo y secar. Hidratar bien la zona y usar fotoprotección total durante todo el año. Evitar el tratamiento durante el periodo estival.

Conclusiones

Tras la revisión sistemática, la optimización galénica y la evaluación clínica, el sirólimus tópico liposomal al 0,4% fue la formulación finalmente seleccionada y demostró su efectividad y seguridad para el tratamiento de los angiofibromas faciales asociados a esclerosis tuberosa. En consecuencia, se incluyó como fórmula magistral disponible en la Guía Farmacoterapéutica del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia cubriendo una necesidad médica para esta indicación. La elaboración de medicamentos en los Servicios de Farmacia Hospitalaria es, en muchas ocasiones, la única alternativa farmacológica posible para tratar los síntomas de las enfermedades raras, destacando la importancia del desarrollo galénico y la innovación terapéutica, especialmente, cuando las opciones de tratamiento son limitadas o inadecuadas.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

La esclerosis tuberosa (ET) es una enfermedad rara con una incidencia entre 1/6.000 a 1/10.000 habitantes (1). Genéticamente, se trata de una enfermedad hereditaria autosómica dominante de expresión variable, originada por la mutación y posterior inactivación de uno o dos genes supresores tumorales: TSC1 y TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 1 y 2), localizados en los cromosomas 9 y 16, respectivamente (2). Estos genes codifican las proteínas hamartrina y tuberina, las cuales forman un importante heterodímero (complejo TSC1-TSC2) (3) que es clave en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación de la vía mTOR (mammalian Target of Rapamycin).

La inactivación génica se traduce en la formación multisistémica de tumores benignos llamados harmartomas que pueden tener diferente gravedad y localización, siendo una de las más frecuentes los riñones (angiomiolipomas renales). Las tumoraciones en ocasiones tienden a sangrar espontáneamente o pueden verse afectadas por traumatismos produciéndose un sangrado incontrolado. Otros tejidos y órganos donde pueden aparecer son el cerebro, los pulmones, el corazón, los ojos o la piel.

La epilepsia supone el síntoma más común asociado a las formaciones tumorales en el cerebro. De hecho, aproximadamente el 80 % de los individuos afectados por esclerosis tuberosa sufren crisis comiciales. A pesar de la administración de medicamentos

antiepilépticos, muchos pacientes presentan epilepsia farmacorresistente, con un mal control de los síntomas neurológicos (4). Todas estas manifestaciones anatomo-clínicas fueron publicadas por primera vez por Bourneville en 1880 (5) y, por esta razón, la enfermedad de Bourneville es sinónimo de ET.

En el campo de la dermatología, encontramos diferentes manifestaciones cutáneas asociadas a esta enfermedad como los fibromas periungueales, la placa de *chagrin* o las máculas hipopigmentadas en *hoja de fresno*. Sin embargo, las afecciones de la piel más frecuentes de la ET son los denominados angiofibromas faciales (AF). Son tumoraciones hamartomatosas que aparecen en el rostro en forma de pápulas eritemato-rosadas de pequeño tamaño, con tendencia a confluir formando placas. Constituyen un criterio diagnóstico fundamental de la enfermedad ya que están presentes hasta en el 80% de los pacientes (6). Estas lesiones faciales aparecen entre los 2 y 5 años de edad, y crecen en número y tamaño hasta estabilizarse tras la adolescencia (2).



Figura A. Angiofibromas en las mejillas, en el mentón y en la nariz, con patrón predominante en empedrado y distribución bilateral.

Los AF se clasifican según su localización en el rostro: típicamente en mejillas, nariz, surco nasogeniano, mentón y frente; su patrón de presentación: en empedrado o sebáceo; y su distribución: unilateral o bilateral (Figura A).

El impacto visual de las lesiones faciales implica problemas estéticos y psicológicos (7) (8) (9) (10), y, en ocasiones, el tratamiento dermatológico no recibe la prioridad necesaria debido a la presencia de otras complicaciones más graves. En consecuencia, la implicación psicosocial de las manifestaciones cutáneas ha motivado la utilización de múltiples terapias para mejorar la calidad de vida de estos pacientes (11).

El tratamiento de los AF puede ser físico o farmacológico. Los tratamientos físicos incluyen radiofrecuencia, electrocoagulación, crioterapia, dermoabrasión o láser (3) (12). Los principales problemas de estas técnicas físicas son que resultan ser invasivas y dolorosas, requiriendo anestesia local en la mayoría de las intervenciones. Además, pueden producir diversas complicaciones como cicatrices hipertróficas, trastornos de la pigmentación o infecciones postquirúrgicas.

Entre los tratamientos farmacológicos históricamente se han utilizado el tranilast oral (13), un fármaco antialérgico que inhibe ciertos factores del crecimiento y disminuye la secreción de citocinas por los mastocitos, o la podofilotoxina tópica (14), un derivado alcaloide utilizado para las verrugas genitales o los condilomas acuminados. Con ambas alternativas se consiguieron mejorías documentadas del eritema y el tamaño de los AF, pero con sensación de quemazón como reacción adversa en el caso concreto de la podofilotoxina. Cabe destacar

que, por su mecanismo de acción, ninguno de estos dos fármacos actúa sobre la vía mTOR, cuya alteración es la causante de esta enfermedad rara.

Un elevado número de publicaciones sitúan al sirólimus o rapamicina como la alternativa farmacológica más apropiada, según resultados favorables de efectividad y seguridad (6).

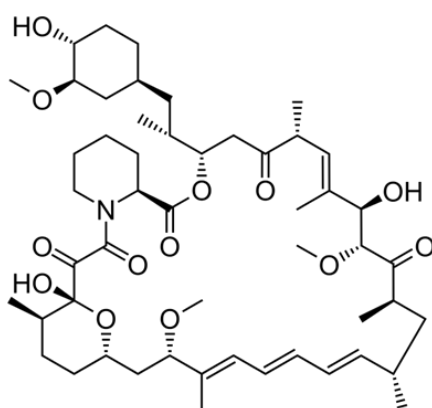


Figura B. Estructura molecular del sirólimus.

El sirólimus es un agente antifúngico producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* con estructura de lactona macrocíclica y naturaleza lipofílica (Figura B). Fue descubierto en 1965 por un grupo de investigadores canadienses en una muestra de suelo de la Isla de Pascua, cuyo nombre nativo es Rapa Nui, de ahí la denominación de rapamicina.

El mecanismo de acción molecular del sirólimus es conocido de forma parcial. Se une a la proteína citosólica específica FKPB-12 e inhibe la activación de mTOR, una quinasa crítica para la progresión del ciclo celular, bloqueando varias rutas específicas de transducción de señales. Por tanto, es un potente inhibidor de la vía mTOR con destacadas propiedades

inmunosupresoras, antitumorales y antiangiogénicas. Su acción inmunosupresora se fundamenta en el bloqueo de la fase G1 a la fase S del ciclo celular de los linfocitos T, obstaculizando su activación y la producción de anticuerpos. Su actividad antitumoral se basa en la propia inhibición de la vía mTOR, aumentada de forma aberrante en las células tumorales. Asimismo, sus propiedades antiangiogénicas se explican por la disminución de los niveles de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (15).

En cuanto al perfil de seguridad, las reacciones adversas más frecuentes del sirólimus son la leucopenia, la trombocitopenia y la fotosensibilidad.

Este fármaco se comercializa como Rapamune® con formas farmacéuticas disponibles en comprimidos recubiertos y solución oral (16).

El sirólimus se utiliza principalmente vía oral en la prevención o el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped en los pacientes con trasplante de médula ósea o de riñón. Sin embargo, su uso tópico fuera de indicación (*off-label*) para los AF en ET está cada vez más establecido. En este caso, la prescripción debe ir acompañada de un consentimiento informado oral o escrito por parte del paciente, siendo debidamente justificada su utilización en la historia clínica disponible (17).

Diferentes estudios con sirólimus oral mostraron una mejoría en los AF tras la terapia inmunosupresora post trasplante renal (18) (19) (20). Tras estas experiencias, se planteó la administración tópica pues evitaba la exposición sistémica al fármaco, minimizando los efectos adversos de inmunosupresión y fototoxicidad. Encontramos en la literatura múltiples

estudios y series de casos con sirólimus tópico, incluso cinco ensayos clínicos aleatorizados (21) (22) (23) (24) (25) que mostraron una potente efectividad y excelente tolerabilidad del tratamiento. En la mayoría de los pacientes se reportó una reducción del eritema, del tamaño de las pápulas y un aplanamiento de las lesiones, con una mejora considerable en la textura de la piel.

JUSTIFICACIÓN Y CONTEXTO

JUSTIFICACIÓN Y CONTEXTO

El presente proyecto de investigación surgió tras la consulta realizada por el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia sobre la intención de prescribir el sirólimus tópico como fórmula magistral para el tratamiento de los AF asociados a la enfermedad rara de la ET.

El grupo de Farmacotecnia de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH) muestra en su base de datos de fórmulas magistrales elaboradas para enfermedades raras (EERR) cuál es la concentración de sirólimus y excipientes más comúnmente empleados para elaborar esta fórmula magistral en esta indicación. La formulación más utilizada por la mayoría de los Servicios de Farmacia Hospitalaria es la pomada de sirólimus al 0,4% en vaselina.

Según la “Guía de buenas prácticas de preparación de medicamentos en servicios de farmacia hospitalaria” (26), el excipiente o base seleccionada en una formulación tópica debe permitir la liberación y absorción adecuada del medicamento. Dentro de los controles finales de estabilidad deben asegurarse la uniformidad del preparado, la extensibilidad, la ausencia de cristales y la ausencia de separaciones de fases mediante la extensión de la formulación final sobre una superficie transparente o la piel. La matriz de riesgos para preparaciones no estériles no acuosas y acuosas (vía no oral) establece los plazos de validez en 6 meses y 30 días a temperatura ambiente, respectivamente. Así, la asignación de periodos de validez

superiores a los indicados en la bibliografía deberá estar validada con estudios propios de estabilidad galénica, fisicoquímica y microbiológica del preparado.

De igual modo, en la bibliografía disponible sobre esta afección dermatológica existe una elevada variabilidad entre estudios en términos de concentración, vehículo, posología, duración del tratamiento y evaluación de la efectividad, lo cual dificulta enormemente el poder establecer cuál es la alternativa más apropiada.

Por todos estos motivos, surgió la necesidad de la búsqueda de una formulación adecuada por parte de la Unidad de Farmacotecnia del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia para establecer la concentración, la posología, los excipientes y la forma farmacéutica idónea, así como las condiciones óptimas de utilización de la formulación final y su periodo de validez, que garantizaran una efectividad y seguridad del tratamiento.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La revisión sistemática de la literatura, la optimización galénica y la evaluación de resultados en la práctica clínica habitual son herramientas válidas para establecer las condiciones óptimas de utilización de la formulación de sirólimus tópico para el tratamiento de los AF asociados a la ET.

OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es optimizar la fórmula magistral de sirólimus tópico para el tratamiento de los AF asociados a la enfermedad rara de la ET, además de evaluar la efectividad y la seguridad de la formulación final y establecer sus condiciones idóneas de utilización.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Realizar una revisión sistemática de la literatura con el fin de establecer cuál es la concentración, posología, excipientes y forma farmacéutica idónea del sirólimus tópico para los AF asociados a la ET según la evidencia científica disponible.
- Definir la formulación galénica óptima de sirólimus tópico en base a sus excipientes y determinar del periodo de validez del preparado final según estudios de estabilidad química, física y microbiológica.
- Evaluar la efectividad mediante escalas objetivas y subjetivas de severidad de los angiofibromas y de calidad de vida; así como la seguridad de la formulación optimizada de sirólimus tópico en pacientes con AF asociados a ET en condiciones de práctica clínica habitual.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

ASPECTOS ÉTICOS

Todas las pruebas y procedimientos del estudio se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki para experimentación humana (Helsinki, 1964), el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y la Declaración Universal de la UNESCO de los derechos humanos, ajustándose a la normativa vigente para estos estudios. Además, se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética. El presente proyecto fue revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia en diciembre de 2016 (Código CEIC: 12/16) y, del mismo modo, emitido un posterior dictamen favorable a la enmienda en mayo de 2021 (Enmienda, Código CEIC: 16.102).

FASES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El presente proyecto de investigación consta de tres fases bien diferenciadas, que abordan desde diferentes aspectos la optimización de la terapia tópica para los pacientes con AF asociados a la ET.

I. Fase de revisión sistemática

Evaluación ordenada y explícita de la literatura disponible y resumen cualitativo de la evidencia.

II. Fase de optimización galénica

Mejora galénica de la formulación tópica de sirólimus en base a sus excipientes con la propuesta y diseño de diferentes formulaciones optimizadas y determinación del periodo de validez de todas las alternativas según estudios de estabilidad química, física y microbiológica.

III. Fase de evaluación clínica

Resultados de efectividad y seguridad de la formulación final en pacientes reales en condiciones de práctica clínica habitual.

FASE I: REVISIÓN SISTEMÁTICA

Las revisiones sistemáticas resultan beneficiosas en diversos aspectos cruciales, ya que ofrecen una síntesis del conocimiento actual en un área específica. A partir de esta recapitulación, es posible identificar futuras prioridades de investigación, abordar preguntas que podrían no ser respondidas por estudios individuales, detectar problemas en la investigación primaria que deberían corregirse en futuros estudios, y generar o evaluar teorías sobre por qué y cómo ocurren fenómenos de interés. En consecuencia, las revisiones sistemáticas proporcionan distintos tipos de conocimiento dirigidos a diversos usuarios, como pacientes, profesionales de la salud o investigadores.

Para asegurar que una revisión sistemática sea valiosa para los usuarios, los autores deben elaborar una publicación transparente, completa y precisa en la que se explique claramente la razón de realizar la revisión, los métodos empleados (por ejemplo, cómo se identificaron y seleccionaron los estudios) y los hallazgos obtenidos (por ejemplo, las características principales de los estudios incluidos). La guía actualizada para la publicación de revisiones sistemáticas, PRISMA 2020, permite lograr este objetivo de manera más sencilla y ordenada garantizando una revisión de la literatura de calidad (<http://www.prisma-statement.org/>).

ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

Se llevó a cabo una revisión retrospectiva de la literatura y recopilación de estudios clínicos desarrollados para la evaluación de la efectividad y seguridad del sirólimus tópico en el tratamiento de los AF en la enfermedad rara de la ET. Para ello se utilizó la guía PRISMA 2020 para la publicación de revisiones sistemáticas. Las publicaciones científicas fueron identificadas en las bases de datos electrónicas Medline (a través de Pubmed) y la biblioteca Cochrane en el periodo comprendido entre enero de 2000 y diciembre de 2020. La última fecha de búsqueda fue el 19 de enero de 2021. Las palabras clave de búsqueda (incluidas en los términos MeSH de vocabulario terminológico controlado) fueron *rapamicina*, *sirólimus*, *rapamune*, *angiofibroma*, *dermatofibroma* y *esclerosis tuberosa*. La estrategia de búsqueda para la base de datos de Pubmed fue: *("sirolimus"[tiab] OR "rapamycin"[tiab] OR "rapamune"[tiab]) AND ("angiofibroma"[All Fields] OR "dermatofibroma"[All Fields]) AND "tuberous sclerosis"[All Fields] AND ("2000/01/01"[PDAT]:"2020/12/31"[PDAT]))*.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Se llevó a cabo un exhaustivo proceso de selección de la literatura, así como la recopilación de estudios clínicos, utilizando criterios de inclusión y exclusión específicos diseñados para revisiones sistemáticas. Este proceso metodológico garantizó la identificación y el análisis de la evidencia más relevante disponible en la literatura científica. La aplicación de criterios claros y predefinidos para la selección de los estudios aseguró la consistencia y la objetividad en la recopilación de datos.

Criterios de inclusión

- Se consideraron ensayos clínicos, series de casos y casos aislados que abordaran específicamente el tratamiento de los AF en pacientes con ET utilizando sirólimus tópico como intervención.

Criterios de exclusión

- Diagnósticos diferentes de AF en ET.
- Tratamiento con sirólimus por vía de administración diferente a la tópica.
- Opiniones, manuscritos o artículos publicados en idiomas distintos del inglés.
- Cartas al editor.
- Ensayos que involucraran animales en lugar de sujetos humanos.
- Se excluyeron aquellos estudios cuyo texto completo del manuscrito no estuviera disponible para su revisión.

NIVELES DE EVIDENCIA CIENTÍFICA Y GRADOS DE RECOMENDACIÓN

El concepto de Medicina Basada en la Evidencia (MBE) se define como “la utilización consciente, explícita y juiciosa de la mejor evidencia clínica disponible para tomar decisiones sobre el cuidado de los pacientes individuales” (27). En realidad, la MBE pretende aportar más ciencia al arte de la medicina, con el objetivo de disponer de la mejor información científica contrastada para aplicarla a la práctica clínica habitual (3).

Se pueden utilizar escalas jerárquicas de evaluación de la evidencia, basadas en el nivel de rigor científico aplicado en el diseño de los estudios. Estas escalas sirven como base para formular recomendaciones sobre la implementación de procedimientos médicos o intervenciones sanitarias específicas. A pesar de la variedad de herramientas que evalúan la calidad de la evidencia científica, todas comparten similitudes significativas entre ellas.

Entre las más utilizadas encontramos la escala SIGN validada por la Scottish Intercollegiate Guidelines Network o la escala CEBM (Centre for Evidence-Based Medicine) de la Universidad de Oxford.

El nivel de evidencia para cada publicación en nuestra revisión sistemática se estableció según la escala CEBM de Oxford, siendo el nivel 1a el más recomendable (revisiones sistemáticas y metaanálisis de ensayos clínicos aleatorizados), y el nivel 5 el menos recomendable (opiniones de expertos) (28).

DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS ESTUDIOS CLÍNICOS

En el análisis de las investigaciones clínicas desarrolladas para el tratamiento de los AF con sirólimus tópico, se recopilaron datos para cada estudio individual como el número de pacientes (n), la concentración y el vehículo utilizados, el diseño del estudio, las terapias concomitantes, la posología y la duración del tratamiento en semanas.

Cada estudio fue evaluado en detalle, abordando dos aspectos principales:

- Efectividad: expresada según la mejoría subjetiva evaluada por el investigador, la evaluación objetiva mediante el uso de escalas validadas y no validadas, o cuestionarios de calidad de vida.
- Seguridad: evaluada principalmente según la notificación de eventos adversos, la realización de pruebas hematológicas para determinar el recuento de plaquetas, linfocitos y glóbulos rojos y la determinación de niveles sanguíneos de sirólimus.

FASE II: OPTIMIZACIÓN GALÉNICA

MEJORA DEL PRINCIPIO ACTIVO: SIRÓLIMUS COMO MATERIA PRIMA

El sirólimus está incluido en la lista NIOSH (29) como medicamento peligroso desde 2014, lo que implica que toda manipulación de este principio activo se debe llevar a cabo en condiciones de protección para el manipulador en cabina de seguridad biológica (CSB-I) con doble guante, bata y mascarilla. En consecuencia, el sirólimus está clasificado como un medicamento de riesgo durante el embarazo (FDA RE C), lo que significa que puede presentar riesgos potenciales para el feto en desarrollo.

En relación al tratamiento tópico de los AF en pacientes con ET, la gran mayoría de publicaciones sólo han informado de formulaciones elaboradas a partir de los comprimidos recubiertos comercializados de sirólimus (Rapamune®) (30) (2), presentando inconvenientes importantes. Cuando se utilizan los comprimidos para la elaboración, el medicamento es parcialmente o incluso no solubilizado en la formulación tópica, lo que resulta en una menor (o incluso nula) biodisponibilidad para ejercer su efecto. Respecto a las características organolépticas, los restos de película, así como los excipientes presentes en los comprimidos empeoran el resultado final de la forma farmacéutica. Incluso se ha informado, en experiencias y estudios previos, de daños en la superficie cutánea y el estrato córneo debido a una trituración inadecuada de los comprimidos recubiertos. Por último, la presentación de Rapamune® de mayor dosis disponible es de 2 mg (Figura C), con un precio medio de 6,14 € por comprimido. En consecuencia, al elaborar la pomada se utilizan un gran número de

comprimidos, lo que incrementa el coste de la terapia. Por ejemplo, para formular 20 gramos de pomada de sirólimus al 0,4% se necesitan 40 comprimidos de Rapamune® de 2 mg. Esto supone un coste de la formulación de 245,6 €, considerando únicamente el principio activo.



Figura C. Comprimidos de Rapamune® y sirólimus como materia prima (Acofarma S.A.).

Actualmente, es posible adquirir sirólimus como materia prima en España a través del laboratorio Acofarma Distribución S.A. (Figura C). Partiendo de este producto como principio activo, se pueden mejorar las características organolépticas de la fórmula magistral al lograr la eliminación tanto de los excipientes como de los restos de cubierta, que ni con el tamizado de los comprimidos triturados se consigue descartar. El coste de adquisición de 1g de sirólimus como materia prima es de 509,5 €, lo que supone un coste de la formulación al 0,4% de 40,8 €, considerando sólo el principio activo.

MEJORA DEL DISOLVENTE TRANSCUTOL® P

El dietilen glicol monoetil éter o Transcutol® P es un líquido transparente e incoloro que se emplea en formulación magistral para disolver principios activos. También es un promotor de la absorción y un potenciador de la penetración para formulaciones tópicas, que mejora la difusión del fármaco a través de la piel (31) (32). Suele utilizarse en preparados farmacéuticos, tópicos, transdérmicos y orales; y varios estudios toxicológicos han probado su seguridad y baja capacidad de irritación cuando forma parte de medicamentos tópicos.

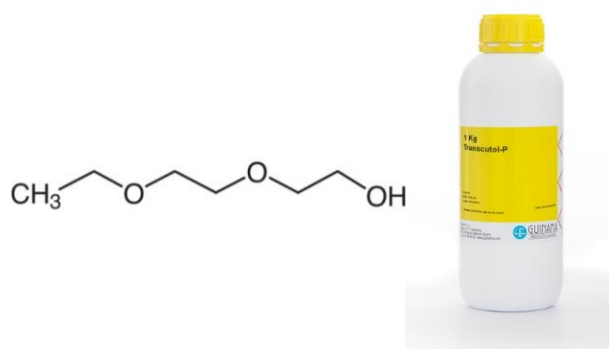


Figura D. Molécula de Transcutol® P y presentación como excipiente por laboratorios Guinama S.L.U.

Bouguéon et al. utilizaron el Transcutol® P (Figura D) y demostraron que el sirólimus es 10 veces más soluble en este disolvente (altamente soluble: 20,2 mg/ml) en comparación con la parafina líquida (< 2 mg/ml). Estos autores fueron los primeros en presentar una formulación tópica incorporando el principio activo previamente solubilizado en un disolvente. Esto

permitió una distribución más homogénea del sirólimus en el vehículo, asegurando una mayor biodisponibilidad del fármaco a través del estrato córneo (33).

MEJORA DEL VEHÍCULO PRINCIPAL: PROPUESTA Y DISEÑO DE NUEVAS FORMULACIONES

A lo largo de los años, varios autores han estudiado diferentes formulaciones alternativas a la clásica pomada con vaselina, con el objetivo de conseguir un mejor aspecto y consistencia de la formulación, e incrementar el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente. La vaselina como vehículo principal da como resultado una formulación con unas características organolépticas y apariencia muy desfavorables: la aplicación es dificultosa por su mala extensibilidad y la sensación tras su administración no es nada confortable. Además, es muy complicada la retirada efectiva de la piel mediante el proceso de lavado con agua y jabón, provocando en ocasiones una irritación importante en la zona de administración. Por otra parte, la absorción percutánea viene limitada por el estrato córneo cuando se formulan fármacos lipófilos con vehículos oclusivos como la vaselina.

Entre los ejemplos más destacados de nuevas fórmulas magistrales de sirólimus de aplicación tópica encontramos preparaciones tipo gel con estudios de estabilidad fisicoquímica y microbiológica (22) (34) (35) (36) (37), liposomas (38) (39) e incluso formulaciones elaboradas a partir de cremas y pomadas comercializadas (Excipial hydrocrème®, Skincerity®, Dexeryl® o Eucerin®) (33) (21) (40) (41).

Desde la Unidad de Farmacotecnia del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia se propusieron y desarrollaron cuatro posibles formulaciones con el objetivo de mejorar la pomada elaborada únicamente con parafina líquida y vaselina. Todas las propuestas contenían el principio activo de sirólimus al 0,4%, pero eran diferentes en sus excipientes y el tipo de formulación final resultante (Tabla A).

Tabla A. Propuesta de formulaciones de sirólimus tópico.

Formulación	Componente	Cantidad
Pomada	Sirólimus	0,4 %
	Transcutol® P	10 %
	Lanolina	10 %
	Manteca de karité	20 %
	Vitamina E	1 %
	Vaselina	c.s.p. 20 g
Emulsión	Sirólimus	0,4 %
	Transcutol® P	10 %
	Base autoemulsionable W/O	20 %
	API	c.s.p. 20 g
Gel	Sirólimus	0,4 %
	Transcutol® P	10 %
	Hidroxipropilmetilcelulosa	2 %
	API	c.s.p. 20 g
Liposomas	Sirólimus	0,4 %
	Transcutol® P	3 %
	Solución liposomal (Guinoxome®)	25 %
	Colesterol	0,1 %
	Miristrato de isopropilo	10 %
	Propilenglicol	10 %
	Carbopol	2 %
	NaOH 10%	c.s.p. pH 7.5
	API	c.s.p. 20 g

FORMULACIÓN POMADA

En el anexo A se muestra el modus operandi para elaborar la formulación tipo pomada de sirólimus al 0,4% como mejora de la formulación clásica con vaselina.

La principal diferencia con la pomada de referencia fue la adición de los excipientes lanolina, manteca de karité y vitamina E. La lanolina es ampliamente utilizada como base o excipiente de pomadas, cosméticos y ungüentos, y resulta muy efectiva como hidratante y emoliente. La manteca de karité, rica en polifenoles y tocotrienoles, actúa como antioxidante natural, hidratando y suavizando la piel. Sus ácidos grasos, como el oleico, ofrecen propiedades antiinflamatorias y regenerativas ideales para productos dermatológicos. Su alto contenido en alantoína promueve la regeneración celular y mejora la hidratación cutánea. Además, es beneficiosa para problemas cutáneos como el eccema o el eritema debido a su alto contenido en vitamina A.

La vitamina E o tocoferol es un potente antioxidante con efecto antiinflamatorio y calmante, capaz de mejorar la textura de la piel e incluso el aspecto de las marcas y cicatrices, tan habituales en los pacientes sometidos a terapia láser para tratar sus AF.



Figura E. Formulación pomada de sirólimus al 0,4%.

FORMULACIÓN EMULSIÓN

En el anexo B se detalla el modus operandi para la elaboración de la emulsión de sirólimus al 0,4%. Se propuso la elaboración de una formulación tipo emulsión a partir de una base autoemulsionable W/O proporcionada por el laboratorio Acofarma Distribución S.A. y compuesta principalmente por vaselina, otros compuestos lipídicos y ozokerita o ceresina. La ozokerita es una cera mineral que actúa como estabilizadora de emulsiones, opacificante y reguladora de la viscosidad. Tras la disolución del principio activo en la base autoemulsionable se debe incorporar el agua hasta la formación de una emulsión tipo W/O con fase interna acuosa y fase externa oleosa. La base es compatible con la mayoría de los principios activos utilizados en formulación magistral y además es inocua para la piel siempre que se formule en cantidades inferiores al 25%.



Figura F. Formulación emulsión de sirólimus al 0,4%.

FORMULACIÓN GEL

El anexo C hace referencia al *modus operandi* para la elaboración del gel de sirólimus al 0,4%. Se propuso una formulación tipo gel incorporando lentamente el sirólimus al vehículo principal (hidroxipropilmetilcelulosa y agua) bajo agitador magnético.

La hidroxipropilcelulosa es un agente gelificante ideal para crear geles acuosos o hidroalcohólicos límpidos y transparentes. No requiere ajustar el pH del medio, como sí ocurre con otros agentes gelificantes como el Carbopol®. La gelificación no es instantánea y se logra por imbibición durante al menos 24 horas.



Figura G. Formulación gel de sirólimus al 0,4%.

FORMULACIÓN LIPOSOMAL

El estrato córneo, como capa externa de la piel, desempeña un papel crucial en la permeabilidad de los fármacos. Debido a su estructura compacta y su composición lipídica, actúa como una barrera sumamente eficaz para la penetración de moléculas. Los compuestos extremadamente hidrofílicos, hidrofóbicos o de elevado peso molecular tienen dificultades para atravesarla y alcanzar las capas más profundas de la piel, lo que compromete la eficacia de ciertos medicamentos administrados tópicamente.

En los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de estudios centrados en nuevos sistemas de transporte, con el propósito de superar las limitaciones que encontramos en la vía de administración tópica. Estos sistemas buscan incorporar cantidades adecuadas de moléculas activas, ya sean hidrófilas o lipófilas, con el objetivo de facilitar su acumulación o difusión a través de la piel, posibilitando así su acción farmacológica.

Entre estos, los liposomas destacan como sistemas de notable potencial, permitiendo la vehiculización de principios activos que por sí solos no logran traspasar la epidermis. Son capaces de mejorar la penetración de fármacos a través del estrato córneo y, por lo tanto, aumentar su biodisponibilidad. Además, su capacidad de fusionarse con las membranas celulares permite liberar el fármaco directamente en las capas más profundas de la piel, convirtiéndose en portadores altamente efectivos y valiosos.

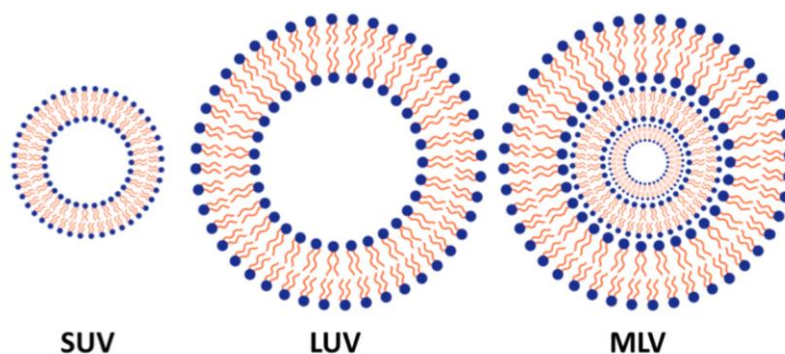


Figura H. Clasificación de los liposomas: vesículas unilamelares pequeñas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV) y vesículas multilamelares (MLV).

COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS LIPOSOMAS

Los liposomas están compuestos por estructuras vesiculares conformadas principalmente por fosfolípidos y colesterol, con cabezas hidrófilas y colas hidrófobas, organizándose de manera semejante a las membranas celulares. Las ceramidas y el colesterol son los principales componentes del estrato córneo, por lo que el desarrollo de liposomas que imitan o mimetizan la composición de las estructuras biológicas posibilita que estas formulaciones sean compatibles con todo tipo de pieles.

Los liposomas más simples están formados por una bicapa lipídica que encierra un compartimento acuoso y se les conoce como liposomas unilamelares (SUV y LUV). Esta clase de liposomas tienen una mejor capacidad de encapsulación que los de tipo multilamellar (MLV)

y poseen un tamaño del orden de 20 nm a 500 μm de diámetro con morfología principalmente esférica (Figura H) (42) (43).

Al estar compuestos por una fracción lipídica y una fracción acuosa, los liposomas pueden alojar sustancias hidrofílicas (en el compartimento acuoso) y/o sustancias lipofílicas (en la bicapa lipídica) (Figura I).

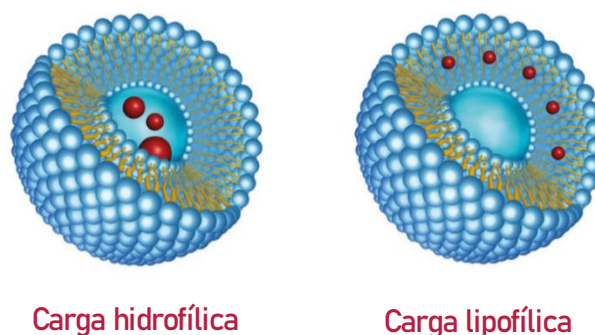


Figura I. Liposomas unilamelares y cargas hidrofílicas o lipofílicas.

ELABORACIÓN DE LOS LIPOSOMAS

El proceso de fabricación de liposomas tiene como objetivo principal obtener vesículas estables a largo plazo, con una distribución de tamaños homogénea y una alta capacidad de encapsulación del principio activo vehiculizado.

El método de elaboración de liposomas más simple es el método de Bangham (44). Es el primer procedimiento que se desarrolló y hoy en día es de los más utilizados. Este proceso implica disolver fosfolípidos y componentes lipídicos en un solvente orgánico apropiado y luego evaporar dicho solvente, lo que permite la formación de una película lipídica fina en el fondo del recipiente. Al hidratar esta película lipídica con un medio acuoso, se generan vesículas liposomales. Si la molécula activa que se desea encapsular es hidrófila, se incorpora en el medio acuoso durante la hidratación; en cambio, si es lipófila, se incluye en el proceso de formación de la película lipídica.

Pese a ser uno de los métodos más sencillos, el método de Bangham tiene su dificultad por cierta complejidad en el procedimiento y la utilización de aparataje específico necesario para lograr la formación de los liposomas. Actualmente, es posible simplificar el proceso de liposomado de manera que el formulista solo precise de un simple agitador magnético, material de vidrio y filtros esterilizantes de 0,22 μm .

En el Anexo D se muestra el procedimiento normalizado de trabajo (PNT) para la elaboración de la formulación liposomal de sirólimus al 0,4%. Los componentes y el método de ejecución

quedan reflejados en el documento, destacando los siguientes aspectos en cuanto al proceso y a la innovación galénica que supone la formulación liposomal.

SOLUCIÓN LIPOSOMAL

En el ámbito cosmético y farmacéutico se utilizan soluciones lipídicas ya preparadas y comercializadas que son capaces de formar liposomas tras adicionar una solución acuosa. En concreto, la solución liposomal Guinoxome® de laboratorios Guinama S.L.U. permite formar liposomas fácilmente y de gran calidad, incorporando los principios activos lipófilos directamente a la solución liposomal o, en caso de encapsular sustancias hidrófilas, adicionarlas a la solución acuosa. El fosfolípido mayoritario en la solución liposomal Guinoxome® es la fosfatidilcolina y permite obtener nanovesículas de tipo unilamelar (SUV y LUV) con tamaños de partícula comprendidos entre 150 y 800 nm de diámetro.

COLESTEROL

Las bicapas lipídicas de los liposomas están constituidas principalmente por fosfatidilcolina y pueden contener colesterol. El paso previo a la elaboración de los liposomas consiste en la adición de colesterol al Guinoxome® hasta su completa disolución. El colesterol induce cambios en las propiedades reológicas de las membranas otorgando posteriormente a los liposomas una estructura más compacta y resistente.

MIRISTRATO DE ISOPROPIL

El miristrato de isopropilo es un producto emoliente muy ligero que reduce la sensación grasa en las formulaciones. También se utiliza como disolvente, aglutinante, diluyente y promotor de la absorción percutánea.

PROPILENGLICOL

El propilenglicol tiene propiedades humectantes, antioxidantes y estabilizantes mejorando la consistencia de la formulación final.

NaOH

El hidróxido de sodio (NaOH) se utiliza para ajustar el pH de la formulación liposomal a 7.0-7.5, lo cual incrementa la estabilidad de los liposomas en el tiempo.

CARBOPOL

El carbopol o carbomer es un agente gelificante puede absorber hasta cien veces su peso en agua dando lugar a geles de gran viscosidad. El rango útil de pH del gel de carbopol es 4.5-9.0, perdiendo su capacidad de formar geles por encima de 9.0.



Figura J. Formulación liposomal de sirólimus al 0,4%.

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD QUÍMICA

Para evaluar la estabilidad química de sirólimus en las cuatro formulaciones estudiadas, se implementaron diversos métodos de extracción, adaptados a cada formulación, junto con un método cromatográfico para la cuantificación del sirólimus.

EQUIPO

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent Technologies 1100 (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Karlsruhe, Alemania) equipado con una bomba cuaternaria, un detector de matriz de diodos con detección ultravioleta-visible, un compartimento de columna termostatzado, un inyector automático y un ordenador HP Compaq con el software Chemstation para LC 3D de Agilent Technologies.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Se empleó una columna de fase reversa C18 Kromasil® con unas dimensiones de 150 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno, y 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla de acetonitrilo y agua en una proporción de 75:25 (v:v). El flujo de la fase móvil se mantuvo constante a 1 ml/min, y se inyectó un volumen de muestra de 10 µL para cada análisis. La columna fue sometida a una temperatura de 50°C y el tiempo total de análisis fue de 15 minutos por muestra. La longitud de onda establecida para la detección del sirólimus fue 280 nm.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Se desarrolló un método basado en cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta/visible (HPLC-UV/Vis) y se validó conforme a las directrices establecidas por ICHQ2R1 (International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures) (45). En función del método de extracción de sirólimus de la formulación, las matrices de las muestras a analizar por HPLC fueron diferentes, por lo que se llevó a cabo una validación del método cromatográfico para las muestras obtenidas de las formulaciones pomada, emulsión y gel y otra validación para las muestras de la formulación liposomal. En el primer caso la matriz fue una mezcla compuesta por acetonitrilo, hexano y agua para inyección (API) y en el segundo, metanol (dilución 1/20).

Los parámetros a validar fueron linealidad, especificidad, exactitud, precisión del método, precisión intermedia, límite de detección (LD) y cuantificación (LC). Para ello se prepararon por duplicado 6 disoluciones patrón de sirólimus de concentración creciente (0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,125 y 0,15 mg/ml) en la matriz correspondiente.

Linealidad: se representó gráficamente la absorbancia medida (eje y), a partir del área de pico de sirólimus de los patrones obtenido del cromatograma, versus la concentración de sirólimus (eje x) y se determinó el coeficiente de correlación (r), la ordenada en el origen y la pendiente de la línea de regresión.

Especificidad: se evaluó la presencia de interferencias en el tiempo de retención de sirólimus.

Exactitud (% recuperación): se determinó por el método de adiciones estándar, añadiendo una cantidad conocida de sirólimus (0%, 50%, 100%, 150%) a una muestra de sirólimus de concentración conocida. Se calculó el porcentaje de recuperación.

Precisión del método (repetibilidad): se analizaron tres disoluciones patrón de sirólimus de diferente concentración (0,025, 0,075, y 0,15 mg/ml) seis veces y se calculó la desviación estándar relativa para cada concentración.

Precisión intermedia (reproducibilidad): la precisión intra-día se determinó analizando tres disoluciones patrón de sirólimus de concentración diferente (0,025, 0,075, y 0,15 mg/ml) tres veces en un mismo día, y la precisión inter-día, analizando las tres disoluciones durante 5 días.

Límite de detección y límite de cuantificación: se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones, $LD = 3 \cdot \sigma / S$ y $LC = 10 \cdot \sigma / S$, siendo σ la desviación estándar de la ordenada en el origen de la línea de regresión y S , la pendiente.

Este proceso de validación garantiza la robustez y fiabilidad de los métodos analíticos empleados en el estudio, proporcionando así una base sólida para la interpretación de los resultados obtenidos (Figuras K y L).

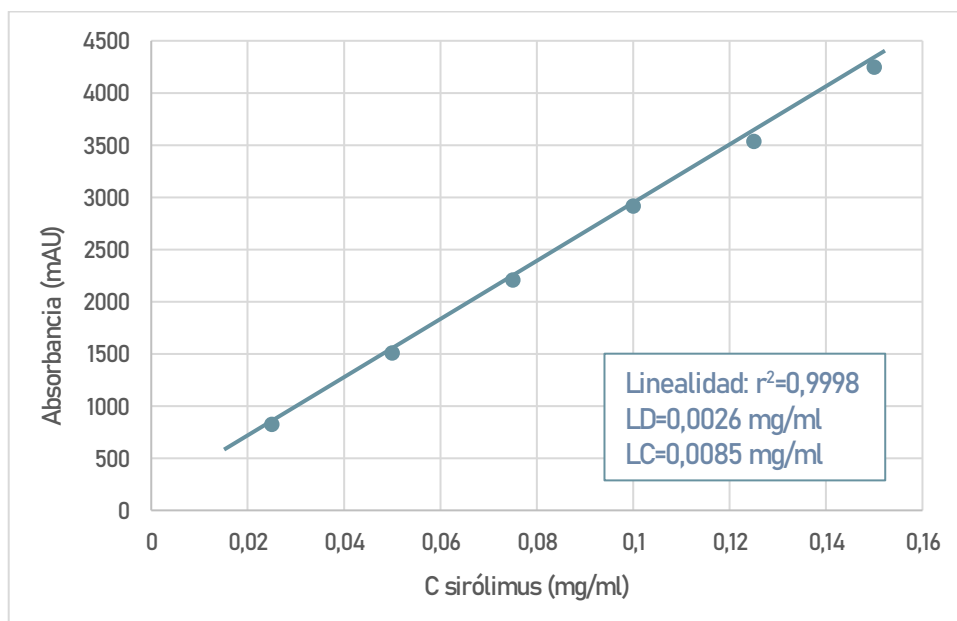


Figura K. Recta de calibrado: pomada, emulsión y gel.

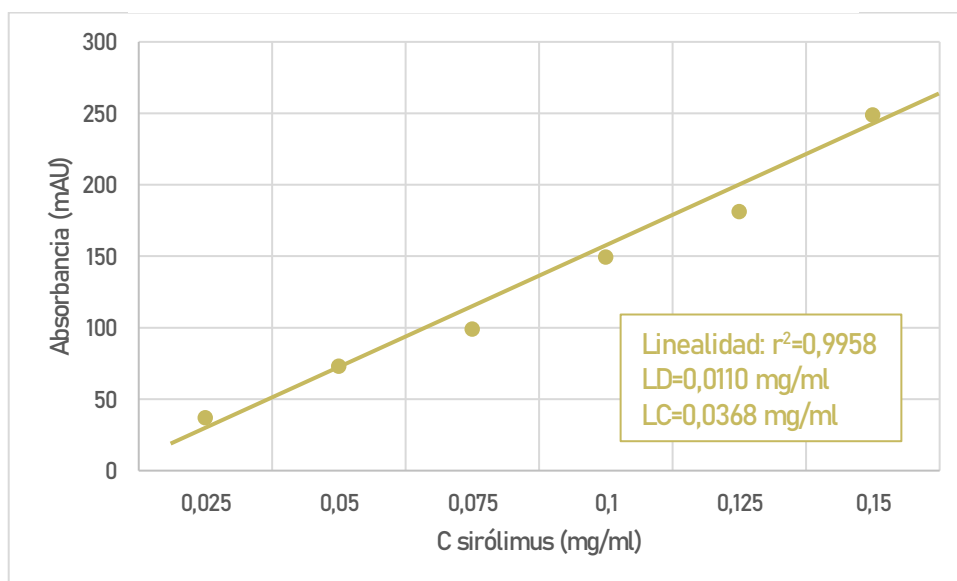


Figura L. Recta de calibrado: liposomas.

EXTRACCIÓN DE SIRÓLIMUS

Para la extracción del sirólimus a partir de la pomada, la emulsión y el gel, se introdujeron 0,100 g de formulación en un tubo de vidrio con 4 ml de una mezcla de acetonitrilo, hexano y API y se agitaron en el vórtex durante 10 segundos. A continuación, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante resultante y se tomaron alícuotas de 1 ml para análisis por HPLC. Para la extracción del sirólimus de los liposomas se introdujeron 0,100 g de formulación en un tubo de vidrio con 4 ml de metanol. Las muestras se agitaron en el vórtex durante 10 segundos, se pipetearon alícuotas de 50 μ l y después de una dilución 1/20 con metanol se analizaron con el método HPLC. La dilución se realizó para evitar que los liposomas dañaran la columna del cromatógrafo. Todas las extracciones de sirólimus se realizaron a temperatura ambiente de 23°C y 65% de humedad relativa del aire (Figura M).

CUANTIFICACIÓN DE SIRÓLIMUS

Siguiendo el método de extracción de sirólimus en función de la formulación, se tomaron muestras por triplicado de cada formulación a diferentes tiempos (t) = 0, 2, 7, 14, 21, 28, 42 y 56 días. Del análisis cromatográfico de cada muestra, se midió la absorbancia de sirólimus a partir del área del pico e interpolando en la recta de regresión se determinó la concentración de sirólimus. A partir de la concentración se calculó la cantidad de sirólimus por cantidad de formulación pesada (Q, mg/g) y el contenido porcentual de sirólimus remanente (%CR).

El parámetro T_{90} fue el criterio de estabilidad química correspondiendo al tiempo después del cual el %CR es inferior o igual al 90%.

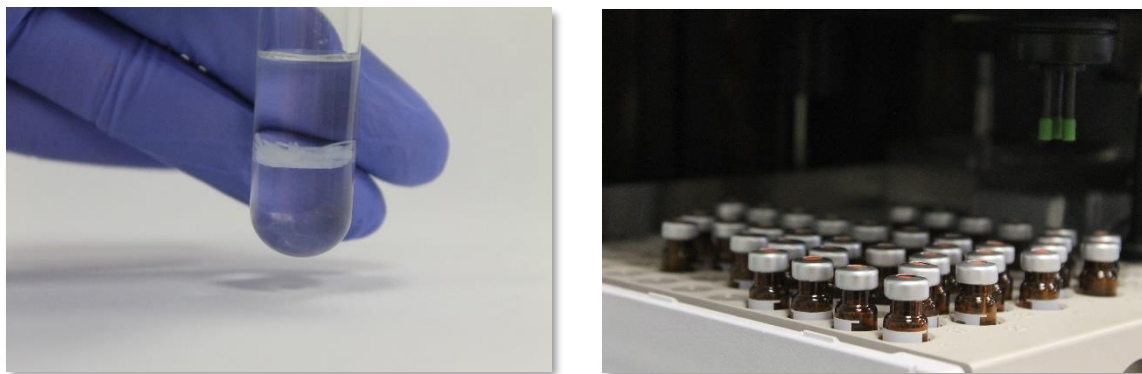


Figura M. Extracción a partir de las formulaciones y análisis de sirólimus por HPLC.

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD FÍSICA

Todos los procedimientos pertinentes para establecer la estabilidad física de las formulaciones se realizaron siguiendo las especificaciones del Formulario Nacional de Medicamentos (46) y la Guía de Buenas Prácticas en la Preparación de Medicamentos en los Servicios de Farmacia Hospitalaria (47).

Se evaluaron sobre superficie transparente las propiedades galénicas de uniformidad, extensibilidad, ausencia de cristales y ausencia de separaciones de fases durante los tiempos (t) = 0, 2, 7, 14, 21, 28, 42 y 56 días para cada formulación. Se establecieron 3 niveles para cada propiedad siendo el nivel 1, el menos favorable, y nivel 3, el más favorable.

CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS

Con el fin de confirmar la formación de los liposomas y establecer su morfología se obtuvieron el tamaño medio de partícula, el índice de polidispersión (Pdl), el potencial Z y la eficiencia de encapsulación (EE%) por triplicado a tiempo (t) = 0 días. Para el desarrollo de estas investigaciones fue necesaria la colaboración del Instituto Universitario de Ciencia de los Materiales de la Universidad de Valencia.

El tamaño medio de partícula, el Pdl y el potencial Z se determinaron mediante una técnica por espectroscopía de difracción de luz láser conocida como “Dynamic Light Scattering” (DLS) utilizando un Zetasizer nano-S (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

El Pdl es la medida de la distribución de los tamaños de las partículas presentes en una suspensión. Se considera que una formulación es monodispersa y homogénea cuando presenta una polidispersión menor o igual a 0,2.

La importancia del potencial Z radica en que su valor condiciona la estabilidad de una formulación. Las suspensiones logran estabilidad eléctrica cuando poseen un potencial Z tanto negativo como positivo de alta magnitud. En contraste, aquellas con un bajo potencial Z tienden a sufrir coagulación o floculación, lo que compromete su estabilidad física. En términos generales, un alto potencial Z en una suspensión indica que las fuerzas de repulsión entre partículas superan a las fuerzas de atracción, contribuyendo así a un sistema más estable.

La EE% se determinó mediante ultrafiltración, utilizando filtros de ultracentrifugación Amicon® (Merck Millipore, Irlanda) con un límite de peso molecular de 10.000 Daltons. Se añadió una alícuota de 500 µl de la formulación liposomal al depósito de muestra del filtro y se centrifugó durante 15 minutos a 14.000 g. Posteriormente se alicuotaron 50 µL del filtrado por duplicado y, después de una dilución 1/20 con metanol, se analizaron mediante HPLC para determinar la concentración de fármaco libre. Para los cálculos de la capacidad de encapsulación se utilizó la siguiente ecuación (48) (49):

$$EE\% = \frac{W_t - W_f}{W_t} \times 100$$

Donde W_t y W_f representan la cantidad total del fármaco y la cantidad libre del fármaco, respectivamente.

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA

Se tomaron muestras por duplicado de cada formulación a t=28 y 56 días y se incubaron en agar sangre a 37°C, según las instrucciones de control microbiológico del Formulario Nacional. Para el desarrollo de estas investigaciones fue necesaria la colaboración e implicación del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

FASE III: EVALUACIÓN CLÍNICA

DISEÑO Y DESARROLLO

La fase de evaluación clínica corresponde a un estudio observacional, prospectivo, longitudinal y multicéntrico con el objetivo de evaluar la efectividad y la seguridad del sirólimus tópico liposomal al 0,4% en pacientes con AF asociados a ET según práctica clínica habitual. El periodo de estudio durante el que se reclutaron los pacientes fue entre diciembre de 2021 y octubre de 2023. Los centros participantes fueron el Hospital Universitario Doctor Peset y el Hospital Clínico Universitario de Valencia, España. Asimismo, los servicios clínicos implicados fueron el Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Doctor Peset y los Servicios de Dermatología de ambos hospitales.

DESCRIPCIÓN Y FASES

El estudio clínico se dividió en tres fases: selección, tratamiento y seguimiento. Las evaluaciones llevadas a cabo en cada fase pueden consultarse en la Figura N.

Fase de selección

Se evaluó la idoneidad de los participantes para su inclusión en el estudio. Se obtuvo el consentimiento informado y se recopilaron datos demográficos, antecedentes médicos y medicamentos concomitantes de los pacientes.

Fase de tratamiento

La fase de tratamiento consistió en una visita clínica al inicio (V_0) y tres visitas posteriores donde se evaluó la efectividad y la seguridad después de 2, 12 y 24 semanas de tratamiento con la formulación liposomal de sirólimus tópico al 0,4% (P_1 , V_2 y V_3). La posología fue de tres veces por semana, preferiblemente por la tarde o la noche. La cantidad de formulación necesaria para producir una fina capa confluyente sobre la piel fue de 6 mg/cm^2 y se basó en el tamaño del área afectada. Se retiró completamente cualquier resto de formulación después de 2 o 3 horas de exposición mediante lavado con agua y jabón neutro. Se recomendó hidratar bien la zona y usar fotoprotección total durante todo el año. Los pacientes que interrumpieron prematuramente el tratamiento fueron sometidos a una visita (V_x) en la que se evaluó la efectividad y seguridad.

Fase de seguimiento

Se realizó una visita de seguimiento (P_4) para evaluar la seguridad cuatro semanas después de la visita V_3 o bien cuatro semanas después de V_x .



Figura N. Fases del estudio clínico.

V_0 , V_2 , V_3 y V_x : visitas presenciales. P_1 y P_4 : visitas telefónicas.

CI: Consentimiento Informado, FASI: Facial Angiofibromas Severity Index, IGA: Investigator's Global Assessment, DLQI: Dermatology Life Quality Index, VCS: valoración clínica subjetiva, EAs: eventos adversos, Hema: pruebas hematológicas, Fcc: niveles sanguíneos de sirólimus.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Todos los pacientes incluidos en el estudio debían cumplir todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión.

Criterios de inclusión

- Pacientes con edades comprendidas entre 10 y 65 años en el momento en que se obtiene el consentimiento informado.
- Pacientes diagnosticados de ET que presenten lesiones cutáneas visibles compatibles con AF.
- Puntuación FASI de al menos 3 y no superior a 8.
- Puntuación IGA de al menos 2 y no mayor a 4.

Criterios de exclusión

- Pacientes que hayan estado en tratamiento con algún inhibidor de mTOR (sirólimus, tacrólimus, temsirólimus) en los 3 meses anteriores a la selección por cualquier vía de administración.
- Pacientes con terapia láser o quirúrgica en los 6 meses previos a la selección.
- Pacientes con lesiones cutáneas graves como erosiones o úlceras.
- Pacientes con hipersensibilidad conocida a cualquier componente o excipiente.
- Pacientes con disfunción inmune o que reciban cualquier terapia inmunosupresora.
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD

ESCALAS DE EVALUACIÓN OBJETIVA DE LOS ANGIOFIBROMAS FACIALES

La mayoría de los estudios que encontramos en la literatura evalúan la efectividad del sirólimus tópico mediante la evaluación subjetiva según la opinión del investigador, por ejemplo, a través de fotografías. No obstante, también existen métodos validados que permiten una evaluación objetiva de la severidad de los angiofibromas: las escalas FASI (Facial Angiofibromas Severity Index) e IGA (Investigator's Global Assessment).

ESCALA FASI

La escala FASI es una herramienta simple y reproducible que otorga una puntuación al paciente en función de la severidad de los AF (50). Es una escala específica para ET, que permite calcular un índice sumando las puntuaciones individuales asignadas a tres características consideradas relevantes para evaluar la afectación facial: eritema, tamaño y extensión de las lesiones. En la Figura 0 se presentan imágenes clínicas junto con las puntuaciones correspondientes. El eritema y el tamaño de las lesiones se califican en una escala del 0 al 3, mientras que la extensión tiene un mayor peso (2-3) debido a su importancia para estimar la gravedad. En casos en los que un mismo paciente presenta lesiones de diferentes grados de severidad, se consideran las puntuaciones de las lesiones predominantes. En definitiva, se establecen tres niveles de severidad facial: leve, moderada y grave, con rangos de puntuación de ≤ 5 , 6-7 y ≥ 8 , respectivamente.

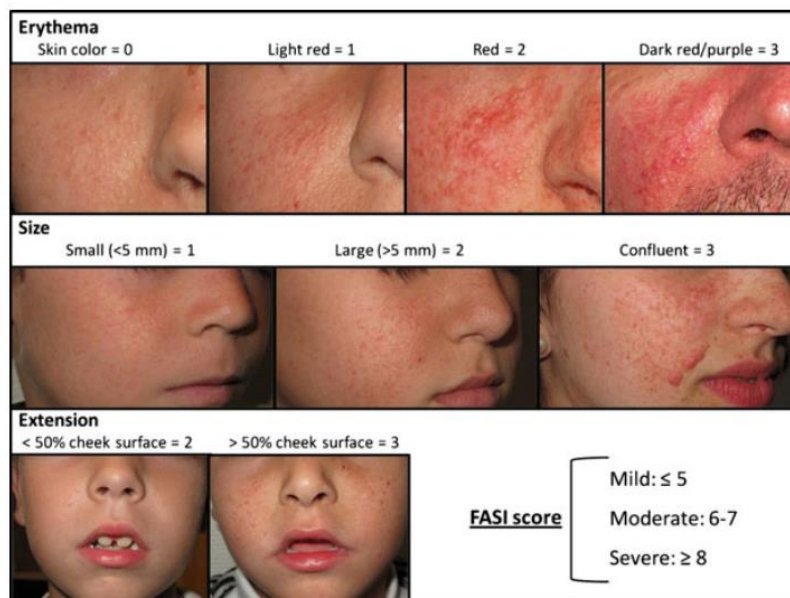


Figura 0. Escala FASI de valoración objetiva de los angiofibromas faciales.

ESCALA IGA

La escala IGA no es específica de ET y es utilizada en diversas patologías dermatológicas como la psoriasis o la dermatitis atópica. En la literatura encontramos una variante de esta escala adaptada a las características de los AF que ha sido utilizada en algunos estudios para evaluar de manera objetiva la efectividad del tratamiento con sirólimus tópico. La escala IGA establece 5 niveles de severidad: de 0 a 4, siendo el nivel 4 el de mayor gravedad en los AF estudiados (25).

CUESTIONARIO DE CALIDAD DE VIDA

La satisfacción de los pacientes y la mejora en la calidad de vida representan un aspecto muy relevante en este tipo de estudios. Los AF aparecen en edades tempranas y constituyen un problema serio de autoimagen especialmente en los pacientes adolescentes (7) (8).

El cuestionario de calidad de vida DLQI (Dermatology Life Quality Index) se utiliza en la práctica habitual y en los ensayos clínicos para evaluar el impacto de los síntomas de las enfermedades dermatológicas y de los tratamientos en la calidad de vida de los pacientes (51). El cuestionario se compone de 10 preguntas con cuatro respuestas alternativas: “muchísimo”, “mucho”, “un poco”, o “en absoluto” con las puntuaciones correspondientes de 3, 2, 1 y 0 puntos, respectivamente. El DLQI se calcula sumando la puntuación de cada pregunta, lo que da como resultado un máximo de 30 y un mínimo de 0 puntos. Cuanto menor sea la puntuación, mayor será la calidad de vida del paciente.

El cuestionario DLQI tiene diferentes versiones según la patología evaluada; para este estudio en particular se ajustó el contenido de las preguntas para abordar los síntomas específicos de los AF, tales como sangrado, eritema, escozor, así como también se consideró el contexto psicosocial asociado a esta enfermedad (Anexo F).

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD

Además de reportar los eventos adversos asociados al tratamiento con sirólimus tópico, estudios previos examinaron la seguridad mediante análisis de laboratorio, como pruebas de hematología o farmacocinética. En la fase clínica, todas estas pruebas se llevaron a cabo utilizando el equipo analizador Abbott Architect®, Abbott Park, IL, USA.

HEMOGRAMA

Debido a sus propiedades inmunosupresoras y de inhibición de la vía mTOR, la acción farmacológica del sirólimus bloquea el ciclo celular de los linfocitos T. Así, el control hematológico a través del recuento de las plaquetas, la serie roja y en especial la cuantificación de la serie blanca por citometría de flujo tiene especial interés y aporta un control adicional a la evaluación de la seguridad de la terapia tópica (40) (41).

FARMACOCINÉTICA

La determinación de niveles sanguíneos se realizó con el fin de garantizar la no absorción sistémica y paso al torrente sanguíneo del sirólimus tras la aplicación tópica. Diferentes estudios evalúan la seguridad a través de los niveles sanguíneos de sirólimus y la mayoría de ellos muestran concentraciones indetectables o que oscilan entre 0,5 y 0,8 ng/ml, lo cual está considerablemente por debajo del umbral necesario para producir un efecto inmunosupresor (2,6 ng/ml) (52) (53).

La determinación cuantitativa del sirólimus en sangre entera se realizó a través de un inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas en el autoanalizador Architect®. Previo al análisis, se llevó a cabo un pretratamiento de las muestras (150 µl) con un reactivo precipitante (300 µl), seguido de incubación (10 minutos a 42°C) y centrifugación (5 minutos a 10.900 rpm). El límite de detección de la técnica fue de 0,3 ng/ml.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables al inicio del estudio, las variables continuas se expresaron como medias y desviaciones estándar y las variables cualitativas como frecuencias absolutas, porcentajes y proporciones. El análisis estadístico se realizó utilizando la aproximación análisis por intención de tratar (AIT). Todos los pacientes que participaron en el estudio fueron incluidos en el análisis, independientemente de la cumplimentación del tratamiento o la existencia de desviaciones en el protocolo de estudio. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para estudiar la normalidad de los datos. Debido a la distribución no-normal de las variables, se realizó una transformación logarítmica, si bien no fue efectiva para la totalidad de las variables del estudio. Finalmente, los resultados se analizaron mediante tests no paramétricos, utilizando la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas. Las variables se expresaron como medianas y rangos intercuartílicos (IQR) en los resultados de las pruebas no paramétricas. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor p fue menor de 0,05. Para procesar los datos se utilizó el aplicativo estadístico Stata® 13.1.

CAPÍTULO PRIMERO

CAPÍTULO PRIMERO

FASE I: REVISIÓN SISTEMÁTICA

TOPICAL RAPAMYCIN IN THE TREATMENT OF FACIAL ANGIOFIBROMAS IN TUBEROUS SCLEROSIS: A SYSTEMATIC REVIEW BASED ON EVIDENCE

Cortell Fuster, Clara¹; Martínez Gómez, María Amparo¹; Cercós Lletí, Ana Cristina¹; Climente Martí, Mónica¹

¹Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia. Spain

Journal of Dermatological Treatment, 2022 Jun;33(4):1804–1810.

DOI: 10.1080/09546634.2021.1905768

ABSTRACT

Introduction: facial angiofibromas of tuberous sclerosis are the most prevalent cutaneous manifestation, affecting 80% of patients, which cause facial lesions with negative psychosocial consequences. Newly, topical rapamycin has been established as an effective and safe therapy for this skin condition.

Purpose: to analyze the available scientific evidence about the effectiveness and safety of topical sirolimus in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis.

Methods: a literature search was conducted in PubMed and Cochrane. Effectiveness and safety were analysed along with the main characteristics of each formulation in all included studies.

Results: thirty studies were included involving a total of 508 patients, developed in the last 20 years. Four randomized clinical trial, 17 case series and 9 single case reports were founded. Multiple topical rapamycin concentrations (0.003%-1%) and formulations (gel, ointment, solution) were found in literature. Rapamycin demonstrated its effectiveness in all studies included, except for 5 patients in a 1b study. Rapamycin was shown to be safe for the treatment of facial angiofibromas.

Conclusions: Topical sirolimus can be considered an effective and safety option for the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis. However, further long-term studies need to establish an evidence-based therapeutic protocol.

INTRODUCTION

Tuberous sclerosis (TS) is a rare disease with an incidence of 1 in 6,000 to 1 in 10,000 individuals (1). Genetically, it is an autosomal dominant inherited disease with variable expression, caused by the inactivation of either of two tumor suppressor genes: TSC1 or TSC2(2) (located on chromosome 9 and 16, respectively). These genes encode the hamartin and tuberlin proteins which form an important heterodimer (TSC1-TSC2 complex) (3) key to regulating cell proliferation and differentiation of the mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway. All of these mechanisms translate into the multisystem formation of benign non-invasive tumors, called hamartoma and distributed in tissues and organs such as: brain, kidneys, lungs, heart, eyes and skin. These anatomo-clinical manifestations were first published by Bourneville in 1880 (4). For this reason, Bourneville disease is a TS synonym.

The most prevalent skin condition in TS are facial angiofibromas (FA), which occur in up to 80% of patients (5) and they are one of the main criteria for diagnosis. FA appear between 2 and 5 years of age, and grow in number and size stabilizing in adolescence (2). The visual impact of facial injuries, with the aesthetic and psychological problem that they entail (6)(7), has motivated the use of multiple treatments to improve the quality of life of patients (8). Physical treatment includes radiofrequency, electrocoagulation, cryotherapy, dermabrasion and laser therapy (3,9). The main problem with these techniques is that are invasive and painful, and require anesthesia. Tranilast or podofilotoxin has been used as a pharmacological treatment, but recent publications place rapamycin (sirolimus) as the most appropriate pharmacological alternative, based on favourable data of effectiveness and safety (5).

Rapamycin is a potent m-TOR inhibitor and has immunosuppressive, antitumor and antiangiogenic properties, which was first developed in the 1990s (10). Several studies have shown the improvement of FA after post-renal immunosuppressive therapy with oral rapamycin (11-13). According to these experiences, topical therapy was raised, because prevented the patient's systemic exposure to drug. The first experience in topical rapamycin treatment was in 2010 by Haemel et al (14), and reported an improvement in FA after 12 weeks with 1% rapamycin. The effectiveness of topical sirolimus has been evaluated mostly by the subjective investigator evaluation (15,16). Salido-Vallejo in 2014 assessed the effectiveness with a standardized scale: Facial Angiofibromas Severity Index: FASI score (17), scoring facial injuries based on erythema, size and extension. However, there is not a commercially available formulation, and the risk-benefit profile has not been thoroughly investigated. In addition, rapamycin was added to NIOSH list as a hazardous drug in 2014 (18), which results in greater control in the development of topical formulations. The objective of this systematic review is to analyse the available scientific evidence about the use of topical rapamycin in the treatment of FA in TS.

METHODS

A retrospective review was conducted to identify clinical studies involved in the evaluation of effectiveness and safety around the use of topical rapamycin for FA in TS. Publications were identified in PubMed's MEDLINE and Cochrane databases from January 2000 to December 2020. Last search date: 01/19/2021. Key search words (included in MeSH terms) (19) 'rapamycin', 'sirolimus', 'rapamune', 'angiofibroma', 'dermatofibroma' and 'tuberous sclerosis' were used. E-search strategy for PubMed database was ("sirolimus"[tiab] OR "rapamycin"[tiab] OR "rapamune"[tiab]) AND ("angiofibroma"[All Fields] OR "dermatofibroma"[All Fields]) AND "tuberous sclerosis"[All Fields] AND ("2000/01/01"[PDAT]:"2020/12/31"[PDAT])). The methods used for extracting data from publications were excel forms and reading studies. Inclusion criterion: clinical trials and case reports related to treatment with any topical formulation (concentration and vehicle) of rapamycin for FA in TS. Exclusion criteria: different diagnosis of FA in TS, non-topical rapamycin treatment, reviews, non-english language articles, letters to the editor, animal trials and full text not available. Level of evidence for each publication was established according to CEBM scale (Centre for Evidence-Based Medicine) of Oxford (20) (Table 1). For each study we analysed effectiveness (subjective improvement assessed by the investigator, quality-of-life questionnaires or FASI scale) and safety (adverse events, blood cell counts and rapamycin blood levels during treatment). To complete the studies description, we also described the number of patients (n), the concentration and vehicle used, the study design for

randomized clinical trials, another therapies associated with topical rapamycin treatment, posology and duration of treatment (weeks).

Table 1. Level of Evidence (CEBM scale, Oxford).

Recommendation degree	Level of Evidence	Type of study
A: extremely recommendable	1a	SR/MA of RCTs
	1b	Individual RCT (with a narrow confidence interval)
	1c	Clinical practice (all of them or none)
B: favorable recommendation	2a	SR/MA of cohort studies
	2b	Individual cohort study (including low quality RCT)
	2c	Outcomes research. Ecological studies
	3a	SR/MA or case-control studies
	3b	Individual case-control study
C: favorable but inconclusive recommendation	4	Case series (poor quality cohort and case-control studies)
D: neither recommended nor disapproved	5	Expert opinion

CEBM: Centre for Evidence-Based Medicine

RCT: Randomized Clinical Trial

SR: Systematic Review

MA: Meta-Analysis

RESULTS

A total of 66 publications were screened, 30 articles met the inclusion criterion and did not present any exclusion criteria, involving 508 patients (Figure 1). Among them, there were 4 randomized clinical trials (21-24), 17 case series (15,16,25-39) and 9 single case reports (14,40-47). Five studies combined topical rapamycin with other therapies: laser (33,42,47), electrosurgery (42), topical tacrolimus 0.03% (25) or calcitriol (24). In one patient oral rapamycin at 3mg daily was added to improve the efficacy of topical therapy (28). In the other 24 studies topical rapamycin was used as monotherapy (14-16,21-23,26,27,29-32,34-41,43-46) (Table 2). In addition, in three of them, patients were applied rapamycin in one area of the face and vehicle only in the other side (25,31,35).

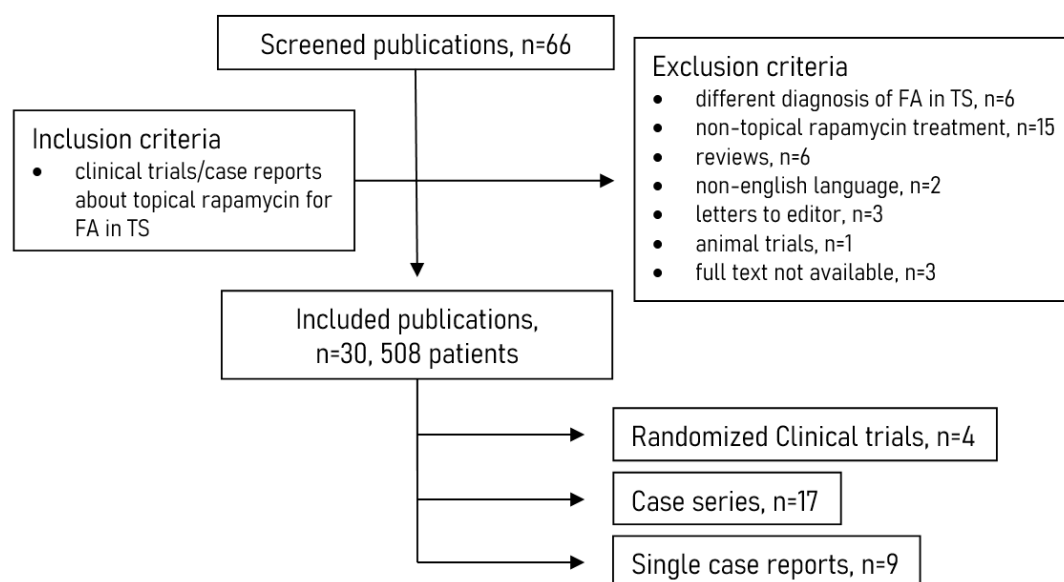


Figure 1. Studies selection.

Level of Evidence (CEBM scale)

After analysis of level of evidence according to CEBM scale, four studies with level 1b of evidence (individual randomized clinical trial with narrow Confidence Interval) were identified (21-24). The other studies were classified in level 4 of evidence (Case-series: poor quality cohort and case-control studies) (Table 1 and 2).

Concentrations

High variability was observed in concentrations chosen for topical formulations (from 0.003% to 1%).

With a total amount of 508 patients treated, the most prevalent concentration in literature was 0.1% (213 patients, 41.9%), followed by 0.2% (108 patients, 21.3%) and 1% (65 patients, 12.8%). The other concentrations (0.5%, 0.4%, 0.05%, 0.003% and 0.015%) were used as a group in 48 patients, 11.8%. 79 patients (15.6%) were treated with vehicle only (placebo effect) in randomized clinical trials. (Table 2).

Vehicle

Different excipients were used in the studies to formulate rapamycin. The ointment with lipophilic excipients was the first choice, corresponding to 212 patients, 41.7%, followed by gel (85 patients, 16.7%), commercially available creams: Skincerity[®], Eucerin[®] and Dexeryl[®] (25 patients, 4.9%), solution (5 patients, 1.0%) and ointment with hydrophilic excipients (2 patients, 0.4%). In 179 cases (35.2%) the vehicle was not defined. (Table 2).

Table 2. Systematic review of literature.

Year	Author	Evidence Level (CEBM)	N	Rapamycin Concentrations	Vehicle	Study Design (for RCT)	Another therapies associated	Posology	Duration of treatment (weeks)
2020	Hatano et al(39)	4	33	0.2%	Gel	-	None	Twice daily	12
2020	Chen et al (24)	1b	52	0.1%	Ointment	Rapamycin 0.1% vs rapamycin-calcitriol 0.1% vs calcitriol only	Topical calcitriol	Twice daily	24
2020	Okanishi et al (16)	4	9	0.2%	Gel	-	None	Twice daily	24
2019	Wheless et al (15)	4	11	0.1%	Ointment	-	None	Twice daily for 2 weeks and once daily	52
2018	Negosanti et al(47)	4	1	0.05%	Ointment	-	Laser	Twice daily	20
2018	Lee et al(38)	4	36	0.2%	Ointment	-	None	NR	26
2018	Koenig et al(23)	1b	179	0.1%; 1%	NR	0.1% vs 1% vs vehicle only	None	NR	24
2017	Amin et al(37)	4	14	0.1%	Ointment	-	None	Once daily	24
2017	Wang et al(36)	4	29	0.1%	Ointment	-	None	Twice daily	36
2017	Ebrahimi-fakhari et al(46)	4	1	0.1%	Ointment	-	None	Twice daily	164
2017	Wataya-Kaneda et al(22)	1b	36	0.05%; 0.1%; 0.2%	Gel	0.05% vs 0.1% vs 0.2% vs vehicle only	None	Twice daily	16
2017	Cinar et al(35)	4	12	0.1%	Ointment	-	None	Twice daily	24
2016	Schwartz et al(45)	4	1	0.1%	Ointment	-	None	Twice daily	NP

2015	Pynn et al(34)	4	2	0.1%	Ointment	-	None	Once daily	20-36
2014	Park et al(33)	4	4	0.1%	Ointment	-	Laser	Twice daily	48-84
2014	Tu et al(32)	4	19	0.1-1%	Ointment	-	None	Twice daily and three/four times per week	32-120
2014	Knöpfel et al(43)	4	1	0.2%	Ointment	-	None	Five times per week	48
2013	Tiedemann Svendsen et al(44)	4	1	0.4%	Ointment	-	None	Three times per week	24
2013	Bae-Harboe et al(42)	4	1	0.2%	Ointment	-	Laser and electrosurgery	NR	NP
2013	Tanaka et al(31)	4	11	0.2%	Gel and Ointment	-	None	Twice daily	12
2013	Wheless et al(30)	4	2	0.1%	Hydrophilic ointment	-	None	Twice daily and once daily	48
2012	Koenig et al(21)	1b	23	0.003%; 0.015%	Skincerity®	0,003% vs 0,015% vs vehicle only	None	Once daily (nightly)	24
2012	Foster et al(29)	4	4	0.1%	Ointment and Solution	-	None	Twice daily	24
2012	Truchuelo et al(41)	4	1	1%	Dexeryl®	-	None	Once daily	4
2012	Kaufman McNamara et al(28)	4	2	0.1%	Eucerin® and Solution	-	None	Once daily	12
2012	Salido et al(27)	4	10	0.4%	Ointment	-	None	Three times per week	36
2011	Mutizwa et al(26)	4	2	0.1%	Solution	-	None	Twice daily	10-23
2011	Wataya-Kaneda et al(25)	4	9	0.2%	Ointment	-	Topical tacrolimus	Twice daily	16
2011	Deklotz et al(40)	4	1	1%	Ointment	-	None	Twice daily	4
2010	Haemel et al(14)	4	1	1%	Ointment	-	None	Twice daily	12

CEBM: Centre for Evidence-Based Medicine
RCT: Randomized Clinical Trial
NR: Not reported

Posology

The most prevalent posology found in literature was: twice daily (133 patients, 46.9%), once daily (53 patients, 10.4%) and three times weekly (11 patients, 2.2%). In 179 cases (35.2%) posology was not reported. (Table 2).

Effectiveness

Rapamycin demonstrated its effectiveness in all studies included, except for 5 patients in a 1b study (21).

A subjective evaluation by investigator was applied in 355 patients, 69.9%. FASI score (153 patients, 30.1%) and another unvalidated scales (53 patients, 10.4%) were used to a lesser extent. In addition, three studies assessed the effectiveness with quality-of-life questionnaires for patients (23,37,39).

Only one of higher quality studies used FASI score for effectiveness assessment (24). The other three used quality-of-life questionnaires (23), and a subjective evaluation by investigator (21-23). (Table 3).

Safety

Adverse events

Rapamycin was shown to be safe for the treatment of FA. In only some patients did it cause dermatological side effects. Two serious adverse events was reported: pneumonia in the context of a seizure (21), and a septic shock by urinary tract infection (24), both required hospitalization. The relationship with topical treatment was dismissed in the first study (21), because rapamycin blood levels were undetectable. Two patients developed uncommon side effects: headache (28) and perioral dermatitis (32). Both disappeared after dose reduction of oral rapamycin and after antibiotic treatment, respectively. The most common adverse events in higher quality studies (21-24) were pruritus, erythema, pain and dry skin (Table 3).

Haematological tests

To provide more safety to topical rapamycin therapy, haematological tests of thrombocytes, lymphocytes and red blood cells counts were performed in some studies (63 patients, 12.4%) (14,21,22,28,41). These tests were normal in all cases, with no altered laboratory parameters in patients. (Table 3).

Rapamycin blood levels

To ensure systemic non-absorption, rapamycin blood levels was performed in 343 patients, 67.5% of all patients (14,21-23,25-27,29-33,36,41,44,46).

Rapamycin serum concentrations were undetectable (<1.0 ng/mL) in 340 patients (99.1%), and 79 of these patients belonged to the groups treated with vehicle only (placebo). In three cases rapamycin blood levels were detectable with concentrations between 0.5 and 0.8 mcg/L (29,32). (Table 3).

Table 3. Systematic review of literature (2).

Year	Author	Effectiveness	Adverse Events	Rapamycin blood levels	Haematological tests
2020	Hatano et al(39)	Unvalidated scale and SF-36: improvement	4/33 acne, 3/33 irritation, 3/33 dry skin, 2/33 pruritus	NP	NP
2020	Chen et al (24)	FASI score: improvement	1/52 septic shock by urinary tract infection (SAE)	NP	NP
2020	Okanishi et al (16)	SEI: improvement	1/9 Acne	NP	NP
2019	Wheless et al (15)	SEI: improvement	None	Yes: undetectable	NP
2018	Negosanti et al(47)	SEI: improvement	None	NP	NP
2018	Lee et al(38)	FASI score: improvement	3/36 erythema	NP	NP
2018	Koenig et al(23)	SEI and DLQI : improvement.	54/179 pruritus, erythema, pain	Yes: undetectable	NP
2017	Amin et al(37)	SEI, PedsQL and SF-36: improvement.	1/14 erythema	NP	NP
2017	Wang et al(36)	SEI: improvement	None	Yes: undetectable	NP
2017	Ebrahimi-fakhari et al(46)	SEI: improvement	None	Yes: undetectable	NP

2017	Wataya-Kaneda et al(22)	SEI: improvement	15/36 dry skin, erythema	Yes: undetectable	Yes: normal
2017	Cinar et al(35)	FASI score: improvement	3/12 erythema	NP	NP
2016	Schwartz et al(45)	SEI: improvement	none	NP	NP
2015	Pynn et al(34)	SEI: improvement	1/2 pruritus	NP	NP
2014	Park et al(33)	SEI: improvement	None	Yes: undetectable	NP
2014	Tu et al(32)	SEI: improvement	1/19 erythema, 1/19 perioral dermatitis.	Detectable in 2 patients (0,5 y 0,8 mcg/L)	NP
2014	Knöpfel et al(43)	SEI: improvement	None	NP	NP
2013	Tiedemann Svendsen et al(44)	SEI: improvement	None	Yes: undetectable	NP
2013	Bae-Harboe et al(42)	SEI: improvement	none	NP	NP
2013	Tanaka et al(31)	Unvalidated scale: improvement	None	Yes: undetectable	NP
2013	Wheless et al(30)	SEI: improvement	None	Yes: undetectable	NP
2012	Koenig et al(21)	SEI: improvement	1/23 pneumonia (SAE)	Yes: undetectable	Yes: normal
2012	Foster et al(29)	SEI: improvement	2/4 erythema (rapamycin solution)	Detectable in 1 patient (0,8 mcg/L)	NP

2012	Truchuelo et al(41)	SEI: improvement	None	Yes: undetectable	Yes: normal
2012	Kaufman McNamara et al(28)	SEI: improvement	1/2 headache	NP	Yes: normal
2012	Salido et al(27)	SEI: improvement	None	Yes: undetectable	NP
2011	Mutizwa et al(26)	SEI: improvement	2/2 erythema	Yes: undetectable	NP
2011	Wataya-Kaneda et al(25)	Unvalidated scale: improvement	None	Yes: undetectable	NP
2011	Deklotz et al(40)	SEI: improvement	None	NP	NP
2010	Haemel et al(14)	SEI: improvement	None	Yes: undetectable	Yes: normal

SEI: Subjective Evaluation by Investigator

FASI: Facial Angiofibroma Severity Index

DLQI: Dermatology Life Quality Index

PedsQL: Pediatric Quality of Life Inventory

SF-36: Short Form 36 Health Survey Questionnaire

SAE: Serious Adverse Event

NP: Not performed

DISCUSSION

The search for mTOR inhibitors for the treatment of FA has placed rapamycin as standard therapy ensuring effectiveness and safety in different studies. Topical rapamycin has even been shown to be more effective than another mTOR inhibitor (tacrolimus) (25), confirming its eligibility in TS.

The result of the current systematic review offers little literature: just 30 articles evaluating topical rapamycin therapy for FA in TS were included, of which only four corresponds to randomized clinical trials and the rest are case series or single case reports. This point limits the scientific validity of the studies analysed as a whole, because most of them were classified in level 4 of evidence (recommendation C: favourable but inconclusive recommendation) according to CEBM scale. In addition, high variability between studies in terms of concentration, vehicle, posology, duration of treatment and effectiveness assessment make it impossible to choose a formulation to treat this skin disease. (Table 2 and 3).

Studies that assess effectiveness subjectively predominate, according to the investigator's opinion. A minority of studies evaluate results with scores based on the severity of FA or quality-of-life questionnaires for patients. Specifically, FASI score to measure effectiveness is a simple, reproducible and validated tool for assessing the severity of FA and subsequent response to rapamycin treatment. Thus, this scale provides a more objective assessment (17), evaluating erythema, size and extension of FA.

Rapamycin has a favorable safety profile, as demonstrated in most studies. The incidence of skin adverse events is as expected based on the total number of patients considered (23) and usually disappear after the end of treatment. Several studies conducted blood cell counts and rapamycin blood levels because this molecule has an immunosuppressive mechanism. All haematological tests were normal. In three patients rapamycin blood levels were detectable (0.5-0.8 mcg/L), far below the 2.6 mcg/L needed for immunosuppression (29).

Following these comments, we should consider patient satisfaction with topical therapy, including this point in effectiveness assessment. Different studies have included the assessment of quality of life and patient satisfaction as an important aspect in dermatological diseases, including TS. These authors explain the development and validation of various quality of life instruments, mostly in paediatric patients (8)(48-54).

Topical rapamycin is not a curative treatment, it has shown that FA reappear after withdrawal (46). Therefore, ensuring adherence is important in such long-lasting treatments. There are strategies that can help to improve adherence to treatment and guarantee greater effectiveness and less adverse events: an easier vehicle to apply that does not compromise the drug release into skin, gel vehicle for example (31); and a more spaced posology like three times per week (with higher concentration of rapamycin: 0.4%) are more comfortable for patients (2).

In conclusion, topical rapamycin can be considered an effective and safety treatment for FA in TS. It should be noted that this is a hazardous drug since 2014 and the use is off-label with an informed consent signed by patients. These characteristics position pharmacy services as

key elements in the elaboration of these formulations. Hospital pharmacists can conduct a clinical follow-up of patients, contributing to improve effectiveness and minimize adverse reactions. In parallel, more galenic, dermokinetic and clinical studies are needed to confirm which formulation is most appropriate to ensure effectiveness, safety and high patient satisfaction.

Limitations

The limitations of this review lie in the limited literature published for the treatment of FA in TS with mTOR inhibitors. Most of the jobs available include few patients, predominantly case reports. This makes it very difficult to establish an accurate, evidence-based therapeutic decision. Despite the small number of publications included (30), this article provides a completely updated review to date based on evidence, allowing support in therapeutic decisions for other authors and clinicians.

REFERENCES

- (1) Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet* 2008 Aug 23;372(9639):657-668.
- (2) Salido-Vallejo R, Garnacho-Saucedo G, Moreno-Gimenez JC. Current options for the treatment of facial angiofibromas. *Actas Dermosifiliogr* 2014 Jul-Aug;105(6):558-568.
- (3) Jozwiak S, Sadowski K, Kotulska K, Schwartz RA. Topical Use of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitors in Tuberous Sclerosis Complex-A Comprehensive Review of the Literature. *Pediatr Neurol* 2016 Aug;61:21-27.
- (4) Narayanan V. Tuberous sclerosis complex: genetics to pathogenesis. *Pediatr Neurol* 2003 Nov;29(5):404-409.
- (5) Balestri R, Neri I, Patrizi A, Angileri L, Ricci L, Magnano M. Analysis of current data on the use of topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis complex. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015 Jan;29(1):14-20.
- (6) Rumsey N, Clarke A, White P. Exploring the psychosocial concerns of outpatients with disfiguring conditions. *J Wound Care* 2003 Jul;12(7):247-252.
- (7) Zweegers J, van der Vleuten CJ. The psychosocial impact of an infantile haemangioma on children and their parents. *Arch Dis Child* 2012 Oct;97(10):922-926.

(8) Patrick DL, Topolski TD, Edwards TC, Aspinall CL, Kapp-Simon KA, Rumsey NJ, et al. Measuring the quality of life of youth with facial differences. *Cleft Palate Craniofac J* 2007 Sep;44(5):538-547.

(9) Biondo G, Greco S, Mavilia L, Mercuri SR. Treatment of nodular facial angiofibromas in tuberous sclerosis, using ultrapulse carbon dioxide laser. *Clin Exp Dermatol* 2014 Aug;39(6):738-740.

(10) Leducq S, Giraudeau B, Tavernier E, Maruani A. Topical use of mammalian target of rapamycin inhibitors in dermatology: A systematic review with meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 2019 Mar;80(3):735-742.

(11) Hofbauer GF, Marcollo-Pini A, Corsenca A, Kistler AD, French LE, Wuthrich RP, et al. The mTOR inhibitor rapamycin significantly improves facial angiofibroma lesions in a patient with tuberous sclerosis. *Br J Dermatol* 2008 Aug;159(2):473-475.

(12) Tarasewicz A, Debska-Slizien A, Konopa J, Zdrojewski Z, Rutkowski B. Rapamycin as a therapy of choice after renal transplantation in a patient with tuberous sclerosis complex. *Transplant Proc* 2009 Nov;41(9):3677-3682.

(13) Micozkadioglu H, Koc Z, Ozelsancak R, Yildiz I. Rapamycin therapy for renal, brain, and skin lesions in a tuberous sclerosis patient. *Ren Fail* 2010;32(10):1233-1236.

(14) Haemel AK, O'Brian AL, Teng JM. Topical rapamycin: a novel approach to facial angiofibromas in tuberous sclerosis. *Arch Dermatol* 2010 Jul;146(7):715-718.

- (15) Wheless MC, Takwi AA, Almoazen H, Wheless JW. Long-Term Exposure and Safety of a Novel Topical Rapamycin Cream for the Treatment of Facial Angiofibromas in Tuberous Sclerosis Complex: Results From a Single-Center, Open-Label Trial. *Child Neurol Open* 2019 Apr 14;6:2329048X19835047.
- (16) Okanishi T, Fujimoto A, Enoki H, Ogai M. Early Sirolimus Gel Treatment May Diminish Angiofibromas and Prevent Angiofibroma Recurrence in Children With Tuberous Sclerosis Complex. *Front Med (Lausanne)* 2020 Jan 22;7:1.
- (17) Salido-Vallejo R, Ruano J, Garnacho-Saucedo G, Godoy-Gijon E, Llorca D, Gomez-Fernandez C, et al. Facial Angiofibroma Severity Index (FASI): reliability assessment of a new tool developed to measure severity and responsiveness to therapy in tuberous sclerosis-associated facial angiofibroma. *Clin Exp Dermatol* 2014 Dec;39(8):888-893.
- (18) Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH List of Antineoplastic and Other Hazardous Drugs in Healthcare Settings, 2014. Available in: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2014-138/pdfs/2014-138.pdf>. 2014; . Accessed 19/06, 2019.
- (19) U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894. MeSH Terms. Available in: <https://meshb.nlm.nih.gov/search>. 2018; . Accessed 06/19, 2019.
- (20) Howick, Jeremy. Centre for Evidence-Based Medicine (Oxford). Levels of Evidence, Oxford Centre for Evidence-based Medicine. March 2009. Available

in: <https://www.cebm.net/2009/06/oxford-centre-evidence-based-medicine-levels-evidence-march-2009/>. 2009; . Accessed 06/19, 2019.

(21) Koenig MK, Hebert AA, Roberson J, Samuels J, Slopis J, Woerner A, et al. Topical rapamycin therapy to alleviate the cutaneous manifestations of tuberous sclerosis complex: a double-blind, randomized, controlled trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied rapamycin. *Drugs R D* 2012 Sep 1;12(3):121-126.

(22) Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Tanaka M, Hayashi M, Matsumoto S, Yamamoto K, et al. Efficacy and Safety of Topical Sirolimus Therapy for Facial Angiofibromas in the Tuberous Sclerosis Complex : A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol* 2017 Jan 1;153(1):39-48.

(23) Koenig MK, Bell CS, Hebert AA, Roberson J, Samuels JA, Slopis JM, et al. Efficacy and Safety of Topical Rapamycin in Patients With Facial Angiofibromas Secondary to Tuberous Sclerosis Complex: The TREATMENT Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol* 2018 Jul 1;154(7):773-780.

(24) Chen PL, Hong JB, Shen LJ, Chen YT, Wang SJ, Liao YH. The efficacy and safety of topical rapamycin-calcitriol for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex: a prospective, double-blind, randomized clinical trial. *Br J Dermatol* 2020 Oct;183(4):655-663.

(25) Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I. A topical combination of rapamycin and tacrolimus for the treatment of angiofibroma due to tuberous sclerosis complex (TSC): a pilot study of nine Japanese patients with TSC of different disease severity. *Br J Dermatol* 2011 Oct;165(4):912-916.

- (26) Mutizwa MM, Berk DR, Anadkat MJ. Treatment of facial angiofibromas with topical application of oral rapamycin solution (1mg/mL(-1)) in two patients with tuberous sclerosis. *Br J Dermatol* 2011 Oct;165(4):922-923.
- (27) Salido R, Garnacho-Saucedo G, Cuevas-Asencio I, Ruano J, Galan-Gutierrez M, Velez A, et al. Sustained clinical effectiveness and favorable safety profile of topical sirolimus for tuberous sclerosis - associated facial angiofibroma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012 Oct;26(10):1315-1318.
- (28) Kaufman McNamara E, Curtis AR, Fleischer AB, Jr. Successful treatment of angiofibromata of tuberous sclerosis complex with rapamycin. *J Dermatolog Treat* 2012 Feb;23(1):46-48.
- (29) Foster RS, Bint LJ, Halbert AR. Topical 0.1% rapamycin for angiofibromas in paediatric patients with tuberous sclerosis: a pilot study of four patients. *Australas J Dermatol* 2012 Feb;53(1):52-56.
- (30) Wheless JW, Almoazen H. A novel topical rapamycin cream for the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2013 Jul;28(7):933-936.
- (31) Tanaka M, Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I. First left-right comparative study of topical rapamycin vs. vehicle for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex. *Br J Dermatol* 2013 Dec;169(6):1314-1318.
- (32) Tu J, Foster RS, Bint LJ, Halbert AR. Topical rapamycin for angiofibromas in paediatric patients with tuberous sclerosis: follow up of a pilot study and promising future directions. *Australas J Dermatol* 2014 Feb;55(1):63-69.

- (33) Park J, Yun SK, Cho YS, Song KH, Kim HU. Treatment of angiofibromas in tuberous sclerosis complex: the effect of topical rapamycin and concomitant laser therapy. *Dermatology* 2014;228(1):37-41.
- (34) Pynn EV, Collins J, Hunasehally PR, Hughes J. Successful topical rapamycin treatment for facial angiofibromata in two children. *Pediatr Dermatol* 2015 May-Jun;32(3):e120-3.
- (35) Cinar SL, Kartal D, Bayram AK, Canpolat M, Borlu M, Ferahbas A, et al. Topical sirolimus for the treatment of angiofibromas in tuberous sclerosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2017 Jan-Feb;83(1):27-32.
- (36) Wang S, Liu Y, Wei J, Zhang J, Wang Z, Xu Z. Tuberous Sclerosis Complex in 29 Children: Clinical and Genetic Analysis and Facial Angiofibroma Responses to Topical Sirolimus. *Pediatr Dermatol* 2017 Sep;34(5):572-577.
- (37) Amin S, Lux A, Khan A, O'Callaghan F. Sirolimus Ointment for Facial Angiofibromas in Individuals with Tuberous Sclerosis Complex. *Int Sch Res Notices* 2017 Nov 15;2017:8404378.
- (38) Lee YI, Lee JH, Kim DY, Chung KY, Shin JU. Comparative Effects of Topical 0.2% Sirolimus for Angiofibromas in Adults and Pediatric Patients with Tuberous Sclerosis Complex. *Dermatology* 2018;234(1-2):13-22.
- (39) Hatano T, Ohno Y, Imai Y, Moritake J, Endo K, Tamari M, et al. Improved health-related quality of life in patients treated with topical sirolimus for facial angiofibroma associated with tuberous sclerosis complex. *Orphanet J Rare Dis* 2020 Jun 1;15(1):133-020-01417-5.

- (40) DeKlotz CM, Ogram AE, Singh S, Dronavalli S, MacGregor JL. Dramatic improvement of facial angiofibromas in tuberous sclerosis with topical rapamycin: optimizing a treatment protocol. *Arch Dermatol* 2011 Sep;147(9):1116-1117.
- (41) Truchuelo T, Diaz-Ley B, Rios L, Alcantara J, Jaen P. Facial angiofibromas treated with topical rapamycin: an excellent choice with fast response. *Dermatol Online J* 2012 Jan 15;18(1):15.
- (42) Bae-Harboe YS, Geronemus RG. Targeted topical and combination laser surgery for the treatment of angiofibromas. *Lasers Surg Med* 2013 Nov;45(9):555-557.
- (43) Knopf N, Martin-Santiago A, Bauza A, Hervás JA. Topical 0.2% rapamycin to treat facial angiofibromas and hypomelanotic macules in tuberous sclerosis. *Actas Dermosifiliogr* 2014 Oct;105(8):802-803.
- (44) Tiedemann Svendsen M, Bygum A, Hansen LK, Broesby-Olsen S. Facial angiofibromas associated to tuberous sclerosis treated with topical sirolimus. *Ugeskr Laeger* 2013 Oct 21;175(43):2569-2570.
- (45) Schwartz RA. Facial angiofibromas of tuberous sclerosis treated with topical sirolimus in an Indian patient (commentary on article by Resham J. Vasani). *Dermatol Ther* 2016 Jan-Feb;29(1):70-71.
- (46) Ebrahimi-Fakhari D, Muller CSL, Meyer S, Flotats-Bastardas M, Vogt T, Pfohler C. Topical Rapamycin for Facial Angiofibromas in a Child with Tuberous Sclerosis Complex (TSC): A Case Report and Long-Term Follow-up. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2017 Mar;7(1):175-179.

- (47) Negosanti F, Tengattini V, Gurioli C, Neri I. Facial angiofibromas treated by rapamycin 0.05% ointment and a combined laser therapy. *J Cosmet Dermatol* 2018 Oct;17(5):762-765.
- (48) Crall C, Valle M, Kapur K, Dies KA, Liang MG, Sahin M, et al. Effect of Angiofibromas on Quality of Life and Access to Care in Tuberous Sclerosis Patients and Their Caregivers. *Pediatr Dermatol* 2016 Sep;33(5):518-525.
- (49) Lewis-Jones MS, Finlay AY. The Children's Dermatology Life Quality Index (CDLQI): initial validation and practical use. *Br J Dermatol* 1995 Jun;132(6):942-949.
- (50) Smidt AC, Lai JS, Cella D, Patel S, Mancini AJ, Chamlin SL. Development and validation of Skindex-Teen, a quality-of-life instrument for adolescents with skin disease. *Arch Dermatol* 2010 Aug;146(8):865-869.
- (51) Chamlin SL, Lai JS, Cella D, Frieden IJ, Williams ML, Mancini AJ, et al. Childhood Atopic Dermatitis Impact Scale: reliability, discriminative and concurrent validity, and responsiveness. *Arch Dermatol* 2007 Jun;143(6):768-772.
- (52) Brown MM, Chamlin SL, Smidt AC. Quality of life in pediatric dermatology. *Dermatol Clin* 2013 Apr;31(2):211-221.
- (53) Ramien ML, Ondrejchak S, Gendron R, Hatami A, McCuaig CC, Powell J, et al. Quality of life in pediatric patients before and after cosmetic camouflage of visible skin conditions. *J Am Acad Dermatol* 2014 Nov;71(5):935-940.

(54) Lilly E, Lu PD, Borovicka JH, Victorson D, Kwasny MJ, West DP, et al. Development and validation of a vitiligo-specific quality-of-life instrument (VitiQoL). *J Am Acad Dermatol* 2013 Jul;69(1):e11-8.

CAPÍTULO SEGUNDO

CAPÍTULO SEGUNDO

FASE II: OPTIMIZACIÓN GALÉNICA

OPTIMIZATION, FORMULATION AND STABILITY OF TOPICAL RAPAMYCIN USED FOR RARE TUBEROUS SCLEROSIS DISEASE: FROM OINTMENT TO LIPOSOMES

Cortell Fuster, Clara¹; Martínez Gómez, María Amparo¹; Cercós Lletí, Ana Cristina¹; Climente Martí, Mónica¹

¹Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia. Spain

Journal of Pharmaceutical Innovation

DOI: 10.1007/s12247-023-09792-9

ABSTRACT

Introduction: topical rapamycin has been established as an effective and safe therapy for facial angiofibromas in tuberous sclerosis. Different formulations have been tested for this skin disease, most using an ointment as a vehicle.

Purpose: to improve the classical formulation of topical rapamycin and to determine the validity period of the proposed options based on chemical, physical, and microbiological stability studies.

Methods: Four different 0.4% rapamycin formulations were prepared (ointment, emulsion, gel, and liposomes). The stability studies for each formulation over 56 days were as follows: (1) chemical: extraction with different solvents and high performance liquid chromatography assay; (2) physical: pH, uniformity, extensibility, absence of crystals, absence of phase separation, and only for liposomal formulation, particle size, zeta potential, and encapsulation efficiency were determined; and (3) microbiological: culture samples in blood-agar media.

Results: Only liposomes were chemically, physically, and microbiologically stable after 8 weeks. Ointment, emulsion, and gel formulations lost their chemical or physical stability before 56 days.

Conclusions: The authors describe four new formulations to improve the previous treatment for facial angiofibromas in tuberous sclerosis. The liposome-based formulation was the most appropriate according to chemical, physical, and microbiological stability studies. However, it

would be necessary to carry out clinical studies to ensure the effectiveness and safety of this formulation and also guarantee an improvement in the quality of life of patients.

INTRODUCTION

Tuberous sclerosis (TS) is an autosomal dominant rare disease, characterized by the multisystem formation of benign non-invasive tumors, called hamartomas and distributed in tissues and organs such as: brain, kidneys, lungs, heart, eyes, and skin (1). The most prevalent skin condition in TS are facial angiofibromas (FA), which occur due to an alteration of the mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway. These facial injuries imply an aesthetic and psychological problem (2,3) and sometimes, its treatment is not prioritized due to the existence of more serious complications associated with this rare disease.

Multiple treatments have been established for these patients. Physical treatments like radiofrequency, electrocoagulation, cryotherapy, dermabrasion, and laser therapy (4) are invasive and painful, and require anesthesia. The interest of mTOR inhibitors focuses pharmacological treatment on everolimus and sirolimus, and recent publications place topical rapamycin (sirolimus) as the most appropriate alternative (5).

We found multiple studies with topical rapamycin in the literature, including four randomized clinical trials (6-9) and all of them provide favorable data on effectiveness and safety. However, high variability between studies in terms of concentration, vehicle, posology, duration of treatment, and effectiveness assessment forces us to study several formulations to choose the most appropriate.

Several authors have studied different formulations other than the classic formulation (an ointment based on petrolatum) with the aim of achieving a better appearance and consistency of the formulation in order to improve patient compliance with treatment.

Bouguéon et al. (10) studied the physico-chemical stability of a cream formulation with a commercialized excipient called Excipial Hydrocrème®. Additionally, they used diethylene glycol monoethyl ether P (Transcutol®) as a vehicle and demonstrated that rapamycin was ten times more soluble in Transcutol® (fully soluble, 20.2 mg/mL) compared to liquid paraffin (<2 mg/mL). Guyader et al. (11) conducted a physico-chemical and microbiological stability study on a gel-type formulation. These authors also recommend the use of solubilizing agents such as transcutol in combination with gel-type formulations, since they have demonstrated improved permeation, penetration, and release. Ghanbarzadeh et al. formulated rapamycin integrated into a liposomal solution, explaining the methodology in development of rapamycin liposomes, and additionally studied their chemical stability using a validated high-performance liquid chromatography (HPLC) method (12,13).

Among all the concentrations and dosages reported in the literature, 0.4% concentration, three times per week, is interesting to avoid exposure to the drug every day and thus minimize possible cutaneous adverse events without compromising effectiveness (14,15).

In addition, the current legal regulations in Spain on magistral formulas establish that the validity period of non-typified magistral formulas corresponds to the full duration of the treatment (16). Secondly, the Guide to Good Practice of Preparation of Medications in Hospital

Pharmacy Services in Spain establishes a validity period of 30 days for ointments and creams, which can be increased if demonstrated with stability studies (17).

The purpose of this study is to improve the classic formulation of topical rapamycin for FA in TS and determine the validity period of the proposed formulations based on chemical, physical, and microbiological stability.

METHODS

Materials and reagents

Rapamycin powder (an active substance) was provided by Acofarma (Madrid, Spain). The rest of the excipients used in the preparation of the formulations were supplied by Guinama (Valencia, Spain). All reagents and solvents were provided by Scharlab (Valencia, Spain).

Formulation and preparation

Galenic optimization of the topical formulation of rapamycin at 0.4% based on its excipients was performed. The most widely used classical formulation in the literature is petrolatum as a vehicle. However, other options were formulated based on previous studies.

Four different formulations were developed in the biological safety cabinet, all of them with a rapamycin concentration of 0.4% and with differences in their excipients. The resulting formulations were: ointment, emulsion, gel, and liposomes (Table 1). Each formulation was packaged in a bottle protected from ambient light and stored in a cold room at $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Chemical stability

Equipment

An Agilent Technologies 1100 HPLC system (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Karlsruhe, Germany) with a quaternary pump, micro-vacuum degasser, autosampler, thermostated column compartment, diode array detector, and Agilent Technologies Chemstation for LC 3D Software was used for the analysis.

Table 1. Composition of rapamycin formulations.

Formulation	Component	Amount, mass basis.
Ointment	Rapamycin	0.4 %
	Transcutol®	10 %
	Lanolin	10 %
	Sheabutter	20 %
	Vitamin E	1 %
	Petrolatum	q.s. 20 g
Emulsion	Rapamycin	0.4 %
	Transcutol®	10 %
	W/O autoemulsifiable base	20 %
	WFI	q.s. 20 g
Gel	Rapamycin	0.4 %
	Transcutol®	10 %
	Hydroxypropyl methyl cellulose	2 %
	WFI	q.s. 20 g
Liposomes	Rapamycin	0.4 %
	Transcutol®	3 %
	Liposomal solution (Guinoxome®)	25 %
	Cholesterol	0.1 %
	Isopropile miristrate	10 %
	Propyleneglycol	10 %
	Carbopol	2 %
	NaOH 10%	q.s. pH 7.5
	WFI	q.s. 20 g

Q.s.: a sufficient quantity

WFI: water for injection

Chromatographic conditions

To determine the validity period of each formulation according to its chemical stability, an HPLC method was developed and validated. A C18 Kromasil column (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m) was used. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and water (75/25 v/v). The flow rate was 1 mL/min. The sample injection volume was 10 μ L and sample temperature was 25°C $\pm$ 3°C. The column temperature was 50°C and the analysis time was 15 min. Rapamycin detection was processed at 280 nm.

Method validation

The analytical methods were validated according to ICHQ2R1 (International Consensus on Harmonization, 2015) (18). Two calibration curves were developed: one using a mixture of acetonitrile, hexane, and water for injection (WFI) as a diluent (for the chemical stability of ointment, emulsion, and gel formulations), and the other using methanol (for the chemical stability of liposomes). The interday and intraday precision and accuracy of the methods were established using six concentration levels (0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, and 0.15 mg/mL) in duplicate on three different days. The least squares method was used to evaluate linearity, calculating a regression line between concentrations and peak areas of the chromatogram.

Rapamycin extraction

For the extraction of rapamycin from ointment, emulsion, and gel formulations, 0.1 g of cream was introduced in a glass tube with 4 mL of a mixture of acetonitrile, hexane, and WFI and kept in the vortex for 10 seconds. The samples were then centrifuged at 3500 rpm for 10

minutes. The resulting supernatant was removed, and 1 mL was aliquoted for HPLC analysis. For the extraction of rapamycin from liposomes, 0.100 g of cream was introduced in a glass tube with 4 mL of methanol. The samples kept in the vortex for 10 seconds, 50 μ L was aliquoted, and after 1/20 dilution with methanol, they were analyzed with the HPLC method.

Rapamycin degradation

Rapamycin quantity per weighed formulation quantity (Q, mg/g) and percentage content of remaining rapamycin (%RC) in each formulation were determined by triplicate at times (t) = 0, 2, 7, 14, 21, 28, 42, and 56 days. T_{90} was established when %CR was $\leq 90\%$.

Physical stability

All pertinent procedures to establish the physical stability of the formulations were carried out following the specifications of National Drug Formulary (19) and the Guide to Good Practice in the Preparation of Medications in Hospital Pharmacy Services (17).

pH, uniformity, extensibility, absence of crystals, and absence of phase separations were evaluated on a transparent surface according to 3 levels: level 1, the least favorable, and level 3, the most favorable, for 56 days for each formulation.

Liposomes characterization

Only for liposomes mean particle size, zeta potential, and encapsulation efficiency (EE%) were determined by triplicate at t=0 days. Mean particle size and zeta potential were determined using a particle size analyzer that uses the laser diffraction method (Malvern Instruments,

Worcestershire, UK). The EE% were determined via ultrafiltration, using Amicon® ultra-centrifugal filters (Merck Millipore, Ireland) with a molecular weight cut off of 10,000 Daltons. An aliquot of 500 µL of the liposomal formulation was added to the sample reservoir and centrifuged for 15 min at 14,000 g. Then 50 µL was aliquoted in duplicate, and after 1/20 dilution with methanol, was analyzed with HPLC method to determine the concentration of free drug in the filtrate. The following equations were used for the calculations (13,20):

$$EE\% = \frac{W_t - W_f}{W_t} \times 100$$

Where W_t and W_f represent the total amount of the drug and the free amount of the drug, respectively.

Microbiological stability

Culture samples in blood-agar media of each formulation were incubated at 37°C in duplicate at t=28 and 56 days, according to the microbiological control instructions of the National Drug Formulary.

RESULTS

Chemical stability

Method validation

The calibration curve for the chemical stability of ointment, emulsion, and gel formulations demonstrated linearity with a coefficient of determination (r^2) of 0.9998. The limits of detection (LD) and quantification (LQ) were 0.003 and 0.009 mg/mL, respectively. Linearity was also determined for the chemical stability of the liposomal formulation, with a coefficient of determination (r^2) of 0.9958, LD= 0.011 mg/mL and LQ= 0.038 mg/mL.

Rapamycin degradation

Table 2 shows the rapamycin quantity per weighed formulation quantity (mg/g) and %RC in each formulation and standard deviation (SD) at times (t) = 0, 7, 14, 21, 28, 42, and 56 days.

Figure 1 shows ointment, emulsion, gel, and liposomes chromatograms.

T_{90} was reached during the sampling period for the ointment, emulsion, and gel formulations:

T_{90} =56, 14, and 21 days, respectively. Only liposomes were stable for 56 days.

Table 2. Chemical stability results.

Rapamycin quantity/weighed formulation quantity (Q, mg/g) $\pm$ SD								
Time (days)	0	2	7	14	21	28	42	56
Ointment	7.21 $\pm$ 0.86	7.13 $\pm$ 0.28	7.22 $\pm$ 0.87	7.59 $\pm$ 0.44	10.19 $\pm$ 3.44	7.34 $\pm$ 0.93	6.64 $\pm$ 0.41	6.40 $\pm$ 0.16
Emulsion	9.41 $\pm$ 0.28	9.29 $\pm$ 0.40	9.18 $\pm$ 1.04	8.12 $\pm$ 0.63	9.48 $\pm$ 0.35	11.10 $\pm$ 1.94	7.59 $\pm$ 0.77	7.87 $\pm$ 2.93
Gel	8.40 $\pm$ 0.01	7.86 $\pm$ 0.10	8.09 $\pm$ 1.85	7.80 $\pm$ 0.44	7.56 $\pm$ 0.19	7.69 $\pm$ 0.42	7.71 $\pm$ 0.22	8.16 $\pm$ 0.23
Liposomes	1.15 $\pm$ 0.11	1.17 $\pm$ 0.03	1.27 $\pm$ 0.13	1.22 $\pm$ 0.09	1.24 $\pm$ 0.03	1.25 $\pm$ 0.07	1.38 $\pm$ 0.14	1.22 $\pm$ 0.18
Percentage content of remaining rapamycin (%CR) $\pm$ SD								
Time (days)	0	2	7	14	21	28	42	56
Ointment	100.00 $\pm$ 0.00	99.97 $\pm$ 12.81	100.20 $\pm$ 4.17	106.82 $\pm$ 18.48	139.48 $\pm$ 31.38	103.58 $\pm$ 24.59	93.47 $\pm$ 16.41	89.45 $\pm$ 8.67
Emulsion	100.00 $\pm$ 0.00	98.89 $\pm$ 6.38	97.70 $\pm$ 12.17	86.52 $\pm$ 9.36	100.80 $\pm$ 3.66	118.48 $\pm$ 24.34	80.68 $\pm$ 7.42	83.85 $\pm$ 31.49
Gel	100.00 $\pm$ 0.00	93.53 $\pm$ 1.15	96.33 $\pm$ 21.98	92.82 $\pm$ 5.25	89.96 $\pm$ 2.20	91.55 $\pm$ 5.03	91.79 $\pm$ 2.60	97.14 $\pm$ 2.70
Liposomes	100.00 $\pm$ 0.00	102.65 $\pm$ 9.99	111.29 $\pm$ 7.43	106.56 $\pm$ 2.34	108.58 $\pm$ 12.29	110.05 $\pm$ 15.94	121.07 $\pm$ 11.86	107.51 $\pm$ 21.12

SD: standard deviation

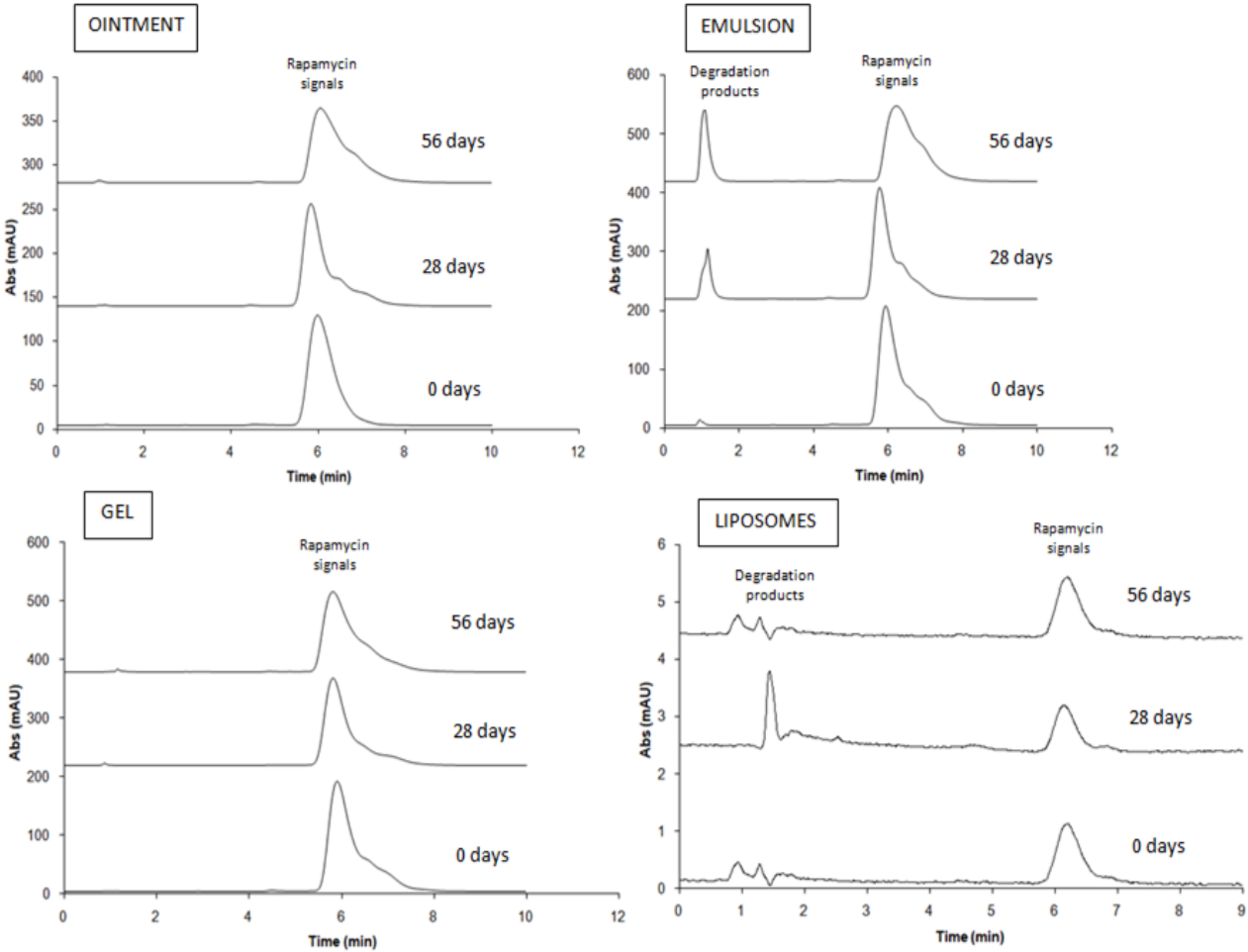


Figure 1. Ointment, emulsion, gel and liposomes chromatograms.

Physical stability

Table 3 exposes the results of the physical stability parameters for the four formulations. The ointment formulation obtained a level 1 score in extensibility property due to its high petrolatum content, similar to the classical formulation. It should be noted that the emulsion formulation resulted in a pre-separation of phases at 14 days and a definitive breakdown of the emulsion at 21 days; therefore, it was assigned a level 1 score in the absence of phase separations property. The score of level 1 in the absence of crystals property for the gel formulation, was awarded by the presence of white particles.

Liposomes characterization

The mean particle size of prepared liposomes determined a good quality result of the analysis with a polydispersity index value <0.2 , indicating a homogenous dispersion. The EE% turned out to be very favorable for the liposomal formulation, with a high load of rapamycin per liposome formed.

Microbiological stability

Culture samples were negative in blood-agar media for each formulation at $t=28$ and 56 days (Table 3).

Table 3. Physical and microbiological stability results.

Physical stability results: properties for 56 days and liposomes characterization (Mean particle size, zeta potencial and EE% at t=0 days)	Ointment	Emulsion	Gel	Liposomes
pH	7.0	6.0	6.0	7.5
Uniformity	Level 2	Level 3	Level 3	Level 3
Extensibility	Level 1	Level 2	Level 3	Level 3
Absence of crystals	Level 3	Level 3	Level 1	Level 3
Absence of phase separation	Level 3	Level 1	Level 3	Level 3
Mean particle size, Pdl	NA	NA	NA	178.9 nm, Pdl 0.093
Zeta potential (mV) $\pm$ SD	NA	NA	NA	-41.1 $\pm$ 13.4
EE% $\pm$ SD	NA	NA	NA	89.19 $\pm$ 4.57
Microbiological stability results: culture samples at t=28 and 56 days	Negatives	Negatives	Negatives	Negatives

NA: not applicable

Pdl: polydispersity index

mV: millivolts

SD: standard deviation

EE: encapsulation efficiency

DISCUSSION

This study concludes that only one of the four proposed formulations, liposomes, maintains their chemical, physical, and microbiological stability throughout all the sampling time, awarding them a validity period of 56 days.

For the ointment and gel formulations, the chemical stability was the determining factor for not reaching the validity period of 56 days, with T_{90} = 56 and 21 days, respectively. In the case of the emulsion formulation, the physical stability was very obviously compromised after pre-separation of phases at 14 days and a definitive breaking up of the emulsion at 21 days. All formulations were microbiologically stable throughout the sampling period. Considering all stability studies, the validity period for each formulation was: ointment=42 days, emulsion=7 days, gel=14 days; and liposomes=56 days.

Rapamycin is a highly apolar, active substance. This stability study confirms that rapamycin is more comfortable among lipophilic excipients, such as petrolatum and liposomes. In hydrophilic vehicles, it tends to precipitate and lose its physical and chemical stability, as in the case of emulsion and gel formulations.

Regarding excipients, transcutool allows a greater solubility of rapamycin in the vehicle (10), thus avoiding possible precipitations of the active principle and constituting a significant improvement in the formulation.

The liposomal formulation has certain advantages over the ointment formulation: it has a better appearance, is more comfortable, and better extensibility (Photograph 1). Historically,

some patients complained that classic ointment was difficult to apply (21) and the enhanced organoleptic properties of the liposomal formulation would help increase compliance with treatment and patient satisfaction with topical therapy.

Additionally, liposomes have been studied as carriers of molecules for immunosuppressive therapies and chemotherapy (22,23). Liposome-encapsulated rapamycin has been shown to have the ability to reach the drug's site of action more quickly, with antiproliferative properties on T cells (23,24).

Therefore, liposomes exert their influence on the stratum corneum of the skin, improving the penetration of the active substance and providing an increased bioavailability of rapamycin. This property makes liposomes particularly effective for cosmetic and pharmaceutical use.

In these therapies, the role of the hospital pharmacists is key in the preparation of the formulations, since rapamycin was added to the NIOSH list as a hazardous drug in 2014 (25), which results in greater control in the development of topical formulations (26). In addition, pharmaceutical care has special relevance in the processes of dispensing, administration, and monitoring, promoting the supervision and control of these patients.

After galenic improvement and confirmation of stability in liposomes, more dermokinetic and clinical studies are needed to ensure effectiveness, safety, and high patient satisfaction.

Photograph 1. Liposomal formulation.



Limitations

The authors are aware that there is significant variability in chemical stability results for all formulations. This is due to the fact that during the formulation process, the correct homogenization of the excipients is very difficult, and the extractability of solvents depends on the formulation and its excipients. In any case, this article provides new stability data, allowing support in therapeutic decisions for other authors and clinicians.

REFERENCES

- (1) Narayanan V. Tuberous sclerosis complex: genetics to pathogenesis. *Pediatr Neurol* 2003 Nov;29(5):404-409.
- (2) Rumsey N, Clarke A, White P. Exploring the psychosocial concerns of outpatients with disfiguring conditions. *J Wound Care* 2003 Jul;12(7):247-252.
- (3) Zweegers J, van der Vleuten CJ. The psychosocial impact of an infantile haemangioma on children and their parents. *Arch Dis Child* 2012 Oct;97(10):922-926.
- (4) Biondo G, Greco S, Mavilia L, Mercuri SR. Treatment of nodular facial angiofibromas in tuberous sclerosis, using ultrapulse carbon dioxide laser. *Clin Exp Dermatol* 2014 Aug;39(6):738-740.
- (5) Balestri R, Neri I, Patrizi A, Angileri L, Ricci L, Magnano M. Analysis of current data on the use of topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis complex. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015 Jan;29(1):14-20.
- (6) Koenig MK, Hebert AA, Roberson J, Samuels J, Slopis J, Woerner A, et al. Topical rapamycin therapy to alleviate the cutaneous manifestations of tuberous sclerosis complex: a double-blind, randomized, controlled trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied rapamycin. *Drugs R D* 2012 Sep 1;12(3):121-126.

- (7) Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Tanaka M, Hayashi M, Matsumoto S, Yamamoto K, et al. Efficacy and Safety of Topical Sirolimus Therapy for Facial Angiofibromas in the Tuberous Sclerosis Complex : A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol* 2017 Jan 1;153(1):39–48.
- (8) Koenig MK, Bell CS, Hebert AA, Roberson J, Samuels JA, Slopis JM, et al. Efficacy and Safety of Topical Rapamycin in Patients With Facial Angiofibromas Secondary to Tuberous Sclerosis Complex: The TREATMENT Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol* 2018 Jul 1;154(7):773–780.
- (9) Chen PL, Hong JB, Shen LJ, Chen YT, Wang SJ, Liao YH. The efficacy and safety of topical rapamycin-calcitriol for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex: a prospective, double-blind, randomized clinical trial. *Br J Dermatol* 2020 Oct;183(4):655–663.
- (10) Bouguezon G, Lagarce F, Martin L, Pailhories H, Bastiat G, Vrignaud S. Formulation and characterization of a 0.1% rapamycin cream for the treatment of Tuberous Sclerosis Complex-related angiofibromas. *Int J Pharm* 2016 Jul 25;509(1-2):279–284.
- (11) Le Guyader G, Vieillard V, Andrieux K, Rollo M, Thirion O, Wolkenstein P, et al. Long-term stability of 0.1% rapamycin hydrophilic gel in the treatment of facial angiofibromas. *Eur J Hosp Pharm* 2020 Mar;27(e1):e48–e52.
- (12) Ghanbarzadeh S, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Application of response surface methodology in development of sirolimus liposomes prepared by thin film hydration technique. *Bioimpacts* 2013;3(2):75–81.
- (13) Ghanbarzadeh S, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. *Adv Pharm Bull* 2013;3(1):25–29.

(14) Salido R, Garnacho-Saucedo G, Cuevas-Asencio I, Ruano J, Galan-Gutierrez M, Velez A, et al. Sustained clinical effectiveness and favorable safety profile of topical sirolimus for tuberous sclerosis - associated facial angiofibroma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012 Oct;26(10):1315-1318.

(15) Tiedemann Svendsen M, Bygum A, Hansen LK, Broesby-Olsen S. Facial angiofibromas associated to tuberous sclerosis treated with topical sirolimus. *Ugeskr Laeger* 2013 Oct 21;175(43):2569-2570.

(16) Ministry of Health, Consumption and Social Welfare. Madrid, Spain. Royal Decree 175/2001, of 23 February, which approves the standards of correct preparation and quality control of magistral formulas and officinal preparations. Available at: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2001/BOE-A-2001-5185-consolidado.pdf>.

(17) Ministry of Health, Consumption and Social Welfare. Madrid, Spain. Guide to Good Practice of Preparation of Medications in Hospital Pharmacy Services. June, 2014. Available at: <https://www.msbs.gob.es/profesionales/farmacia/pdf/GuiaBPP3.pdf>.

(18) International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2015, 6-12.

(19) Ministry of Health, Consumption and Social Welfare, by mandate of Law 29/2006, of July 26, on guarantee and rational use of medicines and health products. National Drug Formulary. Madrid, Spain. 2019.; Available at: https://www.boe.es/biblioteca_juridica/abrir_pdf.php?id=PUB-NT-2019-112.

(20) Yoon HY, Chang IH, Goo YT, Kim CH, Kang TH, Kim SY, et al. Intravesical delivery of rapamycin via folate-modified liposomes dispersed in thermo-reversible hydrogel. *Int J Nanomedicine* 2019 Aug 5;14:6249–6268.

(21) Park J, Yun SK, Cho YS, Song KH, Kim HU. Treatment of angiofibromas in tuberous sclerosis complex: the effect of topical rapamycin and concomitant laser therapy. *Dermatology* 2014;228(1):37–41.

(22) Onyesom I, Lamprou DA, Sygellou L, Owusu-Ware SK, Antonijevic M, Chowdhry BZ, et al. Sirolimus encapsulated liposomes for cancer therapy: physicochemical and mechanical characterization of sirolimus distribution within liposome bilayers. *Mol Pharm* 2013 Nov 4;10(11):4281–4293.

(23) Rouf MA, Vural I, Renoir JM, Hincal AA. Development and characterization of liposomal formulations for rapamycin delivery and investigation of their antiproliferative effect on MCF7 cells. *J Liposome Res* 2009;19(4):322–331.

(24) Valizadeh H, Ghanbarzadeh S, Zakeri-Milani P. Fusogenic liposomal formulation of sirolimus: improvement of drug anti-proliferative effect on human T-cells. *Drug Dev Ind Pharm* 2015;41(9):1558–1565.

(25) Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH List of Antineoplastic and Other Hazardous Drugs in Healthcare Settings, 2014. Available at:

<https://www.cdc.gov/niosh/docs/2014-138/pdfs/2014-138.pdf>. 2014; . Accessed 19/06, 2019.

(26) Cortell Fuster C, Martínez Gómez MA, Cercós Lletí AC, Climente Martí M. Topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis: a systematic review based on evidence. J Dermatolog Treat 2021 Apr 6:1-7.

CAPÍTULO TERCERO

CAPÍTULO TERCERO

FASE III: EVALUACIÓN CLÍNICA

EFFECTIVENESS AND SAFETY OF LIPOSOMAL RAPAMYCIN FOR THE TREATMENT OF FACIAL ANGIOFIBROMAS IN TUBEROUS SCLEROSIS

Cortell-Fuster, Clara¹; Martínez-Gómez, María Amparo¹; Cercós-Lletí, Ana Cristina¹; Climente-Martí, Mónica¹; Tania Díaz Corpas²; Almudena Mateu Puchades²; Ángeles Revert Fernández³.

¹Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Doctor Peset. Valencia, Spain.

²Servicio de Dermatología, Hospital Universitario Doctor Peset. Valencia, Spain.

³Servicio de Dermatología, Hospital Clínico Universitario. Valencia, Spain.

ABSTRACT

Aim

Topical rapamycin is the pharmacological treatment of choice for facial angiofibromas in rare tuberous sclerosis disease. A new, more advanced, and complex formula was developed in our pharmacy service: rapamycin 0.4% liposomal formulation, with better organoleptic characteristics and a more favourable release profile of the active ingredient. The purpose of this study is to evaluate the effectiveness and safety of liposomal topical rapamycin for the treatment of facial injuries in this rare disease.

Method

This was an observational, prospective, and multicenter study. Effectiveness was evaluated mainly through Facial Angiofibromas Severity Index (FASI), Investigator's Global Assessment (IGA) scores and Dermatology Life Quality Index (DLQI) questionnaire. To assess the safety profile of rapamycin, adverse reactions were reported, and blood tests and blood rapamycin levels were performed during treatment.

Results

Eleven patients were included, of which 8/11 (73%) patients obtained successful treatment according to FASI and IGA scores after 24 weeks of treatment. Statistical analysis demonstrated a significant improvement ($p<.05$) in FASI and IGA scores, erythema, and FA size after treatment with rapamycin liposomal formulation (FASI before treatment, median

(interquartile range): 6.0 (2.0), FASI after treatment: 3.5 (2.0), $p=0.0063$). Five patients also improved their quality of life after treatment. Regarding safety profile of rapamycin, the most common adverse reaction was mild pruritus and two patients reported erythema, who discontinued treatment prematurely. All haematological tests were normal, and blood rapamycin levels were undetectable.

Conclusions

After galenic improvements and clinical evaluations, the rapamycin liposomal formulation proved to be effective and safe for this therapeutic indication. This new formulation was included as a magistral formula in our hospital pharmacy service, now accessible for prescribing by Dermatologists. Drug development in hospital pharmacy is often the only pharmacological alternative available to treat the symptoms of rare diseases, when treatment options are limited or inadequate.

INTRODUCTION

Tuberous sclerosis (TS) is a rare autosomal dominant disease with an incidence of 1 in 6000 to 1 in 10,000 individuals (1) in which a series of mutations occur in tumor suppressor genes (TSC1 and TSC2). This leads to deregulation of the mTOR pathway and uncontrolled cell proliferation, resulting in multisystem formation of benign tumors called hamarthromas (2). These tumors can have different severity and locations, one of the most common being the kidneys. In addition, they can be affected by slight traumas that can also cause uncontrolled bleeding (3).

The most common skin manifestation of TS is facial angiofibromas (FA). They constitute a fundamental diagnostic criterion for the disease since they are present in up to 80% of patients. FA appear at an early age and tend to stabilize in number and size in adolescence, which sometimes represents an esthetic and psychological problem for these patients (4) (5).

Multiple treatments have been established for this skin condition. Physical treatments like radiofrequency, electrocoagulation, cryotherapy, dermabrasion, and laser therapy present certain problems because are invasive and painful and require anesthesia (6)(7). The interest of mTOR inhibitors focuses pharmacological treatment on everolimus and sirolimus, and recent publications place topical rapamycin (sirolimus) as the most appropriate alternative. This molecule is a powerful mTOR inhibitor with immunosuppressive, antitumor, and antiangiogenic characteristics (8).

We found multiple studies in the literature that ensure the effectiveness and safety of this pharmacological therapy, such as case series and several clinical trials, with a higher evidence level (9) (10) (11) (12) (13). However, significant variability was evident in the concentrations, dosages, and formulations tested in the literature.

In our hospital pharmacy service, we decided to optimize the conventional formulation commonly used by dermatologists in accordance with standard clinical practice: rapamycin 0.4% in vaseline. The result of galenic research and development was a more advanced and complex formula: a 0.4% liposomal formulation of rapamycin (3) (14) prepared in a biological safety cabinet. The exact composition of the liposomal formulation was rapamycin 0.4%, transcuto[®] 3%, liposomal solution (Guinoxome[®]) 25%, cholesterol 0.1%, isopropyl myristate 10%, propylene glycol 10%, carbopol 2%, NaOH 10% q.s. pH 7.5 and water for injection q.s. 20 g. In the cosmetic and pharmaceutical fields, pre-prepared and commercially available lipid solutions are used, which can form liposomes upon incorporating an aqueous solution. Specifically, the Guinoxome[®] liposomal solution allows for easy and high-quality liposome formation. The remaining components of the formulation serve as humectants and stabilizers, with special attention given to transcuto. This solvent functions as an excellent absorption promoter, showing a higher solubility of rapamycin in this vehicle compared to liquid paraffin (15). The liposomes obtained were lighter, with better extensibility, and because of their characteristics, they are compatible with all skin types (16). In addition, previous studies have reported a greater release of the active ingredient in liposomal vesicles than in other formulations, like gels (17). This new liposomal formulation was validated based on its

chemical, physical, and microbiological stability, with an encapsulation efficiency of 89% for rapamycin (18). The validity period was 3 months at 3–8 °C (19).

According to standard clinical practice, topical liposomal rapamycin administration can improve the appearance of FA, demonstrating the drug's effectiveness and safety following formulation optimization.

This study aims to evaluate the effectiveness and safety of liposomal topical rapamycin for the treatment of FA in rare TS disease.

METHOD

Study Design and Development

This was an observational, prospective, longitudinal, and multicenter study. The study period during which patients were recruited was between December 2021 and October 2023. The participating centers were the Doctor Peset University Hospital and University Clinical Hospital of Valencia, Spain. The clinical services involved were the pharmacy service of the Doctor Peset University Hospital and the dermatology service of both hospitals.

Description

This study was divided into three distinct phases: screening, treatment, and follow-up. Detailed assessments can be found in Annex 1.

Screening phase

The suitability of the participants for inclusion in the study was assessed. Informed consent was obtained, and patient demographics, medical history, and concomitant medications were collected.

Treatment phase

The treatment phase consisted of a clinical visit at baseline (V_0) and three subsequent clinical visits after 2, 12 and 24 weeks of treatment with the rapamycin liposomal formulation (P_1 , V_2 and V_3). Patients were instructed how to administer the treatment: three times per week in the afternoon using a nitrile glove. The amount of formulation required to produce a thin

confluent layer on the skin was 6 mg/cm² and was based on the size of the affected area. Its gel texture allows for excellent application and absorption onto skin conditions on the cheeks, nose, and chin. Patients completely removed the formulation after 2 or 3 hours of exposure by washing with water and neutral soap. It was recommended to keep the area well hydrated, avoid sun exposure, and use sunscreen creams with SPF 50. Patients who discontinued treatment prematurely underwent a visit (V_x) in whom effectiveness and safety (adverse events) were evaluated.

Follow-up

A follow-up visit (P₄) was performed four weeks after the V₃ or V_x visit.

Annex 1. Schedule of assessments.

	Study phases						
Assesment	Screening		Treatment				Follow-up
	IC	Screening	V ₀ Baseline	P ₁ 2 weeks	V ₂ 12 weeks	V ₃ 24 weeks	P ₄ 4 weeks after final dose
Tolerance	-14 days to day 0		NA	±5 days	±5 days	±5 days	±5 days
Informed consent	X						
Inclusion/exclusion criteria		X					
Demographic data		X					
Medical history		X	X				X
Concomitant medications		X	X				X
Drug administration			X				
OEI (FASI, IGA)			X		X	X	
SEI (Photographs, SIS)			X		X	X	
DLQI			X		X	X	
Hema			X		X	X	
PK					X	X	
AEs			X				X

Description of procedures

V₀, V₂ and V₃: on-site visitsP₁ and P₄: phone visits

NA: not applicable

OEI: Objective Evaluation by Investigator

FASI: Facial Angiofibromas Severity Index

IGA: Investigator's Global Assessment

SEI: Subjective Evaluation by Investigator

SIS: Subjective Improvement Score

DLQI: Dermatology Life Quality Index

Hema: Haematology tests. White blood cell, red blood cell, and platelet counts

PK: Pharmacokinetics. Blood rapamycin levels

AEs: Adverse Events

Inclusion Criteria

1. Male and female patients aged ≥ 10 years and ≤ 65 years on the day informed consent was obtained.
2. Patients diagnosed with TS and presenting visible FA.
3. FASI (Facial Angiofibromas Severity Index) score (20) of at least 3 and no greater than 8 (Annex 2).
4. IGA (Investigator's Global Assessment) score (13) of at least 2 and no greater than 4 (Annex 2).

Exclusion Criteria

1. Patients who have received any mTOR inhibitor in the 3 months prior to selection by any route of administration.
2. Patients with laser or surgical therapy in the 6 months prior to selection.
3. Patients with serious skin lesions like erosions or ulcers.
4. Patients with known hypersensitivity to any component of the study product.
5. Patients with immune dysfunction or receiving any form of immunosuppression.
6. Pregnant or lactating females.

Annex 2. FASI and IGA scores.

Erythema			
Skin color = 0	Light red = 1	Red = 2	Dark red/purple = 3
Size			
Small (< 5 mm) = 1		Large (> 5 mm) = 2	Confluent = 3
Extension			
< 50% cheek surface = 2		>50% cheek surface = 3	

FASI score
Mild: ≤ 5
Moderate: 6–7
Severe: ≥ 8

IGA score		
Grade	Short Description	Detailed Description
0	Clear	No signs of facial angiofibroma
1	Almost Clear	Small lesions (<2 mm), normal to pink coloration
2	Mild	Predominantly small lesions (2–4 mm), pink to light red coloration
3	Moderate	Predominantly large lesions (4–6 mm), dull to bright red coloration
4	Severe	Large (>6 mm) or confluent lesions of dark red/purple coloration

FASI: Facial Angiofibromas Severity Index

IGA: Investigator's Global Assessment

Prohibited Concomitant Medications

The following medications are prohibited during the study to avoid potential interference with the assessment of effectiveness and safety:

- i. Laser and surgical treatment in the targeted treatment area.
- ii. Application of steroids or other immunosuppressive agents to the designated area.
- iii. Administration of mTOR inhibitors (rapamycin, everolimus, temsirolimus, etc.) by any route of administration.
- iv. Potent inhibitors of CYP3A4 and/or P-gp (such as ketoconazole, voriconazole, itraconazole, erythromycin, telithromycin, or clarithromycin) or strong inducers of CYP3A4 and/or P-gp (such as rifampicin) by any route of administration.

Evaluation of Effectiveness

1. Objective evaluation by investigator (OEI)

1.1. Primary endpoints

- Percentage of patients with successful treatment according to a decrease of two or more points on FASI score after treatment.
- Percentage of patients with successful treatment according to a decrease of one or more points on IGA score after treatment.

- Median values of FASI score and the subcategories: erythema, size, and extension before and after treatment.
- Median values of IGA score before and after treatment.

1.2. Secondary endpoints

- Percentage of patients with successful treatment according to a decrease of two or more points on FASI score after 12 weeks of treatment.
- Percentage of patients with successful treatment according to a decrease of one or more points on IGA score after 12 weeks of treatment.
- Time to treatment success (weeks of treatment) according to FASI and IGA scores.

1. Subjective evaluation by investigator (SEI)

1.1. Primary endpoints

- Subjective improvement score: SIS (minimal, moderate, good, or excellent) in photographs of FA after treatment.

1.2. Secondary endpoints

- SIS (minimal, moderate, good, or excellent) in photographs of FA after 12 weeks of treatment.

2. Quality of life

2.1. Primary endpoints

- Percentage of patients with an improvement in quality of life according to a decrease in score on the Dermatology Life Quality Index (DLQI) questionnaire after treatment (Annex 3).
- Median values of DLQI questionnaire before and after treatment.

2.2. Secondary endpoints

- Percentage of patients with an improvement in quality of life according to a decrease in score on the DLQI questionnaire after 12 weeks of treatment.

Evaluation of Safety

1. Adverse Events (AEs)

- Notification of adverse reactions during P₁, V₂, V₃ and P₄ visits.

2. Hematology

- Blood tests with complete blood count using flow cytometry (white blood cell, red blood cell, and platelet counts) during V₀, V₂ and V₃ visits. (Abbott Architect®, Abbott Park, IL, USA).

3. Pharmacokinetics

- Blood rapamycin levels at V₂ and V₃ visits. A chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) was utilized for the quantitative determination of rapamycin in

human whole blood (Abbott Architect®, Abbott Park, IL, USA). Prior to initiating the automated Architect sequence, a manual pretreatment step was undertaken. This involved extracting the whole blood sample (150 µL) with a precipitation reagent (300 µL), followed by heating (10 minutes at 42°C) and centrifugation (5 minutes at 10,900 rpm). Subsequently, the supernatant was decanted into a Transplant Pretreatment Tube, which was then placed onto the Architect i System for further processing. The limit of detection of the Architect Rapamycin assay was 0.3 ng/mL.

Statistical Methods

A standard descriptive analysis was performed on all variables at baseline, continuous variables will be expressed as mean and standard deviation, and qualitative variables will be expressed as absolute frequencies, percentages, and proportions. The statistical analysis was conducted using the Intention-to-Treat (ITT) approach. All study participants were included in the analysis, regardless of their compliance with the treatment or any protocol deviations. To evaluate the normality of the data, the Shapiro-Wilk test was employed, which is suitable for small samples ($n < 30$). The logarithmic transformation was applied due to the non-normal distribution but was not entirely effective in normalizing the data. Non-parametric tests were subsequently conducted, specifically the Wilcoxon signed-rank test for paired samples, with variables expressed as median values and interquartile ranges (IQR). Deviations were considered statistically significant when $p < .05$. Stata® 13.1 was used for the processing of statistical information.

Annex 3. DLQI questionnaire.

Dermatology Life Quality Index (DLQI)

1. During the last month, have you experienced itching, inflammation, pain or stinging on your skin?
 - a. Very much
 - b. A lot
 - c. A little
 - d. Not at all
2. During the last month, have you felt uncomfortable or self-conscious because of your skin problems?
 - a. Very much
 - b. A lot
 - c. A little
 - d. Not at all
3. During the last month, have your skin problems interfered with your shopping or household activities?
 - a. Very much
 - b. A lot
 - c. A little
 - d. Not at all
4. Over the past month, have your skin problems influenced the clothes/makeup/hair style you wore?
 - a. Very much
 - b. A lot
 - c. A little
 - d. Not at all
5. During the last month, have your skin problems affected any social or leisure activities?
 - a. Very much
 - b. A lot
 - c. A little
 - d. Not at all

6. During the last month, has it been difficult for you to play a sport because of your skin problems?
 - a. Very much
 - b. A lot
 - c. A little
 - d. Not at all
7. During the last month, have your skin problems prevented you from working or studying?
 - a. Very much
 - b. A lot
 - c. A little
 - d. Not at all
8. During the last month, has your skin caused you problems with your partner or a close friend or relative?
 - a. Very much
 - b. A lot
 - c. A little
 - d. Not at all
9. During the last month, have your skin problems made your sex life difficult?
 - a. Very much
 - b. A lot
 - c. A little
 - d. Not at all
10. During the last month, has treating your skin been a problem for you, for example because it has made the house dirty or taken up your time?
 - a. Very much
 - b. A lot
 - c. A little
 - d. Not at all

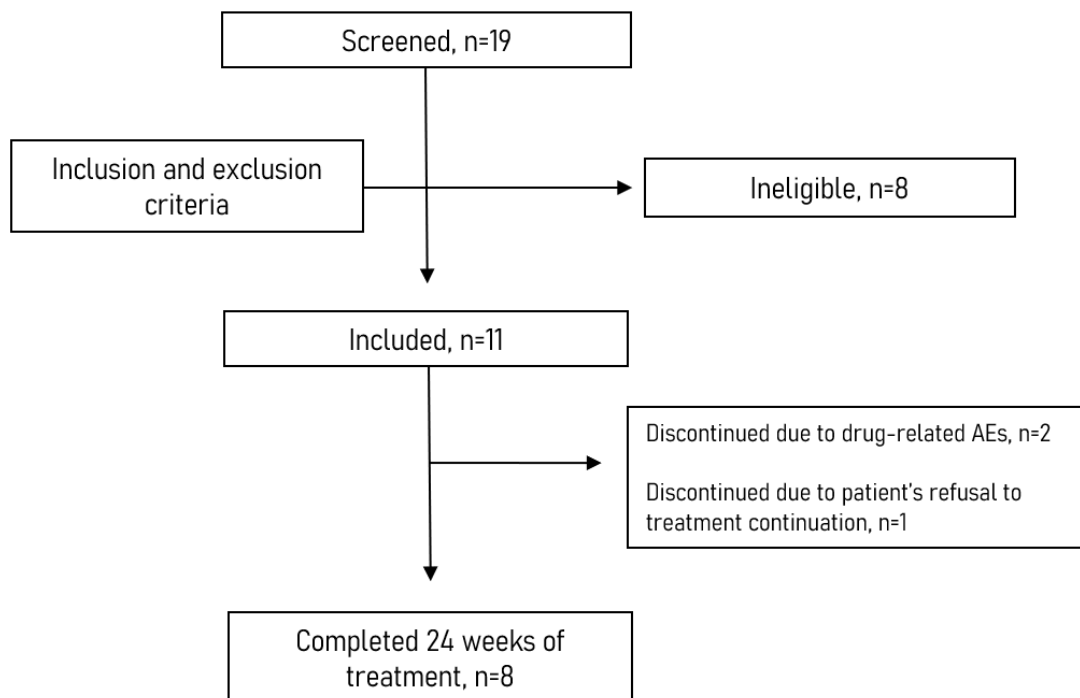
DLQI score
a. 3 points
b. 2 points
c. 1 point
d. 0 points
<i>Maximum score = 30 points</i>

RESULTS

Eleven patients were screened. After exclusion of eight ineligible patients, 11 patients were included (Figure 1), of which 8 were women. The median age was 36 (11–64) years at screening. Most of the patients were of Caucasian ethnicity, which is predominant in Spain. Five patients additionally had hamarthromas in different locations, such as the kidneys or lungs. Three patients had prior treatment with topical rapamycin, while four underwent laser or surgical pre-treatment. However, these patients always met the inclusion/exclusion criteria. Two patients also presented atopic-prone skin as a dermatological condition. (Table 1). Baseline FASI and IGA scores can be seen in Table 2.

Eight patients completed 24 weeks of treatment, and three did not. Two due to drug-related AEs (patient 01 and patient 07) and one due to patient's refusal to treatment continuation (patient 08). Consequently, effectiveness and safety were evaluated in all patients except patient 08.

Figure 1. Patient disposition.



AEs: Adverse Events

Table 1. Patient characteristics at baseline (n=11).

Characteristic	Value, n (%) or mean (SD)
Gender (female)	8 (73)
Age (years)	36.5 (18.6)
Ethnicity	
Caucasian	8 (73)
Hispanic or latino	2 (18)
Not hispanic or latino	1 (9)
Unknown or not reported	0 (0)
Hamartromas in different locations	5 (45)
Pre-treated with topical rapamycin	3 (27)
Pre-treated with laser or surgery	4 (36)
Other dermatological conditions	2 (18)

Evaluation of Effectiveness

1. Objective evaluation by investigator (OEI)

Eight of eleven (73%) patients obtained successful treatment according to FASI and IGA scores after 24 weeks of treatment (Table 2). All patients decreased or maintained their FASI and IGA scores after treatment. The final evaluation of effectiveness for patients 01 and 07 occurred at Vx (prior to week 24 of treatment). Table 2 displays the median values and IQR for the FASI score, including its subcategories (erythema, size, and extension), as well as the IGA score before and after treatment. The figure 2 corresponds to the box plots showing the distribution of FASI and IGA scores before and after treatment. The central line represents the median, the box spans the IQR, and outliers are depicted as individual data points.

After 12 weeks of treatment, 6/11 patients (55%) achieved successful treatment according to the FASI score. In contrast, based on the IGA score, successful treatment was observed in 7 patients (64%) (Table 2).

The time to treatment success, measured in weeks of treatment according to the FASI score, was 12 weeks for six patients and 24 weeks for two patients. Likewise, according to the IGA score, treatment success occurred at 12 weeks for seven patients and at 24 weeks for one patient (Table 2).

Table 2. Evaluation of effectiveness.

Patient	OEI						SEI		Quality of life		
	FASI V ₀	FASI V ₂	FASI V ₃	IGA V ₀	IGA V ₂	IGA V ₃	SIS V ₂	SIS V ₃	DLQI V ₀	DLQI V ₂	DLQI V ₃
SIRO-01	7	-	7*	4	-	4*	-	Minimal*	4	-	9 *
SIRO-02	5	3	3	2	1	1	Good	Good	2	1	1
SIRO-03	7	5	4	3	2	1	Good	Excellent	1	1	5
SIRO-04	5	4	3	2	2	1	Good	Good	0	3	2
SIRO-05	8	6	5	4	3	2	Good	Excellent	5	2	0
SIRO-06	7	6	4	4	3	1	Good	Excellent	3	4	1
SIRO-07	5	-	5*	3	-	3*	-	Minimal*	0	-	2 *
SIRO-08	6	-	-	3	-	-	-	-	1	-	-
SIRO-09	6	4	3	3	2	1	Good	Excellent	12	1	1
SIRO-10	6	4	3	3	2	1	Good	Excellent	0	0	0
SIRO-11	6	4	3	3	2	1	Good	Excellent	7	1	0
Wilcoxon signed-rank test for paired samples, n=11. Median (interquartile range, IQR).											
			V ₀		V ₃		P value				
FASI			6.0 (2.0)		3.5 (2.0)		.0063 **				
Erythema			2.0 (0.0)		1.0 (1.0)		.0069 **				
Size			2.0 (0.0)		1.0 (1.0)		.0253 **				
Extension			2.0 (1.0)		2.0 (0.0)		.1573				
IGA			3.0 (1.0)		1.0 (1.0)		.0068 **				
DLQI			2.0 (5.0)		1.0 (2.0)		.5733				

OEI: Objective evaluation by investigator

FASI: Facial Angiofibromas Severity Index

IGA: Investigator's Global Assessment

SEI: Subjective evaluation by investigator

SIS: Subjective improvement score

DLQI: Dermatology Life Quality Index

*Assessments in V_x

** Statistically significance

2. Subjective evaluation by investigator (SEI)

SIS of FA after treatment was minimal for 2/11 (18%) patients, good for another two patients and excellent for 6/11 (55%) patients (Table 2).

SIS of FA after 12 weeks of treatment was good for 8/11 (73%) patients (Table 2). Representative photographs of two patients are presented in Annex 4, with an excellent SIS after treatment.

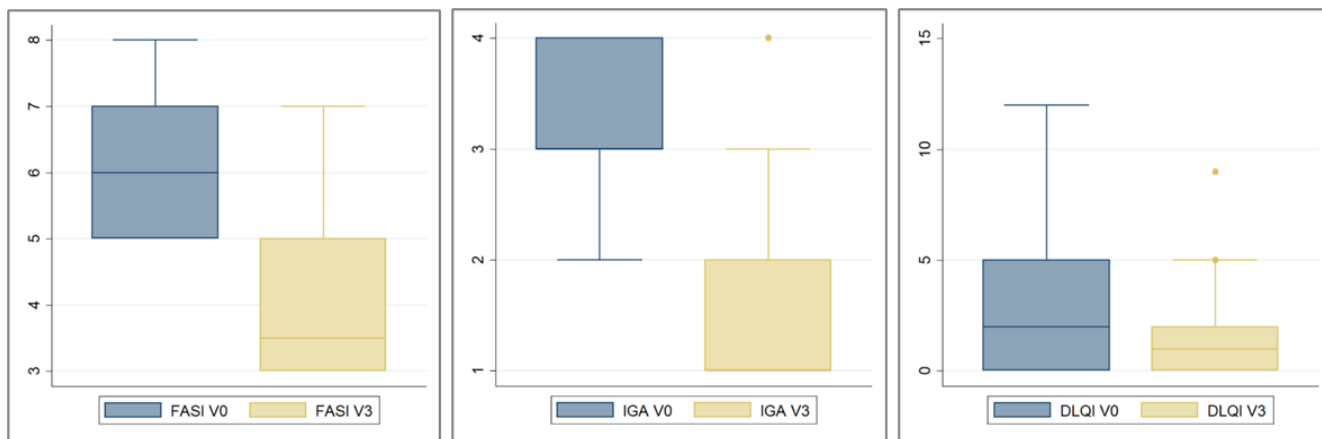
3. Quality of life

Five of eleven (45%) patients improve their quality of life according to a decrease in score on DLQI questionnaire after treatment.

Median values and IQR for the DLQI questionnaire before and after treatment are shown in Table 2. The figure 2 corresponds to the box plot showing the distribution of DLQI scores before and after treatment.

Four of eleven (36%) patients improve their quality of life according to a decrease in score on DLQI questionnaire after 12 weeks of treatment.

Figure 2. Box Plots of FASI, IGA, and DLQI scores before and after treatment, n=11.



FASI: Facial Angiofibromas Severity Index

IGA: Investigator's Global Assessment

DLQI: Dermatology Life Quality Index

Annex 4. Subjective evaluation by investigator (SEI) before (1, 3) and after treatment (2, 4).



Evaluation of Safety

1. [Adverse Events \(AEs\)](#)

No serious adverse events were reported during the treatment or follow-up period. Five of eleven (45%) patients reported an adverse event during the treatment phase. The most common adverse reaction was mild pruritus (5/11, 45%) in the administration area that stopped in all cases after 5-10 minutes of exposure to the formulation. Two of eleven (18%) patients communicated dry skin and two other patients reported a feeling of tightness. Of note, two patients informed of erythema, leading to premature discontinuation of treatment before V₂. All adverse reactions disappeared when treatment was stopped, as this was confirmed during the P₄ visit.

2. [Hematology](#)

All haematological tests were normal for all patients. There were no significant changes in white blood cell, red blood cell, or platelet counts. All analytical values fell within the normal range.

3. [Pharmacokinetics](#)

All blood rapamycin levels were undetectable for all patients, being below the detection limit of the technique (< 0.3 ng/mL).

DISCUSSION

All patients who completed 24 weeks of treatment obtained successful treatment, according to FASI and IGA scores (8/11, 73%). Specifically, FASI score to measure effectiveness is a simple, reproducible, and validated tool for assessing the severity of FA and subsequent response to rapamycin treatment. As demonstrated, this scale provides a more objective assessment, evaluating erythema, size, and extension of FA (20). Statistical analysis demonstrated a significant difference ($p < 0.05$) between FASI score, erythema, FA size and IGA score before and after treatment with rapamycin liposomal formulation. The non-parametric tests did not show significant differences regarding the extension of FA (Table 2).

Patients who completed 24 weeks of treatment considerably improved the appearance of their FA in subjective evaluation. Particularly, 6/11 (55%) patients obtained excellent improvement of their injuries. Regarding Annex 4, FA in both patients decreased in erythema, size, and extension, achieving considerable flattening of the lesions.

Patient satisfaction also represent a relevant aspect in our study, with an improvement in quality of life in 5/11 (45%) patients after treatment. Nevertheless, significant differences regarding the DLQI scores were not observed in the non-parametric tests (Table 2). FA appeared between 2 and 5 years of age and grow in number and size, stabilizing in adolescence (21). The visual impact of facial injuries implies a self-image issue (4) (5) especially in young patients, and sometimes dermatological treatment is not prioritized because there are other more serious complications associated with this rare disease. It has been observed that there is a greater angiogenic component at very early ages, while in

elderly patients, fibromatous lesions tend to predominate. The exclusion criteria related to age are based on these observations and align with the criteria established by other similar clinical studies, including randomized clinical trials.

Overall, the new formulation was well tolerated, with mild adverse events reported that resolved upon completion of treatment. Two patients experienced moderate erythema, prompting early treatment discontinuation. Notably, both patients had a history of atopic-prone skin. Hematological and pharmacokinetic tests confirmed the lack of systemic absorption of rapamycin after topical administration, further enhancing the drug's safety profile.

Comparing our findings with existing studies proves difficult due to substantial variability in assessing effectiveness. Evaluation methods range from validated scales to subjective researcher opinions. Of the five randomized clinical trials found in the literature, only two studies evaluate effectiveness according to standardized objective scales (12) (13). All patients treated with rapamycin showed statistically significant improvement according to FASI and IGA scores compared to placebo. In our study, all patients who completed the 24-week treatment period achieved favorable effectiveness outcomes and the results align with previously published studies. Adverse reactions were consistent with literature and prior experiences, with no reported serious adverse events.

Greater long-term follow-up of liposomal rapamycin treatment would be appropriate to ensure effectiveness and safety. However, it should be noted that patients are not treated

continuously, but rest during the summer months, to minimize or prevent the adverse events derived from rapamycin phototoxicity.

In any case, liposomes provide several advantages that allow a substantial improvement in the treatment of FA. This innovative formula exhibits superior organoleptic characteristics, appearance, and extensibility. Moreover, the sensation after application is more comfortable compared to vaseline (16) (18). Additionally, it can be more easily removed with water and neutral soap than other formulations due to its lightweight nature, thus preventing the patient from irritating the facial skin during the washing process. All these benefits contribute to enhancing treatment compliance and patient satisfaction with topical therapy.

On the other hand, liposomes have been demonstrated to serve as carriers for molecules in chemotherapy and immunosuppressive treatments (22) (23). Specifically, liposome-encapsulated rapamycin can reach the drug's site of action more quickly with a better release profile, providing an increased bioavailability of rapamycin and improving the penetration of the active substance (17). These results underscore the importance of focusing on the optimization of formulations and the incorporation of new drug delivery systems in magistral formulation within hospital pharmacy services. Our work is an example of this approach. Drug development in hospital pharmacy services is often the only pharmacological alternative available to treat the symptoms of rare diseases, when treatment options are limited or inadequate.

In these rare diseases, pharmacy services are key elements in the pharmacotherapeutic process. In collaboration with dermatologists, hospital pharmacists can conduct a clinical

follow-up of patients, contributing to improve effectiveness and minimize adverse reactions

(3). Pharmaceutical care demonstrates special relevance in the processes of formulation, dispensing, administration, and follow-up, promoting the correct supervision of these patients and greater integration of hospital pharmacists into the multidisciplinary team.

After galenic improvements and clinical evaluations, the rapamycin liposomal formulation proved to be effective and safe for the treatment of FA in rare TS disease. This innovative formulation was included as a magistral formula in the pharmacy service of the Doctor Peset University Hospital, now accessible for prescribing by Dermatologists.

The limited number of participants in this observational study could impact the reliability and applicability of the study's results. The initial sample size was not calculated due to it being a rare disease, and patient recruitment proceeded through casual or incidental sampling, as cases occurred and were referred by dermatologists. The methodology used and the statistical tests applied have taken into consideration the sample size ($n < 30$). However, it should be noted that TS is a rare disease that affects a minority of the population (fewer than 1 in 2,000 people) and therefore recruiting patients is a more arduous and difficult task.

Impact statements

- This observational study proves the effectiveness and safety of a new rapamycin liposomal formulation for the treatment of facial angiofibromas in rare tuberous sclerosis disease.
- This innovative formula allows a substantial benefit for patients. Its organoleptic characteristics contribute to improve treatment compliance and patient satisfaction with topical rapamycin.
- Liposome-encapsulated rapamycin can reach the drug's site of action more quickly with a better release profile, improving the penetration of the active substance.
- This research provides new clinical data allowing support in therapeutic decisions for other authors, pharmacists, and dermatologists.

Ethics approval

This study was evaluated and approved by the Clinical Research Ethics Committee of Doctor Peset University Hospital (Registration number: 16.102 on 6 May 2021, in Valencia, Spain).

All tests and procedures of the study were performed in accordance with the Declaration of Helsinki for medical research involving human subjects, including research on identifiable human material and data (Helsinki, 1964).

Acknowledgements

This study was possible thanks to the collaboration and involvement of the following clinical services in Valencia, Spain:

- Pharmacy Service of the Doctor Peset University Hospital.
- Dermatology Service of the Doctor Peset University Hospital.
- Dermatology Service of the University Clinical Hospital.

The authors would also like to express their special gratitude to all the patients who participated in the study.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

CAPÍTULO PRIMERO

FASE I: REVISIÓN SISTEMÁTICA

La búsqueda bibliográfica de inhibidores de mTOR para el tratamiento de los AF posicionó al sirólimus como el tratamiento farmacológico de elección, confirmando su eficacia y seguridad en los estudios identificados en la revisión sistemática de la literatura. Incluso se demostró que el sirólimus tópico fue más adecuado que otro inhibidor de mTOR, el tacrólimus, confirmando su elegibilidad para esta enfermedad rara (54).

Sin embargo, los hallazgos de la revisión sistemática fueron limitados: se incluyeron 30 artículos que evaluaron la terapia tópica con sirólimus para esta indicación, de los cuales solo cuatro correspondieron a ensayos clínicos aleatorizados y el resto fueron series de casos o casos aislados. Este punto limita la validez científica de los estudios analizados en su conjunto, ya que la mayoría de ellos se clasificaron en el nivel 4 de evidencia (recomendación C: recomendación favorable pero no concluyente) según la escala CEBM. Únicamente los cuatro ensayos clínicos aleatorizados quedaron clasificados en el nivel 1a de evidencia (recomendación A: extremadamente recomendable). La opción terapéutica más frecuentemente encontrada en la literatura fue la pomada de sirólimus, elaborada con una concentración del 0,1% con una posología de dos veces al día, lo que representó aproximadamente la mitad de los estudios clínicos identificados.

La mayoría de las investigaciones clínicas evaluaron la efectividad de manera subjetiva, según la opinión del investigador. Solo un 30% de los estudios utilizaron escalas objetivas validadas adjudicando puntuaciones basadas en la gravedad de los AF. Por otra parte, casi la mitad de los estudios, un 44,5%, utilizaron cuestionarios de calidad de vida para evaluar la satisfacción de los pacientes con la terapia farmacológica.

En concreto, la escala objetiva FASI y el cuestionario DLQI demostraron ser herramientas validadas, simples y reproducibles para medir la efectividad y la calidad de vida, respectivamente. Además, la escala FASI fue la alternativa más completa pues consideró tres subcategorías en la evaluación de la severidad: el eritema, el tamaño y la extensión de los angiofibromas.

El sirólimus tuvo un perfil de seguridad favorable, como se demostró en la mayoría de las investigaciones. La incidencia de eventos adversos cutáneos fue la esperada según el número total de pacientes considerados y generalmente desaparecieron tras finalizar el tratamiento. Varios estudios realizaron recuentos de células sanguíneas y niveles sanguíneos de sirólimus debido a la capacidad inmunosupresora de esta molécula. Todos los test hematológicos fueron normales y la mayoría de las determinaciones sanguíneas del fármaco fueron indetectables. En tres casos aislados, los niveles de sirólimus fueron detectables (0,5-0,8 mcg/l), muy por debajo de los 2,6 mcg/l necesarios para conseguir un efecto inmunosupresor (52).

La alta variabilidad en la literatura en cuanto a concentración, vehículo, posología, duración del tratamiento y evaluación de la efectividad dificultó enormemente la selección de una

formulación específica para abordar esta afección cutánea, según lo observado en la revisión sistemática realizada.

No obstante, para llevar a cabo los ensayos restantes de este proyecto, se optó por utilizar una concentración de sirólimus del 0,4% y una frecuencia de administración de tres veces por semana (55). Esta concentración es ampliamente empleada por los Servicios de Farmacia a nivel nacional, según datos recopilados de la base de datos de formulaciones magistrales para EERR del grupo de Farmacotecnia de la SEFH. Además, un estudio específico demostró resultados muy favorables en términos de eficacia y seguridad al administrar esta concentración del fármaco tres veces por semana (56).

Paralelamente, se precisan estudios adicionales en los ámbitos de la formulación galénica, la estabilidad de fármacos y la investigación clínica para identificar la formulación más idónea en cuanto a efectividad, seguridad y satisfacción del paciente.

La búsqueda de un vehículo de aplicación más idóneo que la vaselina, que no comprometiera la liberación del fármaco y mejorara las características organolépticas de la formulación final, motivó el desarrollo del segundo capítulo de la Tesis Doctoral.

CAPÍTULO SEGUNDO

FASE II: OPTIMIZACIÓN GALÉNICA

Considerando la optimización del principio activo, el empleo de sirólimus como materia prima en lugar de los comprimidos recubiertos de Rapamune® mejoró las características organolépticas de la formulación final y redujo considerablemente el coste del tratamiento.

Respecto a los excipientes, el Transcutol® P contribuyó a una mayor solubilidad del sirólimus en el vehículo principal actuando, además, como un excelente promotor de la absorción. De este modo, la incorporación del Transcutol®P como disolvente posibilitó una distribución más homogénea del principio activo en el vehículo y una mayor biodisponibilidad del fármaco a través del estrato córneo, gracias a la elevada solubilidad del sirólimus en el Transcutol®P en contraste con la parafina líquida.

La optimización galénica dio como resultado la propuesta y formulación de cuatro posibles formas farmacéuticas tópicas de sirólimus al 0,4%: pomada, emulsión, gel y liposomas. Los estudios de estabilidad demostraron que únicamente una de las cuatro opciones, la formulación liposomal, mantuvo su estabilidad química, física y microbiológica a lo largo de todo el tiempo de muestreo. De este modo, se le otorgó un período de validez inicial de 56 días (57), el cual se extendió a 84 días entre 2-8 °C protegida de la luz, tras la ampliación del estudio de estabilidad en los liposomas (58).

Para las formulaciones tipo pomada y gel, la estabilidad química fue un factor condicionante para no alcanzar el período de validez de 56 días, con un T_{90} de 56 y 21 días, respectivamente. En el caso de la formulación tipo emulsión, la estabilidad física estuvo muy comprometida después de observar una pre-separación de fases a los 14 días y una rotura definitiva de la emulsión a los 21 días de su formulación. Todas las formulaciones mantuvieron su estabilidad microbiológica durante todo el período de muestreo. Considerando todos los estudios de estabilidad, el período de validez para cada formulación se estableció en 42 días para la pomada, 7 días para la emulsión, 14 días para el gel y 84 días para la formulación liposomal.

Otros autores demostraron la estabilidad química del sirólimus en formulaciones tópicas tipo gel (34) y emulsión (33), sin embargo, en nuestro estudio estas formas farmacéuticas no fueron estables a lo largo de todo el periodo de muestreo. El sirólimus, al ser un principio activo altamente hidrofóbico, muestra mayor estabilidad en vehículos lipofílicos como la vaselina o la solución liposomal, según lo confirmado por estas investigaciones. Sin embargo, en vehículos hidrofílicos, como en las formulaciones tipo emulsión y gel, el sirólimus tiende a perder tanto su estabilidad física como química (57).

En cuanto a la caracterización de los liposomas obtenidos, el tamaño medio de partícula de 178,9 nm confirmó que se obtuvieron sistemas nanométricos de tipo unilamelar. Se consideró la formulación como monodispersa, con una distribución de tamaños homogénea por presentar un índice de polidispersión menor a 0,2 ($PdI = 0,093$). El elevado valor del potencial Z (-41,1 mV) fue indicativo de que las fuerzas de repulsión entre partículas superaron a las

fuerzas de atracción, contribuyendo así a un sistema más estable. Los liposomas elaborados fueron capaces de incorporar el sirólimus en un alto porcentaje con una EE% del 89,19%.

En el ámbito de la formulación tópica y la búsqueda de nuevos sistemas de liberación de fármacos los liposomas se han convertido en transportadores de notable potencial. Existen experiencias previas centradas en la formulación liposomal de inhibidores de mTOR, como el tacrólimus (59). En el caso concreto del sirólimus, encontramos en la literatura otros trabajos de formulación y caracterización de liposomas que incorporan esta molécula, obteniéndose sistemas similares a los de nuestro estudio, en términos de carga eléctrica (potencial Z) y tamaño medio de partícula (60) (61). No obstante, con relación a la EE% nuestros liposomas fueron capaces de incorporar el sirólimus en mayor medida en comparación con otras investigaciones (89% versus 73% o 77%) (48) (61). Asimismo, el perfil de liberación del sirólimus una vez incorporado a los liposomas también fue estudiado por otros autores en sistemas obtenidos con métodos similares, confirmándose una liberación hasta diez veces más rápida en comparación con formulaciones no liposomales (49).

Tras la confirmación de la idoneidad de los liposomas, la necesidad de probar la efectividad y seguridad de la formulación optimizada condujo al desarrollo del tercer capítulo de la presente Tesis Doctoral.

CAPÍTULO TERCERO

FASE III: EVALUACIÓN CLÍNICA

De los 11 pacientes incluidos en la evaluación clínica, 8 completaron las 24 semanas de tratamiento y 3 no lo hicieron. Dos interrumpieron prematuramente por reacciones adversas y uno abandonó el tratamiento por pérdida de seguimiento. Todos los pacientes que completaron el tratamiento de 24 semanas con la formulación liposomal de sirólimus tópico lograron una respuesta clínica, según las escalas objetivas FASI e IGA (8 de 11, 73%). Las pruebas no paramétricas (test de Wilcoxon para muestras relacionadas) demostraron diferencias estadísticamente significativas entre las puntuaciones FASI, IGA, y las subcategorías de eritema y tamaño de los angiofibromas antes y después del tratamiento con el sirólimus tópico liposomal.

Los participantes que completaron las 24 semanas de tratamiento experimentaron una franca mejoría en la apariencia de sus angiofibromas según las evaluaciones subjetivas. Concretamente, 6 de los 11 pacientes (55%) mostraron una mejora excelente. El anexo G ilustra ejemplos de la apariencia de las afecciones antes y después del tratamiento. En todos los casos expuestos, se observó una reducción en el eritema, el tamaño y la extensión, logrando un aplanamiento considerable de las lesiones faciales.

La satisfacción del paciente también fue un aspecto relevante en nuestra investigación, con una mejora en la calidad de vida según el cuestionario DLQI en 5 de los 11 pacientes (45%). Las pruebas no paramétricas no mostraron significación estadística entre las puntuaciones

de calidad de vida antes y después del tratamiento. No obstante, la puntuación DLQI cobra especial importancia en la evaluación clínica de los tratamientos en una gran variedad de enfermedades dermatológicas. Según la literatura, un cambio entre 3 y 4 puntos en la puntuación DLQI es considerado clínicamente relevante en la práctica clínica (62) (63). En nuestro estudio, 3 pacientes mejoraron su DLQI en más de 4 puntos al finalizar el tratamiento con una media de mejora de $7,6 \pm 3,1$ puntos.

Los PROMs (Patient-Reported Outcome Measures) y PREMs (Patient-Reported Experience Measures) son herramientas fundamentales en el ámbito de la atención médica y farmacéutica, incluida la dermatología (64). En concreto, el cuestionario DLQI como PROM evalúa el impacto psicológico de las manifestaciones cutáneas de la esclerosis tuberosa, así como el picor, el dolor, la incomodidad y la limitación de las actividades diarias (51). La incorporación de PROMs en la práctica dermatológica y la atención farmacéutica permite una mejor comprensión de la efectividad del tratamiento y la calidad de la atención sanitaria recibida. Estos resultados también pueden ayudar a identificar posibles áreas de mejora en el proceso farmacoterapéutico y así satisfacer mejor las necesidades individuales de cada paciente.

En términos generales, la nueva formulación fue bien tolerada, con efectos adversos leves que desaparecieron al finalizar el tratamiento. En dos casos, el eritema fue categorizado como un efecto adverso moderado que llevó a la interrupción prematura del tratamiento. Ambos pacientes tenían antecedentes de piel con tendencia atópica. Los resultados de las pruebas hematológicas y farmacocinéticas confirmaron la ausencia de absorción sistémica del

sirólimus después de su administración tópica, lo que contribuyó a una mayor seguridad del tratamiento.

Comparar nuestros hallazgos con los estudios existentes resulta difícil debido a la considerable variabilidad en la evaluación de la efectividad. Los métodos de evaluación abarcan desde escalas validadas hasta opiniones subjetivas de los investigadores. De los cinco ensayos clínicos aleatorizados encontrados hasta la fecha en la literatura, solo dos estudios evaluaron la efectividad según escalas objetivas estandarizadas (24) (25), mostrando todos los pacientes tratados con sirólimus una mejora estadísticamente significativa según las puntuaciones FASI e IGA en comparación con placebo. En nuestro estudio, todos los pacientes que completaron el periodo de tratamiento de 24 semanas lograron una mejora estadísticamente significativa según las escalas objetivas y estas experiencias concuerdan con otros estudios publicados previamente. Asimismo, es importante destacar que, hasta la fecha de depósito de esta Tesis Doctoral, no se ha realizado ningún estudio de intervención que evalúe el uso de formulaciones liposomales de sirólimus tópico para tratar los AF en pacientes con ET.

El sirólimus es un fármaco peligroso y fototóxico, por lo que resulta esencial educar al paciente para garantizar una manipulación segura durante el tratamiento. Las condiciones idóneas de utilización del sirólimus tópico liposomal al 0,4% administrado tres veces por semana fueron las siguientes: aplicación con guante de nitrilo de una película ligera hasta la completa desaparición de la formulación en la piel preferiblemente por la tarde o la noche. Tras una exposición de entre dos y tres horas, lavar con agua y jabón neutro para eliminar

cualquier residuo de formulación y secar. Hidratar bien la zona y utilizar fotoprotección total durante todo el año. Evitar el tratamiento durante el periodo estival.

En experiencias previas, muchos pacientes expresaron dificultades al aplicarse formulaciones tipo pomada (65). La formulación liposomal ofreció mejoras en cuanto a características organolépticas, apariencia y sensación después de la aplicación, en comparación con la vaselina (Figura J). Además, se eliminó más fácilmente con agua y jabón que otras formulaciones por ser más liviana y ligera, lo que previno la irritación de la zona facial durante el proceso de limpieza. Todos estos beneficios pueden contribuir a aumentar la adherencia al tratamiento y mejorar la satisfacción del paciente con la terapia tópica.

Asimismo, los liposomas han sido estudiados como vehículos de moléculas para terapias inmunosupresoras y tratamientos de quimioterapia (66) (60). Se ha demostrado que el sirólimus vehiculizado en liposomas tiene la capacidad de llegar más rápidamente al lugar de acción del fármaco con un perfil de liberación mejorado. En formulaciones de administración tópica, los liposomas son capaces de proporcionar una mayor biodisponibilidad y penetración de la sustancia activa a través del estrato córneo, permitiendo una liberación hasta diez veces más rápida que formulaciones más básicas (49) (61). Esta propiedad los convierte en sistemas especialmente idóneos para aplicaciones farmacéuticas y cosméticas.

Tras la revisión sistemática, la optimización galénica y la evaluación clínica, la formulación liposomal de sirólimus al 0,4% se incluyó como fórmula magistral en la cartera de productos de la Unidad de Farmacotecnia del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

Esta investigación pone de manifiesto la oportunidad que supone la participación de los Servicios de Farmacia Hospitalaria en el tratamiento de las EERR en términos de optimización del proceso farmacoterapéutico. Su labor tiene especial relevancia en los procesos de evaluación, selección y adquisición de medicamentos, así como en la elaboración, formulación y dispensación, contribuyendo finalmente a un mayor seguimiento y control de estos pacientes.

En muchas ocasiones, la elaboración de medicamentos en la Unidad de Farmacotecnia es la única alternativa farmacológica posible para tratar los síntomas de las EERR y obtener mejores resultados en salud. El desarrollo galénico y la innovación terapéutica contribuyen a no dejar olvidados a pacientes vulnerables que padecen patologías poco prevalentes, especialmente cuando las opciones de tratamiento son limitadas o inadecuadas. La optimización galénica se convierte en innovación farmacéutica que también se puede traducir en innovación terapéutica, como ha demostrado este estudio. Resulta crucial dirigir la atención hacia la optimización de las fórmulas magistrales y la incorporación de nuevos sistemas de liberación de fármacos para la preparación de medicamentos en los Servicios de Farmacia Hospitalaria, de modo que cualquier aportación innovadora que mejore la terapéutica con buenos resultados resulte esperanzadora.

En el contexto específico de la esclerosis tuberosa, gracias a una colaboración interdisciplinar con los dermatólogos, los farmacéuticos hospitalarios pueden realizar un seguimiento clínico de los pacientes, y, a través de la atención farmacéutica, contribuir a mejorar la efectividad del tratamiento minimizando las posibles reacciones adversas.

El farmacéutico especialista debe posicionarse adecuadamente y servir de conexión entre el paciente y los resultados de la farmacoterapia, alcanzando, en última instancia, una integración completa y sólida del farmacéutico de hospital en el equipo multidisciplinar asistencial.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La revisión sistemática de inhibidores de mTOR para el tratamiento de los angiofibromas faciales asociados a esclerosis tuberosa posicionó al sirólimus tópico como el tratamiento farmacológico de elección, demostrando su eficacia y seguridad en la mayoría de los estudios. No obstante, la calidad de la evidencia recopilada fue limitada, siendo la mayoría de los estudios series de casos o casos aislados (nivel 5 de la escala CEBM).
2. En la evaluación de la efectividad se identificaron la escala FASI y el cuestionario DLQI como herramientas validadas, simples y reproducibles para determinar objetivamente la severidad de los angiofibromas faciales y evaluar la calidad de vida, respectivamente.
3. De acuerdo con la revisión de la literatura y la evidencia disponible, se decidió utilizar una concentración de sirólimus del 0,4% con una frecuencia de administración de tres veces por semana. Sin embargo, debido a la elevada variabilidad entre estudios, no fue posible establecer una forma farmacéutica idónea para la administración tópica.
4. La optimización galénica de la formulación tópica de sirólimus al 0,4% se logró abordando aspectos relacionados con el principio activo, el disolvente y el vehículo principal. La inclusión de sirólimus como materia prima condujo a mejoras en las características organolépticas del preparado final y a una reducción en el coste de la terapia en comparación con los comprimidos comercializados de sirólimus; la incorporación del Transcutol®P como disolvente permitió una distribución más homogénea del principio activo en el vehículo y una mayor biodisponibilidad del fármaco a través del estrato córneo, gracias a la elevada solubilidad del sirólimus en el Transcutol®P en contraste con

la parafina líquida; el objetivo de mejorar el vehículo principal llevó a la propuesta y diseño de cuatro posibles formulaciones de sirólimus al 0,4%: pomada, emulsión, gel y formulación liposomal. Esta última considerada como innovación galénica para la administración tópica de sirólimus.

5. Los estudios de estabilidad demostraron que únicamente una de las cuatro opciones propuestas, la formulación liposomal, mantuvo su estabilidad química, física y microbiológica a lo largo de 56 días. Tras la ampliación del estudio de estabilidad, se le otorgó un período de validez de 84 días entre 2 y 8 °C protegida de la luz. La estabilidad química de las formulaciones tipo pomada y gel se vio limitada por el T_{90} y la formulación tipo emulsión perdió su estabilidad física por rotura temprana de la emulsión. Todas las formulaciones mantuvieron su estabilidad microbiológica durante todo el período de muestreo.
6. La calidad de la formulación liposomal fue confirmada mediante la caracterización de los liposomas formados, demostrando la obtención de vesículas unilamelares con un tamaño medio de partícula de 178,9 nm. El sistema resultó homogéneo, con un índice de polidispersión de 0,093, y eléctricamente estable, presentando un potencial Z de -41,1 mV. La eficiencia de encapsulación alcanzó el 89,19%, confirmando una elevada capacidad de encapsulación del sirólimus en las nanovesículas liposomales.
7. La evaluación clínica demostró que el sirólimus tópico liposomal al 0,4% fue efectivo para el tratamiento de los angiofibromas faciales asociados a esclerosis tuberosa en 8 de 11 pacientes (73%). Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las

puntuaciones FASI, IGA, y las subcategorías de eritema y tamaño de los angiofibromas antes y después del tratamiento.

8. Cinco de los 11 pacientes (45%) mejoraron su calidad de vida según el cuestionario DLQI. En tres de ellos, la mejoría en el DLQI se consideró clínicamente relevante al obtener un cambio de al menos 4 puntos al finalizar el tratamiento, con una media de mejora de 7,6 puntos.
9. La formulación tópica liposomal de sirólimus al 0,4% fue bien tolerada, con efectos adversos leves como prurito o sensación de tirantez que desaparecieron al finalizar el tratamiento. En dos casos, el eritema fue reportado como un efecto adverso moderado que llevó a la interrupción prematura de la terapia. Ambos pacientes tenían antecedentes de piel con tendencia atópica. Los resultados de las pruebas hematológicas y farmacocinéticas confirmaron la ausencia de absorción sistémica del principio activo después de su administración tópica, lo que contribuyó a una mayor seguridad del sirólimus tópico liposomal.
10. Tras la revisión sistemática, la optimización galénica y la evaluación clínica, el sirólimus tópico liposomal al 0,4% se incluyó como fórmula magistral disponible en la Guía Farmacoterapéutica del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia, cubriendo una necesidad médica en el tratamiento de las manifestaciones cutáneas de la enfermedad rara conocida como esclerosis tuberosa.

PRINCIPALES LIMITACIONES

PRINCIPALES LIMITACIONES

Las limitaciones de la revisión sistemática de la evidencia disponible radican en la escasa cantidad de literatura publicada sobre el tratamiento de los AF en la ET con inhibidores de mTOR. La mayoría de los trabajos estudiados incluyen un número limitado de pacientes, principalmente informes de casos clínicos aislados, lo que dificulta establecer decisiones terapéuticas precisas basadas en la evidencia. A pesar del reducido número de publicaciones incluidas, 30 en total, la fase de revisión sistemática ofrece información completamente actualizada sobre el tema hasta la fecha de publicación del artículo. Cabe destacar que un quinto ensayo clínico aleatorizado de relevancia se publicó en 2023, posterior a esta revisión, y no fue incluido en la misma (25). A pesar de ello, toda esta recopilación de información puede resultar valiosa para otros investigadores y profesionales de la salud en la toma de decisiones clínicas y terapéuticas.

Durante la fase de optimización galénica se identifica una importante variabilidad en los resultados de estabilidad química de las formulaciones, la cual se atribuye a la difícil homogeneización de todos los componentes durante el proceso de elaboración y a la extracción del principio activo a partir de los solventes, que depende tanto del tipo de formulación como de sus excipientes. De hecho, la capacidad de extracción del sirólimus a partir de la formulación liposomal es mucho más dificultosa en comparación con el resto de las formulaciones ensayadas.

El estudio observacional de efectividad y seguridad de la formulación liposomal presenta un tamaño de muestra reducido, lo cual puede suponer ciertas limitaciones que podrían afectar a la validez y la extrapolación de los resultados. La metodología utilizada y las pruebas estadísticas aplicadas han tenido en cuenta el problema del tamaño muestral ($n < 30$), al igual que otros estudios preliminares en este campo. Resulta importante recalcar que la esclerosis tuberosa es una enfermedad rara de baja prevalencia (menos de 1 de cada 2.000 personas), lo que dificulta considerablemente el reclutamiento de pacientes y el estudio de nuevas terapias para esta indicación.

NUEVAS PERSPECTIVAS

NUEVAS PERSPECTIVAS

Tras confirmarse la idoneidad del sirólimus tópico en el tratamiento de los AF asociados a la ET, no parece adecuado explorar nuevas formulaciones con otros inhibidores de mTOR. En cambio, futuros proyectos podrían enfocarse en conocer el perfil de liberación del sirólimus cuando se incorpora a los liposomas, con el objetivo de estudiar su absorción transdérmica a través del estrato córneo. Estudios previos han confirmado que liposomas similares son capaces de proporcionar una mayor biodisponibilidad y penetración de la sustancia activa a través de la piel, permitiendo una liberación hasta diez veces más rápida que formulaciones menos complejas. Este aspecto podría verse confirmado en la formulación liposomal estudiada con futuras investigaciones en el campo específico de la dermocinética.

En cualquier caso, la optimización de fórmulas magistrales y el desarrollo galénico en los Servicios de Farmacia Hospitalaria podría centrarse en la incorporación de nuevos sistemas de liberación de fármacos para la preparación de medicamentos, con la posibilidad de encapsular numerosas moléculas de cualquier naturaleza e incluir este tipo de formas farmacéuticas como alternativa terapéutica en determinadas indicaciones.

La efectividad y la seguridad del sirólimus tópico liposomal al 0,4% ha quedado demostrada tras el estudio observacional durante 24 semanas realizado a 11 sujetos. Dos pacientes en nuestro estudio no respondieron adecuadamente y suspendieron el tratamiento por reacciones adversas. En este sentido, podrían explorarse otras concentraciones u otras frecuencias de administración con el objetivo de optimizar la respuesta y la tolerancia. Cabe

destacar que los pacientes no reciben el tratamiento de forma continua, sino que interrumpen durante los meses de verano para reducir al mínimo o prevenir en la medida de lo posible los eventos adversos asociados a la fototoxicidad del principio activo. No obstante, también sería valioso realizar estudios clínicos a largo plazo para confirmar los resultados obtenidos y su impacto definitivo en la calidad de vida de los pacientes.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A: PNT SIRÓLIMUS POMADA 0,4%

SIRÓLIMUS POMADA 0,4%			Cantidad a elaborar: 20g	
Producto:		Cantidad	Total	Nº de lote
Fase I	Sirólimus	0,4%		
	Transcutol® P	10%		
Fase II	Lanolina	10%		
	Manteca de karité	20%		
	Vitamina E	1%		
Fase III	Vaselina c.s.p	20g		
MODUS OPERANDI				
Orden	Procedimiento:			
1	Pesar el sirólimus en tubo de vidrio y añadir el Transcutol®P; vortear hasta que se disuelva.			
2	Mezclar la fase II al baño maría hasta completa disolución de todos los componentes.			
3	Calentar al baño maría la vaselina. Añadir la fase II a la fase III. Agitar con varilla de vidrio.			
4	Añadir la fase I al resto de fases continuando con la agitación hasta completa homogeneización.			
Protección para el manipulador: Guantes, mascarilla, bata, Cabina de seguridad biológica (CSB-I)				

Utillaje utilizado: Balanza, Espátula, tubo de vidrio, varilla de vidrio, vaso de precipitados, baño maría, CSB-I.	
CONTROL DE CALIDAD: Características organolépticas, pH Características del producto acabado: pomada blanquecina-amarillento opaca, pH de 7.	RESULTADOS
PERSONAL ELABORADOR:	FECHA Y FIRMA DEL RESPONSABLE
INFORMACIÓN ADICIONAL PARA LA ELABORACIÓN DEL PROSPECTO	
INDICACIONES Y POSOLOGÍA: angiofibromas faciales en esclerosis tuberosa. 1 aplicación 3 veces por semana (una película ligera hasta que desaparezca la formulación en la piel) preferiblemente por la tarde-noche. Dejar actuar durante 2-3 horas. A continuación, lavar con agua y jabón neutro y secar bien. Aplicar crema hidratante. CONSERVACIÓN En condiciones óptimas, el plazo de validez es de 42 días, según estudio de estabilidad física, química y microbiológica. Guardar en envase bien cerrado, protegido de la luz, y a temperatura entre 2-8 °C. REACCIONES ADVERSAS: eritema, enrojecimiento, tirantez. PRECAUCIONES ESPECIALES: recomendable evitar el tratamiento durante los meses de verano. Fotoprotección 50 FPS durante todo el año. Hidratación adecuada de la piel expuesta al fármaco. CONTRAINDICADO EN EL EMBARAZO/LACTANCIA	

BIBLIOGRAFÍA:

1. Cortell Fuster C, Martínez Gómez MA, Cercós Lleti AC, et al. Topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis: a systematic review based on evidence. *J Dermatolog Treat* 2022 Jun;33(4):1804-1810.
2. Cortell C, Martinez MA, Molina C, et al. Physical, chemical, and microbiological stability of sirolimus 0.4% in topical formulations. Abstract Book 24th EAHP Congress Barcelona, Spain; 2019. p. A50. 10.1136/ejhpharm-2019-eahpconf.111. https://www.eahp.eu/sites/default/files/abstract_book_-_bar19.pdf Accessed November 2023.
3. Cortell C, Martínez MA, Cercós AC, et al. Topical rapamycin in rare tuberous sclerosis disease: liposomal formulation stability. Abstract Book 27th EAHP Congress Lisbon, Portugal; 2023. p. 182. 10.1136/ejhpharm-2023-eahp.377. https://www.eahp.eu/sites/default/files/congresses/27ac_-_eahp_abstract_book_-_online_-_post_congress.pdf
4. Cortell-Fuster C, Martínez-Gómez MA, Cercós-Lleti AC, et al. Optimization, Formulation, and Stability of Topical Rapamycin Used for Rare Tuberous Sclerosis Disease: from Ointment to Liposomes. *Journal of Pharmaceutical Innovation* 2023.

ANEXO B. PNT SIRÓLIMUS EMULSIÓN 0,4%

SIRÓLIMUS EMULSIÓN 0,4%			Cantidad a elaborar: 20g	
Producto:		Cantidad	Total	Nº de lote
Fase I	Sirólimus	0,4%		
	Transcutol® P	10%		
Fase II	Base autoemulsionable W/O	20%		
Fase III	Agua c.s.p.	20g		
MODUS OPERANDI				
Orden	Procedimiento:			
1	Pesar el sirólimus en tubo de vidrio y añadir el Transcutol® P; vortear hasta que se disuelva.			
2	Calentar la fase II al baño maría y agitar con varilla de vidrio hasta completa disolución.			
3	Añadir la fase I a la fase II lentamente y manteniendo la agitación.			
4	Añadir la fase III lentamente con agitación vigorosa hasta la formación de la emulsión.			
Protección para el manipulador: Guantes, mascarilla, bata, Cabina de seguridad biológica (CSB-I)				
Utillaje utilizado: Balanza, espátula, tubo de vidrio, varilla de vidrio, vaso de precipitados, baño maría, CSB-I.				

CONTROL DE CALIDAD: Características organolépticas, pH Características del producto acabado: emulsión blanquecina, pH de 6.		RESULTADOS
PERSONAL ELABORADOR:	FECHA Y FIRMA DEL RESPONSABLE	
INFORMACIÓN ADICIONAL PARA LA ELABORACIÓN DEL PROSPECTO		
INDICACIONES Y POSOLOGÍA: angiofibromas faciales en esclerosis tuberosa. 1 aplicación 3 veces por semana (una película ligera hasta que desaparezca la formulación en la piel) preferiblemente por la tarde-noche. Dejar actuar durante 2-3 horas. A continuación, lavar con agua y jabón neutro y secar bien. Aplicar crema hidratante. CONSERVACIÓN En condiciones óptimas, el plazo de validez es de 7 días, según estudio de estabilidad física, química y microbiológica. Guardar en envase bien cerrado, protegido de la luz, y a temperatura entre 2-8 °C. REACCIONES ADVERSAS: eritema, enrojecimiento, tirantez. PRECAUCIONES ESPECIALES: recomendable evitar el tratamiento durante los meses de verano. Fotoprotección 50 FPS durante todo el año. Hidratación adecuada de la piel expuesta al fármaco. CONTRAINDICADO EN EL EMBARAZO/LACTANCIA BIBLIOGRAFÍA:		

1. Cortell Fuster C, Martínez Gómez MA, Cercós Lleti AC, et all. Topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis: a systematic review based on evidence. J Dermatolog Treat 2022 Jun;33(4):1804-1810.
2. Cortell C, Martinez MA, Molina C, et al. Physical, chemical, and microbiological stability of sirolimus 0.4% in topical formulations. Abstract Book 24th EAHP Congress Barcelona, Spain; 2019. p. A50. 10.1136/ejhpharm-2019-eahpconf.111. https://www.eahp.eu/sites/default/files/abstract_book_-_bar19.pdf Accessed November 2023
3. Cortell C, Martínez MA, Cercós AC, et al. Topical rapamycin in rare tuberous sclerosis disease: liposomal formulation stability. Abstract Book 27th EAHP Congress Lisbon, Portugal; 2023. p. 182. 10.1136/ejhpharm-2023-eahp.377. https://www.eahp.eu/sites/default/files/congresses/27ac_-_eahp_abstract_book_-_online_-_post_congress.pdf
4. Cortell-Fuster C, Martínez-Gómez MA, Cercós-Lleti AC, et al. Optimization, Formulation, and Stability of Topical Rapamycin Used for Rare Tuberous Sclerosis Disease: from Ointment to Liposomes. Journal of Pharmaceutical Innovation 2023.

ANEXO C. PNT SIRÓLIMUS GEL 0,4%

SIRÓLIMUS GEL 0,4%			Cantidad a elaborar: 20g	
Producto:		Cantidad	Total	Nº de lote
Fase I	Sirólimus	0,4%		
	Transcutol® P	10%		
Fase II	Hidroxipropilmetilcelulosa	2%		
	Agua c.s.p.	20g		
MODUS OPERANDI				
Orden	Procedimiento:			
1	Pesar el sirólimus en tubo de vidrio y añadir el Transcutol® P; vortear hasta que se disuelva.			
2	Mezclar la fase II en agitador magnético hasta completa disolución de la hidroxipropilmetilcelulosa en el agua.			
3	Añadir la fase I a la fase II lentamente y manteniendo la agitación.			
4	Dejar reposar durante 24 horas a 2-8° C para mejorar la consistencia del gel.			
Protección para el manipulador: Guantes, mascarilla, bata, Cabina de seguridad biológica de flujo laminar vertical (CSB-I)				
Utillaje utilizado: Balanza, Espátula, tubo de vidrio, vaso de precipitados, agitador magnético, CSB-I.				

CONTROL DE CALIDAD: Características organolépticas, pH Características del producto acabado: gel transparente, pH de 6.		RESULTADOS
PERSONAL ELABORADOR:	FECHA Y FIRMA DEL RESPONSABLE	
INFORMACIÓN ADICIONAL PARA LA ELABORACIÓN DEL PROSPECTO		
INDICACIONES Y POSOLOGÍA: angiofibromas faciales en esclerosis tuberosa. 1 aplicación 3 veces por semana (una película ligera hasta que desaparezca la formulación en la piel) preferiblemente por la tarde-noche. Dejar actuar durante 2-3 horas. A continuación, lavar con agua y jabón neutro y secar bien. Aplicar crema hidratante. CONSERVACIÓN En condiciones óptimas, el plazo de validez es de 14 días, según estudio de estabilidad física, química y microbiológica. Guardar en envase bien cerrado, protegido de la luz, y a temperatura entre 2-8 °C. REACCIONES ADVERSAS: eritema, enrojecimiento, tirantez. PRECAUCIONES ESPECIALES: recomendable evitar el tratamiento durante los meses de verano. Fotoprotección 50 FPS durante todo el año. Hidratación adecuada de la piel expuesta al fármaco. CONTRAINDICADO EN EL EMBARAZO/LACTANCIA BIBLIOGRAFÍA:		

1. Cortell Fuster C, Martínez Gómez MA, Cercós Lleti AC, et all. Topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis: a systematic review based on evidence. J Dermatolog Treat 2022 Jun;33(4):1804-1810.
2. Cortell C, Martinez MA, Molina C, et al. Physical, chemical, and microbiological stability of sirolimus 0.4% in topical formulations. Abstract Book 24th EAHP Congress Barcelona, Spain; 2019. p. A50. 10.1136/ejhpharm-2019-eahpconf.111. https://www.eahp.eu/sites/default/files/abstract_book_-_bar19.pdf Accessed November 2023
3. Cortell C, Martínez MA, Cercós AC, et al. Topical rapamycin in rare tuberous sclerosis disease: liposomal formulation stability. Abstract Book 27th EAHP Congress Lisbon, Portugal; 2023. p. 182. 10.1136/ejhpharm-2023-eahp.377. https://www.eahp.eu/sites/default/files/congresses/27ac_-_eahp_abstract_book_-_online_-_post_congress.pdf
4. Cortell-Fuster C, Martínez-Gómez MA, Cercós-Lleti AC, et al. Optimization, Formulation, and Stability of Topical Rapamycin Used for Rare Tuberous Sclerosis Disease: from Ointment to Liposomes. Journal of Pharmaceutical Innovation 2023.

ANEXO D. PNT SIRÓLIMUS LIPOSOMAL 0,4%

SIRÓLIMUS LIPOSOMAL 0,4%			Cantidad a elaborar: 20g	
Producto:		Cantidad	Total	Nº de lote
Fase I	Solución liposomal: Guinoxome®	25%		
	Colesterol	0,1%		
Fase II	Sirólimus	0,4%		
	Transcutol® P	3%		
Fase III	Miristrato isopropilo	10%		
Fase IV	Propilenglicol	10%		
Fase V	Agua purificada c.s.p.	49,5%		
Fase VI	NaOH 10%	c.s.p. pH 7-7,5		
Fase VII	Carbopol	2%		
MODUS OPERANDI				
Orden	Procedimiento:			
1	Disolver el colesterol en la solución liposomal en un vaso de precipitados y un imán con agitador magnético.			
2	Pesar el sirólimus en tubo de vidrio y añadir el Transcutol® P; vortear hasta que se disuelva. Añadir la Fase II a la Fase I. Homogeneizar con agitador magnético hasta que se incorpore.			
3	Añadir el miristrato de isopropilo (Fase III) y el propilenglicol (Fase IV) y agitar unos 10 minutos hasta que se integren bien los componentes.			
4	Añadir el agua muy poco a poco, y mantener en agitador magnético 30 min a 1000 rpm.			
5	Medir el pH, y si es necesario, añadir NaOH 10% para llevar a pH 7 – 7,5. Esto incrementa la estabilidad de los liposomas en el tiempo.			

6	Dejar reposar 20 minutos y filtrar con filtro de 0,22 micras para extrusionarlos.	
7	Incorporar el carbopol y homogeneizar con varilla o agitador magnético hasta que espese.	
8	Dejar reposar en nevera durante 24h. Al día siguiente homogeneizar con varilla ligeramente hasta obtener una textura tipo gel. Envasar en frascos de 20g opacos.	
Protección para el manipulador: Guantes, mascarilla, bata, Cabina de seguridad biológica de flujo laminar vertical (CSB-I)		
Utillaje utilizado: Balanza, Espátula, agitador magnético, vaso de precipitados, CSB-I.		
CONTROL DE CALIDAD: Características organolépticas, pH. Características del producto acabado: gel blanquecino-amarillento opaco, pH de 7-8. Con contenido alcohólico.		RESULTADOS
PERSONAL ELABORADOR:		FECHA Y FIRMA DEL RESPONSABLE
INFORMACIÓN ADICIONAL PARA LA ELABORACIÓN DEL PROSPECTO		
INDICACIONES Y POSOLOGÍA: angiofibromas faciales en esclerosis tuberosa. 1 aplicación 3 veces por semana con guante de nitrilo (una película ligera hasta que desaparezca la formulación en la piel), preferiblemente por la tarde-noche. Dejar actuar durante 2-3 horas. A continuación, lavar con agua y jabón neutro y secar bien. Aplicar crema hidratante.		
CONSERVACIÓN: En condiciones óptimas, el plazo de validez es de 84 días, según estudio de estabilidad física, química y microbiológica. Guardar en envase bien cerrado, protegido de la luz, y a temperatura entre 2-8 °C.		
REACCIONES ADVERSAS: Eritema, enrojecimiento, tirantez.		
PRECAUCIONES ESPECIALES:		

Es recomendable evitar el tratamiento durante los meses de verano. Fotoprotección 50 FPS durante todo el año. Hidratación adecuada de la piel expuesta al fármaco.

CONTRAINDICADO EN EL EMBARAZO/LACTANCIA

ENSAYOS REALIZADOS:

Ensayo de EE (%) $\pm$ DS = **89.19 $\pm$ 4.57**

Tamaño medio de partícula = **178.9 nm**, Pdl 0.093

Potencial zeta (mV) $\pm$ DS = **-41.1 $\pm$ 13.4**

EE: Eficiencia de Encapsulación

DS: Desviación Standard

BIBLIOGRAFÍA:

1. Cortell Fuster C, Martínez Gómez MA, Cercós Lleti AC, et al. Topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis: a systematic review based on evidence. J Dermatolog Treat 2022 Jun;33(4):1804-1810.
2. Cortell C, Martinez MA, Molina C, et al. Physical, chemical, and microbiological stability of sirolimus 0.4% in topical formulations. Abstract Book 24th EAHP Congress Barcelona, Spain; 2019. p. A50. 10.1136/ejhpharm-2019-eahpconf.111.
https://www.eahp.eu/sites/default/files/abstract_book_-_bar19.pdf Accessed November 2023.
3. Cortell C, Martínez MA, Cercós AC, et al. Topical rapamycin in rare tuberous sclerosis disease: liposomal formulation stability. Abstract Book 27th EAHP Congress Lisbon, Portugal; 2023. p. 182. 10.1136/ejhpharm-2023-eahp.377.
https://www.eahp.eu/sites/default/files/congresses/27ac_-_eahp_abstract_book_-_online_-_post_congress.pdf
4. Cortell-Fuster C, Martínez-Gómez MA, Cercós-Lleti AC, et al. Optimization, Formulation, and Stability of Topical Rapamycin Used for Rare Tuberous Sclerosis Disease: from Ointment to Liposomes. Journal of Pharmaceutical Innovation 2023.

ANEXO E HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Unidad de Atención Farmacéutica a Pacientes Externos (UFPE)
Servicio de Farmacia - Hospital Universitario Doctor Peset, Valencia

SIRÓLIMUS LIPOSOMAL 0,4%

¿Qué es y para qué se utiliza?

El sirólimus (rapamicina) en aplicación tópica es un inmunosupresor de la familia mTOR que se utiliza para el tratamiento local de los angiofibromas faciales en pacientes con esclerosis tuberosa.

¿Cómo se debe conservar?

Conservar en nevera (entre 2 y 8 °C). No congelar. Caducidad: 84 días.

¿Cómo se administra?

El sirólimus liposomal al 0,4% se administra vía tópica tres veces por semana: por ejemplo, lunes, miércoles y viernes por la tarde-noche. Su textura gel permite una excelente aplicación y absorción sobre las afecciones cutáneas en mejillas, nariz y mentón. Utilizar un guante de nitrilo y aplicar una pequeña cantidad hasta la completa absorción del gel. Tras la administración esperar 2-3 horas y lavar con agua y jabón neutro para retirar cualquier resto de formulación, secar bien y aplicar una crema hidratante.

¿Qué hacer si se olvida una aplicación?

Si olvida una administración, aplíquese la formulación tan pronto como sea posible. Recuerde que la posología recomendada es tres veces por semana.

¿Qué efectos adversos pueden aparecer durante el tratamiento?

En la zona de aplicación puede aparecer enrojecimiento, picor o rubor. En casos excepcionales puede producirse un exantema por exposición solar prolongada. Recuerde que el sirólimus es un medicamento fototóxico. Evite la exposición al sol, y use cremas fotoprotectoras de FPS 50. No se recomienda la administración de este tratamiento durante el periodo estival.

Y recuerde...

- Administre este tratamiento exactamente como le ha indicado su médico/farmacéutico.
- Este medicamento se le ha prescrito a usted personalmente y no debe ser utilizado por otras personas ya que puede perjudicarle, aunque tenga síntomas similares a los suyos.
- Informe a su médico o farmacéutico si está tomando o ha tomado recientemente otros medicamentos, incluso los adquiridos sin receta.
- Este medicamento está contraindicado en el embarazo/lactancia.
- Mantenga sus medicamentos fuera de la vista y del alcance de los niños. No utilice su medicamento una vez superada su fecha de caducidad.
- Devuelva la medicación no utilizada al Servicio de Farmacia.

ANEXO F. CUESTIONARIO DE CALIDAD DE VIDA DLQI

1. Durante el último mes, ¿ha sentido picor, inflamación, dolor o escozor en su piel?
 - a. Muchísimo
 - b. Mucho
 - c. Un poco
 - d. En absoluto
2. Durante el último mes, ¿se ha sentido incómodo/a o cohibido/a a causa de sus problemas de piel?
 - a. Muchísimo
 - b. Mucho
 - c. Un poco
 - d. En absoluto
3. Durante el último mes, ¿sus problemas de piel le han interferido en ir de compras o en la realización de actividades domésticas?
 - a. Muchísimo
 - b. Mucho
 - c. Un poco
 - d. En absoluto
4. Durante el último mes, ¿sus problemas de piel han influido en la ropa/maquillaje/peinado que llevaba?
 - a. Muchísimo
 - b. Mucho
 - c. Un poco
 - d. En absoluto
5. Durante el último mes, ¿sus problemas de piel han afectado a alguna actividad social o de ocio?
 - a. Muchísimo
 - b. Mucho
 - c. Un poco
 - d. En absoluto
6. Durante el último mes, ¿le ha sido difícil practicar un deporte a causa de sus problemas de piel?
 - a. Muchísimo
 - b. Mucho
 - c. Un poco
 - d. En absoluto

7. Durante el último mes, ¿sus problemas de piel le han impedido trabajar o estudiar?
 - a. Muchísimo
 - b. Mucho
 - c. Un poco
 - d. En absoluto
8. Durante el último mes, ¿su piel le ha causado problemas con su pareja o algún amigo/a íntimo/a o pariente?
 - a. Muchísimo
 - b. Mucho
 - c. Un poco
 - d. En absoluto
9. Durante el último mes, ¿sus problemas de piel le han dificultado su vida sexual?
 - a. Muchísimo
 - b. Mucho
 - c. Un poco
 - d. En absoluto
10. Durante el último mes, ¿el tratamiento de su piel ha sido un problema para usted, por ejemplo porque ha ensuciado la casa o le ha quitado tiempo?
 - a. Muchísimo
 - b. Mucho
 - c. Un poco
 - d. En absoluto

Puntuación DLQI
a. 3 puntos
b. 2 puntos
c. 1 punto
d. 0 puntos
<i>Máxima puntuación = 30 puntos</i>

ANEXO G. EJEMPLOS DE APARIENCIA DE LOS ANGIOFIBROMAS FACIALES ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet* 2008 Aug 23;372(9639):657-668.
- (2) Salido-Vallejo R, Garnacho-Saucedo G, Moreno-Gimenez JC. Current options for the treatment of facial angiofibromas. *Actas Dermosifiliogr* 2014;105(6):558-568.
- (3) Jozwiak S, Sadowski K, Kotulska K, Schwartz RA. Topical Use of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitors in Tuberous Sclerosis Complex-A Comprehensive Review of the Literature. *Pediatr Neurol* 2016 Aug;61:21-27.
- (4) Gallardo-Tur A, García-Martín G, Chamorro-Muñoz MI, Romero-Godoy J, Romero-Acebal M. Control of epilepsy in adult patients with tuberous sclerosis. *Rev Neurol* 2013 Jun 1;56(11):562-566.
- (5) Narayanan V. Tuberous sclerosis complex: genetics to pathogenesis. *Pediatr Neurol* 2003 Nov;29(5):404-409.
- (6) Balestri R, Neri I, Patrizi A, Angileri L, Ricci L, Magnano M. Analysis of current data on the use of topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis complex. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015 Jan;29(1):14-20.
- (7) Rumsey N, Clarke A, White P. Exploring the psychosocial concerns of outpatients with disfiguring conditions. *J Wound Care* 2003 Jul;12(7):247-252.

- (8) Zweegers J, van der Vleuten CJ. The psychosocial impact of an infantile haemangioma on children and their parents. *Arch Dis Child* 2012 Oct;97(10):922-926.
- (9) Muzykewicz DA, Newberry P, Danforth N, Halpern EF, Thiele EA. Psychiatric comorbid conditions in a clinic population of 241 patients with tuberous sclerosis complex. *Epilepsy Behav* 2007 Dec;11(4):506-513.
- (10) Prather P, de Vries PJ. Behavioral and cognitive aspects of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2004 Sep;19(9):666-674.
- (11) Patrick DL, Topolski TD, Edwards TC, Aspinall CL, Kapp-Simon KA, Rumsey NJ, et al. Measuring the quality of life of youth with facial differences. *Cleft Palate Craniofac J* 2007 Sep;44(5):538-547.
- (12) Biondo G, Greco S, Mavilia L, Mercuri SR. Treatment of nodular facial angiofibromas in tuberous sclerosis, using ultrapulse carbon dioxide laser. *Clin Exp Dermatol* 2014 Aug;39(6):738-740.
- (13) Wang L, Gao L, Abe T, Mizoguchi M. Effects of tranilast on angiofibromas of tuberous sclerosis. *Pediatr Int* 1999 Dec;41(6):701-703.
- (14) Türkmen M, Ertam I, Unal I, Dereli T. Facial angiofibromas of tuberous sclerosis: successful treatment with podophyllin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009 Jun;23(6):713-714.

- (15) Dabora SL, Franz DN, Ashwal S, Sagalowsky A, DiMario FJJ, Miles D, et al. Multicenter phase 2 trial of sirolimus for tuberous sclerosis: kidney angiomyolipomas and other tumors regress and VEGF- D levels decrease. PLoS One 2011;6(9):e23379.
- (16) Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Rapamune. Ficha Técnica del Medicamento. Disponible en:
https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/01171009/FT_01171009.html.pdf.
- (17) Ministerio de Sanidad y Política social. Real Decreto 1015/2009, de 19 de junio, por el que se regula la disponibilidad de medicamentos en situaciones especiales. 20 de julio de 2009.
- (18) Hofbauer GF, Marcollo-Pini A, Corsenca A, Kistler AD, French LE, Wuthrich RP, et al. The mTOR inhibitor rapamycin significantly improves facial angiofibroma lesions in a patient with tuberous sclerosis. Br J Dermatol 2008 Aug;159(2):473-475.
- (19) DeKlotz CM, Ogram AE, Singh S, Dronavalli S, MacGregor JL. Dramatic improvement of facial angiofibromas in tuberous sclerosis with topical rapamycin: optimizing a treatment protocol. Arch Dermatol 2011 Sep;147(9):1116-1117.
- (20) Micozkadioglu H, Koc Z, Ozelsancak R, Yildiz I. Rapamycin therapy for renal, brain, and skin lesions in a tuberous sclerosis patient. Ren Fail 2010;32(10):1233-1236.
- (21) Koenig MK, Hebert AA, Roberson J, Samuels J, Slopis J, Woerner A, et al. Topical rapamycin therapy to alleviate the cutaneous manifestations of tuberous sclerosis complex: a double-blind, randomized, controlled trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied rapamycin. Drugs R D 2012 Sep 1;12(3):121-126.

(22) Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Tanaka M, Hayashi M, Matsumoto S, Yamamoto K, et al. Efficacy and Safety of Topical Sirolimus Therapy for Facial Angiofibromas in the Tuberous Sclerosis Complex : A Randomized Clinical Trial. JAMA Dermatol 2017 Jan 1;153(1):39-48.

(23) Koenig MK, Bell CS, Hebert AA, Roberson J, Samuels JA, Slopis JM, et al. Efficacy and Safety of Topical Rapamycin in Patients With Facial Angiofibromas Secondary to Tuberous Sclerosis Complex: The TREATMENT Randomized Clinical Trial. JAMA Dermatol 2018 Jul 1;154(7):773-780.

(24) Chen PL, Hong JB, Shen LJ, Chen YT, Wang SJ, Liao YH. The efficacy and safety of topical rapamycin-calcitriol for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex: a prospective, double-blind, randomized clinical trial. Br J Dermatol 2020 Oct;183(4):655-663.

(25) Aitken P, Stanescu I, Boddington L, Mahon C, Fogarasi A, Liao Y, et al. A novel rapamycin cream formulation improves facial angiofibromas associated with tuberous sclerosis complex: a double-blind randomized placebo-controlled trial. Br J Dermatol 2023 Oct 25;189(5):520-530.

(26) Dirección General De Cartera Básica De Servicios Del SNS y Farmacia Subdirección General De Calidad De Medicamentos Y Productos Sanitarios. Guía de buenas prácticas de preparación de medicamentos en servicios de farmacia hospitalaria. 2014; Disponible en: https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP_JUNIO_2014_VF.pdf.

(27) Sackett DL, Rosenberg WM, Gray JA, Haynes RB, Richardson WS. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. BMJ 1996 Jan 13;312(7023):71-72.

- (28) Howick, Jeremy. Centre for Evidence-Based Medicine (Oxford). Levels of Evidence, Oxford Centre for Evidence-based Medicine. March 2009. Available in: <https://www.cebm.net/2009/06/oxford-centre-evidence-based-medicine-levels-evidence-march-2009/>. 2009
- (29) Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH List of Antineoplastic and Other Hazardous Drugs in Healthcare Settings, 2014. Available at: https://www.cdc.gov/niosh/docs/2014-138/pdfs/2014-138_v3.pdf.
- (30) Cuevas Asencio I, Albornoz Lopez R, Salido Vallejo R, Reyes Malia M. Topical sirolimus 0.4% formulation for treatment of facial angiofibromas. *Farm Hosp* 2012;36(5):433-434.
- (31) Scalia S, Franceschinis E, Bertelli D, Iannuccelli V. Comparative evaluation of the effect of permeation enhancers, lipid nanoparticles and colloidal silica on in vivo human skin penetration of quercetin. *Skin Pharmacol Physiol* 2013;26(2):57-67.
- (32) Mura P, Faucci MT, Bramanti G, Corti P. Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. *Eur J Pharm Sci* 2000 Feb;9(4):365-372.
- (33) Bougueon G, Lagarce F, Martin L, Pailhories H, Bastiat G, Vrignaud S. Formulation and characterization of a 0.1% rapamycin cream for the treatment of Tuberous Sclerosis Complex-related angiofibromas. *Int J Pharm* 2016 Jul 25;509(1-2):279-284.

(34) Le Guyader G, Vieillard V, Andrieux K, Rollo M, Thirion O, Wolkenstein P, et al. Long-term stability of 0.1% rapamycin hydrophilic gel in the treatment of facial angiofibromas. *Eur J Hosp Pharm* 2020 Mar;27(e1):e48–e52.

(35) Hatano T, Ohno Y, Imai Y, Moritake J, Endo K, Tamari M, et al. Improved health-related quality of life in patients treated with topical sirolimus for facial angiofibroma associated with tuberous sclerosis complex. *Orphanet J Rare Dis* 2020 Jun 1;15(1):133–5.

(36) Okanishi T, Fujimoto A, Enoki H, Ogai M. Early Sirolimus Gel Treatment May Diminish Angiofibromas and Prevent Angiofibroma Recurrence in Children With Tuberous Sclerosis Complex. *Front Med (Lausanne)* 2020 Jan 22;7:1.

(37) Tanaka M, Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I. First left-right comparative study of topical rapamycin vs. vehicle for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex. *Br J Dermatol* 2013 Dec;169(6):1314–1318.

(38) Ghanbarzadeh S, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Application of response surface methodology in development of sirolimus liposomes prepared by thin film hydration technique. *Bioimpacts* 2013;3(2):75–81.

(39) Ghanbarzadeh S, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. *Adv Pharm Bull* 2013;3(1):25–29.

(40) Truchuelo T, Diaz-Ley B, Rios L, Alcantara J, Jaen P. Facial angiofibromas treated with topical rapamycin: an excellent choice with fast response. *Dermatol Online J* 2012 Jan 15;18(1):15.

- (41) Kaufman McNamara E, Curtis AR, Fleischer AB, Jr. Successful treatment of angiofibromata of tuberous sclerosis complex with rapamycin. *J Dermatolog Treat* 2012 Feb;23(1):46-48.
- (42) Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 2013 Feb 22;8(1):102-102.
- (43) Gonzalez Gomez A, Hosseinidoust Z. Liposomes for Antibiotic Encapsulation and Delivery. *ACS Infect Dis* 2020 May 8;6(5):896-908.
- (44) BANGHAM AD, HORNE RW. Negative Staining of Phospholipids and their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J Mol Biol* 1964 May;8:660-668.
- (45) International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2015, 6-12.
- (46) Ministry of Health, Consumption and Social Welfare, by mandate of Law 29/2006, of July 26, on guarantee and rational use of medicines and health products. National Drug Formulary. 2019; Available at: https://www.boe.es/biblioteca_juridica/abrir_pdf.php?id=PUB-NT-2019-112.
- (47) Ministry of Health, Consumption and Social Welfare. Guide to Good Practice of Preparation of Medications in Hospital Pharmacy Services. 2014 , June: <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/farmacia/pdf/GuiaBPP3.pdf>.

- (48) Ghanbarzadeh S, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. *Adv.Pharm.Bull.* 2013;3(1):25-29.
- (49) Yoon HY, Chang IH, Goo YT, Kim CH, Kang TH, Kim SY, et al. Intravesical delivery of rapamycin via folate-modified liposomes dispersed in thermo-reversible hydrogel. *Int.J.Nanomedicine* 2019 Aug 5;14:6249-6268.
- (50) Salido-Vallejo R, Ruano J, Garnacho-Saucedo G, Godoy-Gijon E, Llorca D, Gomez-Fernandez C, et al. Facial Angiofibroma Severity Index (FASI): reliability assessment of a new tool developed to measure severity and responsiveness to therapy in tuberous sclerosis-associated facial angiofibroma. *Clin.Exp.Dermatol.* 2014 Dec;39(8):888-893.
- (51) Finlay AY, Khan GK. Dermatology Life Quality Index (DLQI)--a simple practical measure for routine clinical use. *Clin.Exp.Dermatol.* 1994 May;19(3):210-216.
- (52) Foster RS, Bint LJ, Halbert AR. Topical 0.1% rapamycin for angiofibromas in paediatric patients with tuberous sclerosis: a pilot study of four patients. *Australas.J.Dermatol.* 2012 Feb;53(1):52-56.
- (53) Tu J, Foster RS, Bint LJ, Halbert AR. Topical rapamycin for angiofibromas in paediatric patients with tuberous sclerosis: follow up of a pilot study and promising future directions. *Australas.J.Dermatol.* 2014 Feb;55(1):63-69.
- (54) Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I. A topical combination of rapamycin and tacrolimus for the treatment of angiofibroma due to tuberous

sclerosis complex (TSC): a pilot study of nine Japanese patients with TSC of different disease severity. *Br.J.Dermatol.* 2011 Oct;165(4):912-916.

(55) Cortell Fuster C, Martínez Gómez MA, Cercós Lleti AC, Climente Martí M. Topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis: a systematic review based on evidence. *J.Dermatolog Treat.* 2022 Jun;33(4):1804-1810.

(56) Salido R, Garnacho-Saucedo G, Cuevas-Asencio I, Ruano J, Galan-Gutierrez M, Velez A, et al. Sustained clinical effectiveness and favorable safety profile of topical sirolimus for tuberous sclerosis - associated facial angiofibroma. *J.Eur.Acad.Dermatol.Venereol.* 2012 Oct;26(10):1315-1318.

(57) Cortell-Fuster C, Martínez-Gómez MA, Cercós-Lleti AC, Climente-Martí M. Optimization, Formulation, and Stability of Topical Rapamycin Used for Rare Tuberous Sclerosis Disease: from Ointment to Liposomes. 2023.

(58) Cortell C, Martínez MA, Cercós AC, Climente M. Topical rapamycin in rare tuberous sclerosis disease: liposomal formulation stability. *Abstract Book 27th EAHP Congress Lisbon, Portugal; 2023.* p. 182.

(59) Erdogan M, Wright JRJ, McAlister VC. Liposomal tacrolimus lotion as a novel topical agent for treatment of immune-mediated skin disorders: experimental studies in a murine model. *Br.J.Dermatol.* 2002 Jun;146(6):964-967.

(60) Rouf MA, Vural I, Renoir JM, Hincal AA. Development and characterization of liposomal formulations for rapamycin delivery and investigation of their antiproliferative effect on MCF7 cells. *J.Liposome Res.* 2009;19(4):322-331.

(61) Valizadeh H, Ghanbarzadeh S, Zakeri-Milani P. Fusogenic liposomal formulation of sirolimus: improvement of drug anti-proliferative effect on human T-cells. *Drug Dev.Ind.Pharm.* 2015;41(9):1558-1565.

(62) Mattei PL, Corey KC, Kimball AB. Psoriasis Area Severity Index (PASI) and the Dermatology Life Quality Index (DLQI): the correlation between disease severity and psychological burden in patients treated with biological therapies. *J.Eur.Acad.Dermatol.Venereol.* 2014 Mar;28(3):333-337.

(63) Basra MKA, Salek MS, Camilleri L, Sturkey R, Finlay AY. Determining the minimal clinically important difference and responsiveness of the Dermatology Life Quality Index (DLQI): further data. *Dermatology* 2015;230(1):27-33.

(64) Lo Monaco M, Mallaci Bocchio R, Natoli G, Giardina A, Cangemi I, Scibetta S, et al. Critical importance of patient-reported outcomes for a comprehensive assessment of psoriatic arthritis patients. *Front.Med.(Lausanne)* 2024 Jan 16;10:1332432.

(65) Park J, Yun SK, Cho YS, Song KH, Kim HU. Treatment of angiofibromas in tuberous sclerosis complex: the effect of topical rapamycin and concomitant laser therapy. *Dermatology* 2014;228(1):37-41.

(66) Onyesom I, Lamprou DA, Sygellou L, Owusu-Ware SK, Antonijevic M, Chowdhry BZ, et al. Sirolimus encapsulated liposomes for cancer therapy: physicochemical and mechanical characterization of sirolimus distribution within liposome bilayers. *Mol.Pharm.* 2013 Nov 4;10(11):4281–4293.

Farmacotecnia

(pharmakon = medicamento, techné = arte)

Es la ciencia que estudia las diversas manipulaciones a las que deben someterse las distintas materias primas, con el objetivo de darles la forma adecuada para poder ser administradas a los seres vivos.

APÉNDICE. ARTÍCULO PRIMERO, ARTÍCULO SEGUNDO Y CARTA DE ACEPTACIÓN Y PRUEBAS DE AUTOR DEL ARTÍCULO TERCERO

REVIEW ARTICLE



Topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis: a systematic review based on evidence

Clara Cortell Fuster , María Amparo Martínez Gómez, Ana Cristina Cercós Lleti and Mónica Climente Martí

Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia, Spain

ABSTRACT

Introduction: facial angiofibromas of tuberous sclerosis are the most prevalent cutaneous manifestation, affecting 80% of patients, which cause facial lesions with negative psychosocial consequences. Newly, topical rapamycin has been established as an effective and safe therapy for this skin condition.

Purpose: to analyze the available scientific evidence about the effectiveness and safety of topical sirolimus in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis.

Methods: a literature search was conducted in PubMed and Cochrane. Effectiveness and safety were analyzed along with the main characteristics of each formulation in all included studies.

Results: thirty studies were included involving a total of 508 patients, developed in the last 20 years. Four randomized clinical trial, 17 case series and 9 single case reports were founded. Multiple topical rapamycin concentrations (0.003–1%) and formulations (gel, ointment, solution) were found in literature. Rapamycin demonstrated its effectiveness in all studies included, except for 5 patients in a 1 b study. Rapamycin was shown to be safe for the treatment of FA.

Conclusions: Topical sirolimus can be considered an effective and safety option for the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis. However, further long-term studies need to establish an evidence-based therapeutic protocol.

KEY MESSAGE

Updated review to date in topical rapamycin for facial angiofibromas, allowing support in therapeutic decisions.

ARTICLE HISTORY

Received 12 March 2021

Accepted 15 March 2021

KEYWORDS

Sirolimus; rapamycin; tuberous sclerosis; facial angiofibromas; topical; systematic review

Introduction

Tuberous sclerosis (TS) is a rare disease with an incidence of 1 in 6000 to 1 in 10,000 individuals (1). Genetically, it is an autosomal dominant inherited disease with variable expression, caused by the inactivation of either of two tumor suppressor genes: TSC1 or TSC2 (2) (located on chromosome 9 and 16, respectively). These genes encode the hamartin and tuberlin proteins which form an important heterodimer (TSC1-TSC2 complex) (3) key to regulating cell proliferation and differentiation of the mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway. All of these mechanisms translate into the multisystem formation of benign noninvasive tumors, called hamartoma and distributed in tissues and organs such as: brain, kidneys, lungs, heart, eyes and skin. These anatomo-clinical manifestations were first published by Bourneville in 1880 (4). For this reason, Bourneville disease is a TS synonym.

The most prevalent skin condition in TS are facial angiofibromas (FA), which occur in up to 80% of patients (5) and they are one of the main criteria for diagnosis. FA appear between 2 and 5 years of age and grow in number and size stabilizing in adolescence (2). The visual impact of facial injuries, with the esthetic and psychological problem that they entail (6,7), has motivated the use of multiple treatments to improve the quality of life of patients (8). Physical treatment include radiofrequency,

electrocoagulation, cryotherapy, dermabrasion and laser therapy (3,9). The main problem with these techniques is that are invasive and painful and require anesthesia. Tranilast or podofilotoxin has been used as a pharmacological treatment, but recent publications place rapamycin (sirolimus) as the most appropriate pharmacological alternative, based on favorable data of effectiveness and safety (5).

Rapamycin is a potent m-TOR inhibitor and has immunosuppressive, antitumor and antiangiogenic properties, which was first developed in the 1990s (10). Several studies have shown the improvement of FA after post-renal immunosuppressive therapy with oral rapamycin (11–13). According to these experiences, topical therapy was raised, because prevented the patient's systemic exposure to drug. The first experience in topical rapamycin treatment was in 2010 by Haemel et al. (14) and reported an improvement in FA after 12 weeks with 1% rapamycin. The effectiveness of topical sirolimus has been evaluated mostly by the subjective investigator evaluation (15,16). Salido-Vallejo in 2014 assessed the effectiveness with a standardized scale: Facial Angiofibromas Severity Index (FASI score) (17), scoring facial injuries based on erythema, size and extension. However, there is not a commercially available formulation and the risk-benefit profile has not been thoroughly investigated. In addition, rapamycin was added to NIOSH list as a hazardous

drug in 2014 (18), which results in greater control in the development of topical formulations. The objective of this systematic review is to analyze the available scientific evidence about the use of topical rapamycin in the treatment of FA in TS.

Methods

A retrospective review was conducted to identify clinical studies involved in the evaluation of effectiveness and safety around the use of topical rapamycin for FA in TS. Publications were identified in PubMed's MEDLINE and Cochrane databases from January 2000 to December 2020. Last search date: 01/19/2021. Key search words (included in MeSH terms) (19) 'rapamycin', 'sirolimus', 'rapamune', 'angiofibroma', 'dermatofibroma' and 'tuberous sclerosis' were used. E-search strategy for PubMed database was ("sirolimus"[tiab] OR "rapamycin"[tiab] OR "rapamune"[tiab]) AND ("angiofibroma"[All Fields] OR "dermatofibroma"[All Fields]) AND "tuberous sclerosis"[All Fields] AND ("2000/01/01"[PDAT]:"2020/12/31"[PDAT]). The methods used for extracting data from publications were excel forms and reading studies. Inclusion criterion: clinical trials and case reports related to treatment with any topical formulation (concentration and vehicle) of rapamycin for FA in TS. Exclusion criteria: different diagnosis of FA in TS, non-topical rapamycin treatment,

reviews, non-English language articles, letters to the editor, animal trials and full text not available. Level of evidence for each publication was established according to CEBM scale (Center for Evidence-Based Medicine) of Oxford (20) (Table 1). To complete the studies description, we described the number of patients (n), the concentration and vehicle used, the study design for randomized clinical trials, another therapies associated with topical rapamycin treatment, posology and duration of treatment (weeks).

For each study we analyzed effectiveness (subjective improvement assessed by the investigator, validated and unvalidated scales or quality-of-life questionnaires) and safety (adverse events, haematological tests and rapamycin plasma levels) during treatment.

Results

A total of 66 publications were screened, 30 articles met the inclusion criterion and did not present any exclusion criteria, involving 508 patients (Figure 1). Among them, there were four randomized clinical trials (21–24), 17 case series (15,16,25–39) and nine single case reports (14,40–47). Five studies combined topical rapamycin with other therapies: laser (33,42,47),

Table 1. Level of Evidence (CEBM scale, Oxford).

Recommendation degree	Level of evidence	Type of study
A: extremely recommendable	1a	SR/MA of RCTs
	1b	Individual RCT (with a narrow confidence interval)
	1c	Clinical practice (all of them or none)
B: favorable recommendation	2a	SR/MA of cohort studies
	2b	Individual cohort study (including low quality RCT)
	2c	Outcomes research. Ecological studies
	3a	SR/MA or case-control studies
	3b	Individual case-control study
	4	Case series (poor quality cohort and case-control studies)
C: favorable but inconclusive recommendation	5	Expert opinion
D: neither recommended nor disapproved		

CEBM: center for evidence-based medicine; RCT: randomized clinical trial; SR: systematic review; MA: meta-analysis.

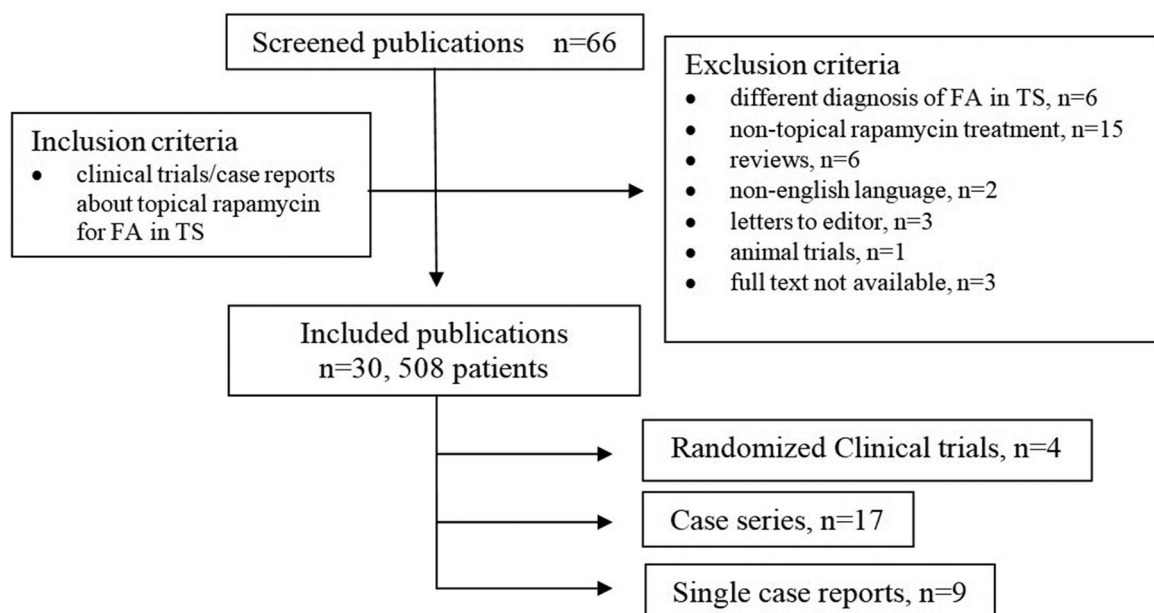


Figure 1. Studies selection.

Table 2. Systematic review of literature.

Year	Author	Evidence level (CEMB)	N	Rapamycin concentrations	Vehicle	Study design (for RCT)	Another therapies associated	Posology	Duration of treatment (weeks)
2020	Hatano et al. (39)	4	33	0.2%	Gel	–	None	Twice daily	12
2020	Chen et al. (24)	1b	52	0.1%	Ointment	Rapamycin 0.1% vs rapamycin-calcitriol 0.1% vs calcitriol only	Topical calcitriol	Twice daily	24
2020	Okanishi et al. (16)	4	9	0.2%	Gel	–	None	Twice daily	24
2019	Wheless et al. (15)	4	11	0.1%	Ointment	–	None	Twice daily for 2 weeks and once daily	52
2018	Negosanti et al. (47)	4	1	0.05%	Ointment	–	Laser	Twice daily	20
2018	Lee et al. (38)	4	36	0.2%	Ointment	–	None	NR	26
2018	Koenig et al. (23)	1b	179	0.1%; 1%	NR	0.1% vs 1% vs vehicle only	None	NR	24
2017	Amin et al. (37)	4	14	0.1%	Ointment	–	None	Once daily	24
2017	Wang et al. (36)	4	29	0.1%	Ointment	–	None	Twice daily	36
2017	Ebrahimi-fakhari et al. (46)	4	1	0.1%	Ointment	–	None	Twice daily	164
2017	Wataya-Kaneda et al. (22)	1b	36	0.05%; 0.1%; 0.2%	Gel	0.05% vs 0.1% vs 0.2% vs vehicle only	None	Twice daily	16
2017	Cinar et al. (35)	4	12	0.1%	Ointment	–	None	Twice daily	24
2016	Schwartz et al. (45)	4	1	0.1%	Ointment	–	None	Twice daily	NP
2015	Pynn et al. (34)	4	2	0.1%	Ointment	–	None	Once daily	20–36
2014	Park et al. (33)	4	4	0.1%	Ointment	–	Laser	Twice daily	48–84
2014	Tu et al. (32)	4	19	0.1–1%	Ointment	–	None	Twice daily and three/four times per week	32–120
2014	Knöpfel et al. (43)	4	1	0.2%	Ointment	–	None	Five times per week	48
2013	Tiedemann Svendsen et al. (44)	4	1	0.4%	Ointment	–	None	Three times per week	24
2013	Bae-Harboe et al. (42)	4	1	0.2%	Ointment	–	Laser and electrosurgery	NR	NP
2013	Tanaka et al. (31)	4	11	0.2%	Gel and Ointment	–	None	Twice daily	12
2013	Wheless et al. (30)	4	2	0.1%	Hydrophilic ointment	–	None	Twice daily and once daily	48
2012	Koenig et al. (21)	1b	23	0.003%; 0.015%	Skincerity	0.003% vs 0.015% vs vehicle only	None	Once daily (nightly)	24
2012	Foster et al. (29)	4	4	0.1%	Ointment and Solution	–	None	Twice daily	24
2012	Truchuelo et al. (41)	4	1	1%	Dexeryl	–	None	Once daily	4
2012	Kaufman McNamara et al. (28)	4	2	0.1%	Eucerin and Solution	–	None	Once daily	12
2012	Salido et al. (27)	4	10	0.4%	Ointment	–	None	Three times per week	36
2011	Mutizwa et al. (26)	4	2	0.1%	Solution	–	None	Twice daily	10–23
2011	Wataya-Kaneda et al. (25)	4	9	0.2%	Ointment	–	Topical tacrolimus	Twice daily	16
2011	Deklotz et al. (40)	4	1	1%	Ointment	–	None	Twice daily	4
2010	Haemel et al. (14)	4	1	1%	Ointment	–	None	Twice daily	12

CEBM: Center for Evidence-Based Medicine; RCT: randomized clinical trial; NR: not reported.

electrosurgery (42), topical tacrolimus 0.03% (25) or calcitriol (24). In one patient oral rapamycin at 3 mg daily was added to improve the efficacy of topical therapy (28). In the other 24 studies topical rapamycin was used as monotherapy (14–16,21–23,26,27, 29–32,34–41,43–46) (Table 1). In addition, in three of them, patients were applied rapamycin in one area of the face and vehicle only on the other side (25,31,35).

Level of evidence (CEBM scale)

After analysis of the level of evidence according to CEBM scale, four studies with level 1b of evidence (individual randomized clinical trial with narrow Confidence Interval) were identified (21–24). The other studies were classified in level 4 of evidence (Case-series: poor quality cohort and case-control studies) (Tables 1 and 2).

Concentrations

High variability was observed in concentrations chosen for topical formulations (from 0.003% to 1%).

With a total amount of 508 patients treated, the most prevalent concentration in literature was 0.1% (213 patients, 41.9%), followed by 0.2% (108 patients, 21.3%) and 1% (65 patients, 12.8%). The other concentrations (0.5%, 0.4%, 0.05%, 0.003% and 0.015%) were used as a group in 48 patients, 11.8%. 79 patients (15.6%) were treated with vehicle only (placebo effect) in randomized clinical trials. (Table 2).

Vehicle

Different excipients were used in the studies to formulate rapamycin. The ointment with lipophilic excipients was the first choice, corresponding to 212 patients, 41.7%, followed by gel (85 patients, 16.7%), commercially available creams: Skincerity (ARIIX LLC, American Fork, UT, USA), Eucerin (Beiersdorf, Hamburg,

Germany) and Dexeryl (Pierre Fabre, Paris, France) (25 patients, 4.9%), solution (five patients, 1.0%) and ointment with hydrophilic excipients (two patients, 0.4%). In 179 cases (35.2%) the vehicle was not defined (Table 2).

Posology

The most prevalent posology found in literature was: twice daily (133 patients, 46.9%), once daily (53 patients, 10.4%) and three times weekly (11 patients, 2.2%). In 179 cases (35.2%) posology was not reported (Table 2).

Effectiveness

Rapamycin demonstrated its effectiveness in all studies included, except for 5 patients in a 1b study (21).

A subjective evaluation by the investigator was applied in 355 patients, 69.9%. FASI score (153 patients, 30.1%)

and another unvalidated scales (53 patients, 10.4%) were used to a lesser extent. In addition, three studies assessed the effectiveness with quality-of-life questionnaires for patients (23,37,39).

Only one of the higher quality studies used FASI score for effectiveness assessment (24). The other three used quality-of-life questionnaires (23), and a subjective evaluation by the investigator (21–23). (Table 3).

Safety

Adverse events

Rapamycin was shown to be safe for the treatment of FA. In only some patients did it cause dermatological side effects. Two serious adverse events were reported: pneumonia in the context of a seizure (21), and a septic shock by urinary tract infection (24), both required hospitalization. The relationship with topical treatment was dismissed in the first study (21), because

Table 3. Systematic review of literature (2).

Year	Author	Effectiveness	Adverse events	Haematological tests	Rapamycin plasma levels
2020	Hatano et al. (39)	Unvalidated scale and SF-36: improvement	4/33 Acne, 3/33 irritation, 3/33 dry skin, 2/33 pruritus	NP	NP
2020	Chen et al. (24)	FASI score: improvement	1/52 septic shock by urinary tract infection (SAE)	NP	NP
2020	Okanishi et al. (16)	SEI: improvement	1/9 Acne	NP	NP
2019	Wheless et al. (15)	SEI: improvement	None	NP	Yes: undetectable
2018	Negosanti et al. (47)	SEI: improvement	None	NP	NP
2018	Lee et al. (38)	FASI score: improvement	3/36 Erythema	NP	NP
2018	Koenig et al. (23)	SEI and DLQI: improvement	54/179 Pruritus, erythema, pain	NP	Yes: undetectable
2017	Amin et al. (37)	SEI, PedsQL and SF-36: improvement	1/14 Erythema	NP	NP
2017	Wang et al. (36)	SEI: improvement	None	NP	Yes: undetectable
2017	Ebrahimi-fakhari et al. (46)	SEI: improvement	None	NP	Yes: undetectable
2017	Wataya-Kaneda et al. (22)	SEI: improvement	15/36 Dry skin, erythema	Yes: normal	Yes: undetectable
2017	Cinar et al. (35)	FASI score: improvement	3/12 Erythema	NP	NP
2016	Schwartz et al. (45)	SEI: improvement	none	NP	NP
2015	Pynn et al. (34)	SEI: improvement	1/2 Pruritus	NP	NP
2014	Park et al. (33)	SEI: improvement	None	NP	Yes: undetectable
2014	Tu et al. (32)	SEI: improvement	1/19 Erythema, 1/19 perioral dermatitis.	NP	Detectable in 2 patients (0.5 y 0.8 mcg/L)
2014	Knöpfel et al. (43)	SEI: improvement	None	NP	NP
2013	Tiedemann Svendsen et al. (44)	SEI: improvement	None	NP	Yes: undetectable
2013	Bae-Harboe et al. (42)	SEI: improvement	none	NP	NP
2013	Tanaka et al. (31)	Unvalidated scale: improvement	None	NP	Yes: undetectable
2013	Wheless et al. (30)	SEI: improvement	None	NP	Yes: undetectable
2012	Koenig et al. (21)	SEI: improvement	1/23 Pneumonia (SAE)	Yes: normal	Yes: undetectable
2012	Foster et al. (29)	SEI: improvement	2/4 Erythema (rapamycin solution)	NP	Detectable in 1 patient (0.8 mcg/L)
2012	Truchuelo et al. (41)	SEI: improvement	None	Yes: normal	Yes: undetectable
2012	Kaufman McNamara et al. (28)	SEI: improvement	1/2 Headache	Yes: normal	NP
2012	Salido et al. (27)	SEI: improvement	None	NP	Yes: undetectable
2011	Mutizwa et al. (26)	SEI: improvement	2/2 Erythema	NP	Yes: undetectable
2011	Wataya-Kaneda et al. (25)	Unvalidated scale: improvement	None	NP	Yes: undetectable
2011	Deklotz et al. (40)	SEI: improvement	None	NP	NP
2010	Haemel et al. (14)	SEI: improvement	None	Yes: normal	Yes: undetectable

SEI: Subjective Evaluation by Investigator; FASI: Facial Angiofibroma Severity Index; DLQI: Dermatology Life Quality Index; PedsQL: Pediatric Quality of Life Inventory; SF-36: Short Form 36 Health Survey Questionnaire; SAE: Serious Adverse Event; NP: Not performed.

rapamycin plasma levels were undetectable. Two patients developed uncommon side effects: headache (28) and perioral dermatitis (32). Both disappeared after dose reduction of oral rapamycin and after antibiotic treatment, respectively. The most common adverse events in higher-quality studies (21–24) were pruritus, erythema, pain and dry skin (Table 3).

Haematological tests

To provide more safety to topical rapamycin therapy, haematological tests of thrombocytes, lymphocytes and red blood cells counts were performed in some studies (63 patients, 12.4%) (14,21,22,28,41). These tests were normal in all cases, with no altered laboratory parameters in patients. (Table 3).

Rapamycin plasma levels

To ensure systemic non-absorption, rapamycin plasma levels was performed in 343 patients, 67.5% of all patients (14,21–23,25–27,29–33,36,41,44,46).

Rapamycin serum concentrations were undetectable ($<1.0\text{ ng/mL}$) in 340 patients (99.1%), and 79 of these patients belonged to the groups treated with vehicle only (placebo). In three cases rapamycin plasma levels were detectable with concentrations between 0.5 and 0.8 mcg/L (29,32). (Table 3).

Discussion

The search for mTor inhibitors for the treatment of FA has placed rapamycin as standard therapy ensuring effectiveness and safety in different studies. Topical rapamycin has even been shown to be more effective than another mTor inhibitor (tacrolimus) (25), confirming its eligibility in TS.

The result of the current systematic review offers little literature: just 30 articles evaluating topical rapamycin therapy for FA in TS were included, of which only four corresponds to randomized clinical trials and the rest are case series or single case reports. This point limits the scientific validity of the studies analyzed as a whole, because most of them were classified in level 4 of evidence (recommendation C: favorable but inconclusive recommendation) according to CEBM scale. In addition, high variability between studies in terms of concentration, vehicle, posology, duration of treatment and effectiveness assessment make it impossible to choose a formulation to treat this skin disease (Tables 2 and 3).

Studies that assess effectiveness subjectively predominate, according to the investigator's opinion. A minority of studies evaluate results with scores based on the severity of FA or quality-of-life questionnaires for patients. Specifically, FASI score to measure effectiveness is a simple, reproducible and validated tool for assessing the severity of FA and subsequent response to rapamycin treatment. Thus, this scale provides a more objective assessment (17), evaluating erythema, size and extension of FA.

Rapamycin has a favorable safety profile, as demonstrated in most studies. The incidence of skin adverse events is as expected based on the total number of patients considered (23) and usually disappear after the end of treatment. Several studies conducted blood cell counts and rapamycin plasma levels because this molecule has an immunosuppressive mechanism. All haematological tests were normal. In three patients rapamycin plasma levels were detectable (0.5–0.8 mcg/L), far below the 2.6 mcg/L needed for immunosuppression (29).

Following these comments, we should consider patient satisfaction with topical therapy, including this point in effectiveness assessment. Different studies have included the assessment of quality of life and patient satisfaction as an important aspect in dermatological diseases, including TS. These authors explain the development and validation of various quality of life instruments, mostly in pediatric patients (8,48–54).

Topical rapamycin is not a curative treatment, it has shown that FA reappear after withdrawal (46). Therefore, ensuring adherence is important in such long-lasting treatments. There are strategies that can help to improve adherence to treatment and guarantee greater effectiveness and less adverse events: an easier vehicle to apply that does not compromise the drug release into skin, gel vehicle for example (31); and a more spaced posology like three times per week (with higher concentration of rapamycin: 0.4%) are more comfortable for patients (2).

In conclusion, topical rapamycin can be considered an effective and safety treatment for FA in TS. It should be noted that this is a hazardous drug since 2014 and the use is off-label with an informed consent signed by patients. These characteristics position pharmacy services as key elements in the elaboration of these formulations. Hospital pharmacists can conduct a clinical follow-up of patients, contributing to improve effectiveness and minimize adverse reactions. In parallel, more galenic, dermokinetic and clinical studies are needed to confirm which formulation is most appropriate to ensure effectiveness, safety and high patient satisfaction.

Limitations

The limitations of this review lie in the limited literature published for the treatment of FA in TS with mTOR inhibitors. Most of the jobs available include few patients, predominantly case reports. This makes it very difficult to establish an accurate, evidence-based therapeutic decision. Despite the small number of publications included (30), this article provides a completely updated review to date based on evidence, allowing support in therapeutic decisions for other authors and clinicians.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

ORCID

Clara Cortell Fuster  <http://orcid.org/0000-0003-0192-0629>

References

1. Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9639):657–668.
2. Salido-Vallejo R, Garnacho-Saucedo G, Moreno-Giménez JC. Current options for the treatment of facial angiofibromas. *Actas Dermosifiliogr*. 2014;105(6):558–568.
3. Jóźwiak S, Sadowski K, Kotulska K, et al. Topical use of mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors in tuberous sclerosis complex—a comprehensive review of the literature. *Pediatr Neurol*. 2016;61:21–27.
4. Narayanan V. Tuberous sclerosis complex: genetics to pathogenesis. *Pediatr Neurol*. 2003;29(5):404–409.

5. Balestri R, Neri I, Patrizi A, et al. Analysis of current data on the use of topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis complex. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(1):14–20.
6. Rumsey N, Clarke A, White P. Exploring the psychosocial concerns of outpatients with disfiguring conditions. *J Wound Care*. 2003;12(7):247–252.
7. Zweegers J, van der Vleuten CJ. The psychosocial impact of an infantile haemangioma on children and their parents. *Arch Dis Child*. 2012;97(10):922–926.
8. Patrick DL, Topolski TD, Edwards TC, et al. Measuring the quality of life of youth with facial differences. *Cleft Palate Craniofac J*. 2007;44(5):538–547.
9. Biondo G, Greco S, Mavilia L, et al. Treatment of nodular facial angiofibromas in tuberous sclerosis, using ultrapulse carbon dioxide laser. *Clin Exp Dermatol*. 2014;39(6):738–740.
10. Leducq S, Giraudeau B, Tavernier E, et al. Topical use of mammalian target of rapamycin inhibitors in dermatology: a systematic review with meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(3):735–742.
11. Hofbauer GF, Marcollo-Pini A, Corsenca A, et al. The mTOR inhibitor rapamycin significantly improves facial angiofibroma lesions in a patient with tuberous sclerosis. *Br J Dermatol*. 2008;159(2):473–475.
12. Tarasewicz A, Debska-Slizien A, Konopa J, et al. Rapamycin as a therapy of choice after renal transplantation in a patient with tuberous sclerosis complex. *Transplant Proc*. 2009;41(9):3677–3682.
13. Micozkadioglu H, Koc Z, Ozelsancak R, et al. Rapamycin therapy for renal, brain, and skin lesions in a tuberous sclerosis patient. *Ren Fail*. 2010;32(10):1233–1236.
14. Haemel AK, O'Brian AL, Teng JM. Topical rapamycin: a novel approach to facial angiofibromas in tuberous sclerosis. *Arch Dermatol*. 2010;146(7):715–718.
15. Wheless MC, Takwi AA, Almoazen H, Wheless JW. Long-term exposure and safety of a novel topical rapamycin cream for the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis complex: results from a single-center, open-label trial. *Child Neurol Open*. 2019;6:2329048X19835047.
16. Okanishi T, Fujimoto A, Enoki H, et al. Early sirolimus gel treatment may diminish angiofibromas and prevent angiofibroma recurrence in children with tuberous sclerosis complex. *Front Med*. 2020;7:1.
17. Salido-Vallejo R, Ruano J, Garnacho-Saucedo G, et al. Facial Angiofibroma Severity Index (FASI): reliability assessment of a new tool developed to measure severity and responsiveness to therapy in tuberous sclerosis-associated facial angiofibroma. *Clin Exp Dermatol*. 2014;39(8):888–893.
18. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH list of antineoplastic and other hazardous drugs in healthcare settings. 2014. [cited 2019 Jun 19]. Available in: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2014-138/pdfs/2014-138.pdf>.
19. U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894. MeSH Terms. [cited 2019 Jun 19]. Available in: <https://meshb.nlm.nih.gov/search>. 2018.
20. Howick J. Centre for Evidence-Based Medicine (Oxford). Levels of evidence, Oxford Centre for Evidence-based Medicine. 2009. [cited 2019 Jun 19]. Available in: <https://www.cebm.net/2009/06/oxford-centre-evidence-based-medicine-levels-evidence-march-2009/>.
21. Koenig MK, Hebert AA, Roberson J, et al. Topical rapamycin therapy to alleviate the cutaneous manifestations of tuberous sclerosis complex: a double-blind, randomized, controlled trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied rapamycin. *Drugs R D*. 2012;12(3):121–126.
22. Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Tanaka M, et al. Efficacy and safety of topical sirolimus therapy for facial angiofibromas in the tuberous sclerosis complex: a randomized clinical trial. *JAMA Dermatol*. 2017;153(1):39–48.
23. Koenig MK, Bell CS, Hebert AA, et al. Efficacy and safety of topical rapamycin in patients with facial angiofibromas secondary to tuberous sclerosis complex: The TREATMENT Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol*. 2018;154(7):773–780.
24. Chen PL, Hong JB, Shen LJ, et al. The efficacy and safety of topical rapamycin-calcitriol for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex: a prospective, double-blind, randomized clinical trial. *Br J Dermatol*. 2020;183(4):655–663.
25. Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, et al. A topical combination of rapamycin and tacrolimus for the treatment of angiofibroma due to tuberous sclerosis complex (TSC): a pilot study of nine Japanese patients with TSC of different disease severity. *Br J Dermatol*. 2011;165(4):912–916.
26. Mutizwa MM, Berk DR, Anadkat MJ. Treatment of facial angiofibromas with topical application of oral rapamycin solution (1mg/mL(-1)) in two patients with tuberous sclerosis. *Br J Dermatol*. 2011;165(4):922–923.
27. Salido R, Garnacho-Saucedo G, Cuevas-Asencio I, et al. Sustained clinical effectiveness and favorable safety profile of topical sirolimus for tuberous sclerosis – associated facial angiofibroma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(10):1315–1318.
28. Kaufman McNamara E, Curtis AR, Fleischer AB. Jr. Successful treatment of angiofibromata of tuberous sclerosis complex with rapamycin. *J Dermatolog Treat*. 2012;23(1):46–48.
29. Foster RS, Bint LJ, Halbert AR. Topical 0.1% rapamycin for angiofibromas in paediatric patients with tuberous sclerosis: a pilot study of four patients. *Australas J Dermatol*. 2012;53(1):52–56.
30. Wheless JW, Almoazen H. A novel topical rapamycin cream for the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol*. 2013;28(7):933–936.
31. Tanaka M, Wataya-Kaneda M, Nakamura A, et al. First left-right comparative study of topical rapamycin vs. vehicle for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex. *Br J Dermatol*. 2013;169(6):1314–1318.
32. Tu J, Foster RS, Bint LJ, et al. Topical rapamycin for angiofibromas in paediatric patients with tuberous sclerosis: follow up of a pilot study and promising future directions. *Australas J Dermatol*. 2014;55(1):63–69.
33. Park J, Yun SK, Cho YS, et al. Treatment of angiofibromas in tuberous sclerosis complex: the effect of topical rapamycin and concomitant laser therapy. *Dermatology*. 2014;228(1):37–41.
34. Pynn EV, Collins J, Hunasehally PR, et al. Successful topical rapamycin treatment for facial angiofibromata in two children. *Pediatr Dermatol*. 2015;32(3):e120–e123.

35. Cinar SL, Kartal D, Bayram AK, et al. Topical sirolimus for the treatment of angiofibromas in tuberous sclerosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2017;83(1):27–32.
36. Wang S, Liu Y, Wei J, et al. Tuberous sclerosis complex in 29 children: clinical and genetic analysis and facial angiofibroma responses to topical sirolimus. *Pediatr Dermatol.* 2017;34(5):572–577.
37. Amin S, Lux A, Khan A, et al. Sirolimus ointment for facial angiofibromas in individuals with tuberous sclerosis complex. *Int Sch Res Notices.* 2017;2017:8404378.
38. Lee YI, Lee JH, Kim DY, et al. Comparative effects of topical 0.2% sirolimus for angiofibromas in adults and pediatric patients with tuberous sclerosis complex. *Dermatology.* 2018;234(1–2):13–22.
39. Hatano T, Ohno Y, Imai Y, et al. Improved health-related quality of life in patients treated with topical sirolimus for facial angiofibroma associated with tuberous sclerosis complex. *Orphanet J Rare Dis.* 2020;15(1):133.
40. DeKlotz CM, Ogram AE, Singh S, et al. Dramatic improvement of facial angiofibromas in tuberous sclerosis with topical rapamycin: optimizing a treatment protocol. *Arch Dermatol.* 2011;147(9):1116–1117.
41. Truchuelo T, Diaz-Ley B, Rios L, et al. Facial angiofibromas treated with topical rapamycin: an excellent choice with fast response. *Dermatol Online J.* 2012;18(1):15.
42. Bae-Harboe YS, Geronemus RG. Targeted topical and combination laser surgery for the treatment of angiofibromas. *Lasers Surg Med.* 2013;45(9):555–557.
43. Knopfel N, Martin-Santiago A, Bauza A, et al. Topical 0.2% rapamycin to treat facial angiofibromas and hypomelanotic macules in tuberous sclerosis. *Actas Dermosifiliogr.* 2014;105(8):802–803.
44. Tiedemann Svendsen M, Bygum A, Hansen LK, et al. Facial angiofibromas associated to tuberous sclerosis treated with topical sirolimus. *Ugeskr Laeger.* 2013;175(43):2569–2570.
45. Schwartz RA. Facial angiofibromas of tuberous sclerosis treated with topical sirolimus in an Indian patient (commentary on article by Resham J. Vasani). *Dermatol Ther.* 2016;29(1):70–71.
46. Ebrahimi-Fakhari D, Muller CSL, Meyer S, et al. Topical rapamycin for facial angiofibromas in a child with tuberous sclerosis complex (TSC): a case report and long-term follow-up. *Dermatol Ther.* 2017;7(1):175–179.
47. Negosanti F, Tengattini V, Gurioli C, et al. Facial angiofibromas treated by rapamycin 0.05% ointment and a combined laser therapy. *J Cosmet Dermatol.* 2018;17(5):762–765.
48. Crall C, Valle M, Kapur K, et al. Effect of angiofibromas on quality of life and access to care in tuberous sclerosis patients and their caregivers. *Pediatr Dermatol.* 2016;33(5):518–525.
49. Lewis-Jones MS, Finlay AY. The Children's Dermatology Life Quality Index (CDLQI): initial validation and practical use. *Br J Dermatol.* 1995;132(6):942–949.
50. Smidt AC, Lai JS, Cella D, et al. Development and validation of Skindex-Teen, a quality-of-life instrument for adolescents with skin disease. *Arch Dermatol.* 2010;146(8):865–869.
51. Chamlin SL, Lai JS, Cella D, et al. Childhood Atopic Dermatitis Impact Scale: reliability, discriminative and concurrent validity, and responsiveness. *Arch Dermatol.* 2007;143(6):768–772.
52. Brown MM, Chamlin SL, Smidt AC. Quality of life in pediatric dermatology. *Dermatol Clin.* 2013;31(2):211–221.
53. Ramien ML, Ondrejchak S, Gendron R, et al. Quality of life in pediatric patients before and after cosmetic camouflage of visible skin conditions. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71(5):935–940.
54. Lilly E, Lu PD, Borovicka JH, et al. Development and validation of a vitiligo-specific quality-of-life instrument (VitiQoL). *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(1):e11–e18.



Optimization, Formulation, and Stability of Topical Rapamycin Used for Rare Tuberous Sclerosis Disease: from Ointment to Liposomes

Clara Cortell-Fuster¹ · María Amparo Martínez-Gómez² · Ana Cristina Cercós-Lleti¹ · Mónica Climente-Martí¹

Accepted: 3 November 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Introduction Topical rapamycin has been established as an effective and safe therapy for facial angiofibromas in tuberous sclerosis. Different formulations have been tested for this skin disease, most using an ointment as a vehicle.

Purpose To improve the classical formulation of topical rapamycin and to determine the validity period of the proposed options based on chemical, physical, and microbiological stability studies.

Methods Four different 0.4% rapamycin formulations were prepared (ointment, emulsion, gel, and liposomes). The stability studies for each formulation over 56 days were as follows: (1) chemical: extraction with different solvents and high-performance liquid chromatography assay; (2) physical: pH, uniformity, extensibility, absence of crystals, absence of phase separation, and only for liposomal formulation, particle size, zeta potential, and encapsulation efficiency were determined; and (3) microbiological: culture samples in blood-agar media.

Results Only liposomes were chemically, physically, and microbiologically stable after 8 weeks. Ointment, emulsion, and gel formulations lost their chemical or physical stability before 56 days.

Conclusions The authors describe four new formulations to improve the previous treatment for facial angiofibromas in tuberous sclerosis. The liposome-based formulation was the most appropriate according to chemical, physical, and microbiological stability studies. However, it would be necessary to carry out clinical studies to ensure the effectiveness and safety of this formulation and also guarantee an improvement in the quality of life of patients.

Keywords Formulation/stability · Chemical analysis · Emulsions · Rapamycin · Liposomes · Tuberous sclerosis complex

Introduction

Tuberous sclerosis (TS) is an autosomal dominant rare disease, characterized by the multisystem formation of benign non-invasive tumors, called hamartomas and distributed in tissues and organs such as the brain, kidneys, lungs, heart, eyes, and skin [1]. The most prevalent skin condition in TS is facial angiofibromas (FA), which occur due to an alteration of the mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway. These facial injuries imply an aesthetic and psychological problem [2, 3],

and sometimes, its treatment is not prioritized due to the existence of more serious complications associated with this rare disease.

Multiple treatments have been established for these patients. Physical treatments like radiofrequency, electrocoagulation, cryotherapy, dermabrasion, and laser therapy [4] are invasive and painful and require anesthesia. The interest of mTOR inhibitors focuses pharmacological treatment on everolimus and sirolimus, and recent publications place topical rapamycin (sirolimus) as the most appropriate alternative [5].

We found multiple studies with topical rapamycin in the literature, including four randomized clinical trials [6–9], and all of them provide favorable data on effectiveness and safety. However, high variability between studies in terms of concentration, vehicle, posology, duration of treatment, and effectiveness assessment forces us to study several formulations to choose the most appropriate.

Several authors have studied different formulations other than the classic formulation (an ointment based on

✉ Clara Cortell-Fuster
clacor@alumni.uv.es

¹ Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Doctor Peset, Valencia, Spain

² Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO), Valencia, Spain

petrolatum) with the aim of achieving a better appearance and consistency of the formulation in order to improve patient compliance with treatment.

Bouguéon et al. [10] studied the physico-chemical stability of a cream formulation with a commercialized excipient called Excipial Hydrocrème®. Additionally, they used diethylene glycol monoethyl ether P (Transcutol®) as a vehicle and demonstrated that rapamycin was ten times more soluble in Transcutol® (fully soluble, 20.2 mg/mL) compared to liquid paraffin (< 2 mg/mL). Le Guyader et al. [11] conducted a physico-chemical and microbiological stability study on a gel-type formulation. These authors also recommend the use of solubilizing agents such as transcutol in combination with gel-type formulations, since they have demonstrated improved permeation, penetration, and release. Ghanbarzadeh et al. formulated rapamycin integrated into a liposomal solution, explaining the methodology in development of rapamycin liposomes, and additionally studied their chemical stability using a validated high-performance liquid chromatography (HPLC) method [12, 13].

Among all the concentrations and dosages reported in the literature, 0.4% concentration, three times per week, is interesting to avoid exposure to the drug every day and thus minimize possible cutaneous adverse events without compromising effectiveness [14, 15].

In addition, the current legal regulations in Spain on magistral formulas establish that the validity period of non-typified magistral formulas corresponds to the full duration of the treatment [16]. Secondly, the Guide to Good Practice of Preparation of Medications in Hospital Pharmacy Services in Spain establishes a validity period of 30 days for ointments and creams, which can be increased if demonstrated with stability studies [17].

The purpose of this study is to improve the classic formulation of topical rapamycin for FA in TS and determine the validity period of the proposed formulations based on chemical, physical, and microbiological stability.

Methods

Materials and Reagents

Rapamycin powder (an active substance) was provided by Acofarma (Madrid, Spain). The rest of the excipients used in the preparation of the formulations were supplied by Guinama (Valencia, Spain). All reagents and solvents were provided by Scharlab (Valencia, Spain).

Formulation and Preparation

Galenic optimization of the topical formulation of rapamycin at 0.4% based on its excipients was performed. The

most widely used classical formulation in the literature is petrolatum as a vehicle. However, other options were formulated based on previous studies.

Four different formulations were developed in the biological safety cabinet, all of them with a rapamycin concentration of 0.4% and with differences in their excipients. The resulting formulations were ointment, emulsion, gel, and liposomes (Table 1). Each formulation was packaged in a bottle protected from ambient light and stored in a cold room at $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Chemical Stability

Equipment

An Agilent Technologies 1100 HPLC system (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Karlsruhe, Germany) with a quaternary pump, micro-vacuum degasser, autosampler, thermostatted column compartment, diode array detector, and Agilent Technologies ChemStation for LC 3D Software was used for the analysis.

Table 1 Composition of rapamycin formulations

Formulation	Component	Amount, mass basis
Ointment	Rapamycin	0.4%
	Transcutol®	10%
	Lanolin	10%
	Shea butter	20%
	Vitamin E	1%
	Petrolatum	q.s. 20 g
Emulsion	Rapamycin	0.4%
	Transcutol®	10%
	W/O autoemulsifiable base	20%
	WFI	q.s. 20 g
Gel	Rapamycin	0.4%
	Transcutol®	10%
	Hydroxypropyl methyl cellulose	2%
	WFI	q.s. 20 g
Liposomes	Rapamycin	0.4%
	Transcutol®	3%
	Liposomal solution (Guinoxome®)	25%
	Cholesterol	0.1%
	Isopropyl myristate	10%
	Propylene glycol	10%
	Carbopol	2%
	NaOH 10%	q.s. pH 7.5
	WFI	q.s. 20 g

Q.s. a sufficient quantity, WFI water for injection

Chromatographic Conditions

To determine the validity period of each formulation according to its chemical stability, an HPLC method was developed and validated. A C18 Kromasil column (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) was used. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and water (75/25 v/v). The flow rate was 1 mL/min. The sample injection volume was 10 µL and sample temperature was 25 °C ± 3 °C. The column temperature was 50 °C and the analysis time was 15 min. Rapamycin detection was processed at 280 nm.

Method Validation

The analytical methods were validated according to ICHQ2R1 (International Consensus on Harmonization) [18]. Two calibration curves were developed: one using a mixture of acetonitrile, hexane, and water for injection (WFI) as a diluent (for the chemical stability of ointment, emulsion, and gel formulations) and the other using methanol (for the chemical stability of liposomes). The interday and intraday precision and accuracy of the methods were established using six concentration levels (0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, and 0.15 mg/mL) in duplicate on three different days. The least squares method was used to evaluate linearity, calculating a regression line between concentrations and peak areas of the chromatogram.

Rapamycin Extraction

For the extraction of rapamycin from ointment, emulsion, and gel formulations, 0.1 g of cream was introduced in a glass tube with 4 mL of a mixture of acetonitrile, hexane, and WFI and kept in the vortex for 10 s. The samples were then centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The resulting supernatant was removed, and 1 mL was aliquoted for HPLC analysis. For the extraction of rapamycin from liposomes, 0.100 g of cream was introduced in a glass tube with 4 mL of methanol. The samples were kept in the vortex for 10 s, 50 µL was aliquoted, and after 1/20 dilution with methanol, they were analyzed with the HPLC method.

Rapamycin Degradation

Rapamycin quantity per weighed formulation quantity (Q , mg/g) and percentage content of remaining rapamycin (%RC) in each formulation were determined by triplicate at times (t) = 0, 2, 7, 14, 21, 28, 42, and 56 days. T_{90} was established when %CR was ≤ 90%.

Physical Stability

All pertinent procedures to establish the physical stability of the formulations were carried out following the specifications of the National Drug Formulary [19] and the Guide to Good Practice in the Preparation of Medications in Hospital Pharmacy Services [17].

pH, uniformity, extensibility, absence of crystals, and absence of phase separations were evaluated on a transparent surface according to 3 levels: level 1, the least favorable, and level 3, the most favorable, for 56 days for each formulation.

Liposome Characterization

Only for liposomes mean particle size, zeta potential, and encapsulation efficiency (EE%) were determined by triplicate at $t = 0$ days. Mean particle size and zeta potential were determined using a particle size analyzer that uses the laser diffraction method (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The EE% was obtained via ultrafiltration, using Amicon® ultracentrifugal filters (Merck Millipore, Ireland) with a molecular weight cutoff of 10,000 Da. An aliquot of 500 µL of the liposomal formulation was added to the sample reservoir and centrifuged for 15 min at 14,000 g. Then, 50 µL was aliquoted in duplicate and, after 1/20 dilution with methanol, was analyzed with HPLC method to determine the concentration of free drug in the filtrate. The following equations were used for the calculations [13, 20]:

$$EE\% = \frac{W_t - W_f}{W_t} \times 100$$

where W_t and W_f represent the total amount of the drug and the free amount of the drug, respectively.

Microbiological Stability

Culture samples in blood-agar media of each formulation were incubated at 37 °C in duplicate at $t = 28$ and 56 days, according to the microbiological control instructions of the National Drug Formulary.

Results

Chemical Stability

Method Validation

The calibration curve for the chemical stability of ointment, emulsion, and gel formulations demonstrated linearity with a coefficient of determination (r^2) of 0.9998. The limits of detection (LD) and quantification (LQ) were 0.003 and

0.009 mg/mL, respectively. Linearity was also determined for the chemical stability of the liposomal formulation, with a coefficient of determination (r^2) of 0.9958, LD=0.011 mg/mL, and LQ=0.038 mg/mL.

Rapamycin Degradation

Table 2 shows the rapamycin quantity per weighed formulation quantity (Q, mg/g) and the percentage content of remaining rapamycin (%RC) in each formulation at times (t)=0, 7, 14, 21, 28, 42, and 56 days. Figure 1 shows ointment, emulsion, gel, and liposome chromatograms.

T_{90} was reached during the sampling period for the ointment, emulsion, and gel formulations: T_{90} =56, 14, and 21 days, respectively. Only liposomes were stable for 56 days.

Physical Stability

Table 3 exposes the results of the physical stability parameters for the four formulations. The ointment formulation obtained a level 1 score in extensibility property due to its high petrolatum content, similar to the classical formulation. It should be noted that the emulsion formulation resulted in a pre-separation of phases at 14 days and a definitive breakdown of the emulsion at 21 days; therefore, it was assigned a level 1 score in the absence of phase separations property. The score of level 1 in the absence of crystal property for the gel formulation was awarded by the presence of white particles.

Liposome Characterization

The mean particle size of prepared liposomes determined a good quality result of the analysis with a polydispersity index value <0.2, indicating a homogenous dispersion. The EE% turned out to be very favorable for the liposomal formulation, with a high load of rapamycin per liposome formed.

Microbiological Stability

Culture samples were negative in blood-agar media for each formulation at t =28 and 56 days (Table 3).

Discussion

This study concludes that only one of the four proposed formulations, liposomes, maintains their chemical, physical, and microbiological stability throughout all the sampling time, awarding them a validity period of 56 days.

For the ointment and gel formulations, the chemical stability was the determining factor for not reaching the validity period of 56 days, with T_{90} =56 and 21 days, respectively. In the case of the emulsion formulation, the physical stability was very obviously compromised after pre-separation of phases at 14 days and a definitive breaking up of the emulsion at 21 days. All formulations were microbiologically stable throughout the sampling period. Considering all stability studies, the validity period for each formulation was as follows: ointment=42 days, emulsion=7 days, gel=14 days, and liposomes=56 days.

Rapamycin is a highly apolar, active substance. This stability study confirms that rapamycin is more comfortable among lipophilic excipients, such as petrolatum and liposomes. In hydrophilic vehicles, it tends to precipitate and lose its physical and chemical stability, as in the case of emulsion and gel formulations.

Regarding excipients, transcitol allows a greater solubility of rapamycin in the vehicle [10], thus avoiding possible precipitations of the active principle and constituting a significant improvement in the formulation.

The liposomal formulation has certain advantages over the ointment formulation: it has a better appearance, is more comfortable, and has better extensibility (Photograph 1).

Table 2 Chemical stability results

Rapamycin quantity/weighed formulation quantity (Q, mg/g) $\pm$ SD								
Time (days)	0	2	7	14	21	28	42	56
Ointment	7.21 $\pm$ 0.86	7.13 $\pm$ 0.28	7.22 $\pm$ 0.87	7.59 $\pm$ 0.44	10.19 $\pm$ 3.44	7.34 $\pm$ 0.93	6.64 $\pm$ 0.41	6.40 $\pm$ 0.16
Emulsion	9.41 $\pm$ 0.28	9.29 $\pm$ 0.40	9.18 $\pm$ 1.04	8.12 $\pm$ 0.63	9.48 $\pm$ 0.35	11.10 $\pm$ 1.94	7.59 $\pm$ 0.77	7.87 $\pm$ 2.93
Gel	8.40 $\pm$ 0.01	7.86 $\pm$ 0.10	8.09 $\pm$ 1.85	7.80 $\pm$ 0.44	7.56 $\pm$ 0.19	7.69 $\pm$ 0.42	7.71 $\pm$ 0.22	8.16 $\pm$ 0.23
Liposomes	1.15 $\pm$ 0.11	1.17 $\pm$ 0.03	1.27 $\pm$ 0.13	1.22 $\pm$ 0.09	1.24 $\pm$ 0.03	1.25 $\pm$ 0.07	1.38 $\pm$ 0.14	1.22 $\pm$ 0.18
Percentage content of remaining rapamycin (%RC) $\pm$ SD								
Time (days)	0	2	7	14	21	28	42	56
Ointment	100.00 $\pm$ 0.00	99.97 $\pm$ 12.81	100.20 $\pm$ 4.17	106.82 $\pm$ 18.48	139.48 $\pm$ 31.38	103.58 $\pm$ 24.59	93.47 $\pm$ 16.41	89.45 $\pm$ 8.67
Emulsion	100.00 $\pm$ 0.00	98.89 $\pm$ 6.38	97.70 $\pm$ 12.17	86.52 $\pm$ 9.36	100.80 $\pm$ 3.66	118.48 $\pm$ 24.34	80.68 $\pm$ 7.42	83.85 $\pm$ 31.49
Gel	100.00 $\pm$ 0.00	93.53 $\pm$ 1.15	96.33 $\pm$ 21.98	92.82 $\pm$ 5.25	89.96 $\pm$ 2.20	91.55 $\pm$ 5.03	91.79 $\pm$ 2.60	97.14 $\pm$ 2.70
Liposomes	100.00 $\pm$ 0.00	102.65 $\pm$ 9.99	111.29 $\pm$ 7.43	106.56 $\pm$ 2.34	108.58 $\pm$ 12.29	110.05 $\pm$ 15.94	121.07 $\pm$ 11.86	107.51 $\pm$ 21.12

SD standard deviation

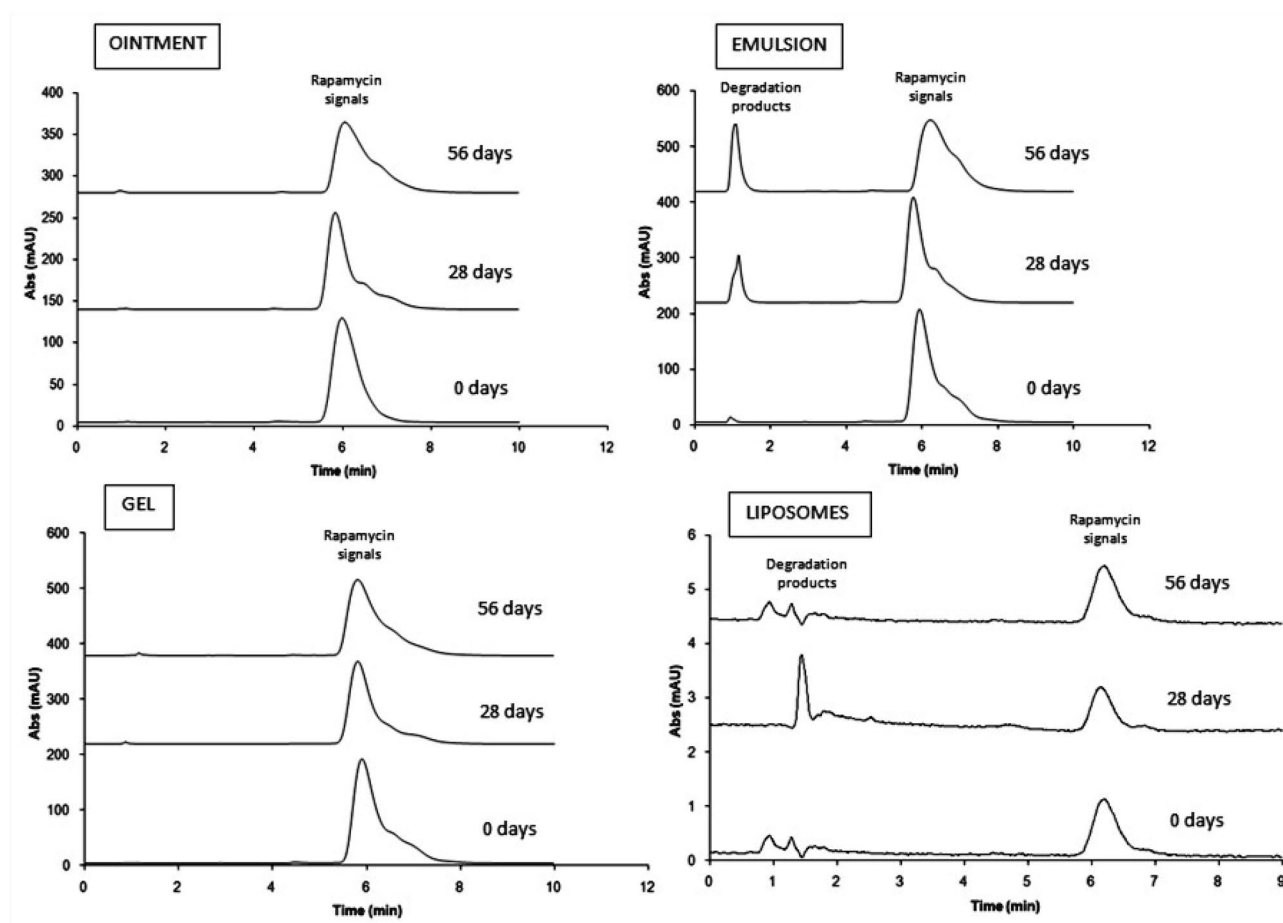


Fig. 1 Ointment, emulsion, gel, and liposome chromatograms

Historically, some patients complained that classic ointment was difficult to apply [21] and the enhanced organoleptic properties of the liposomal formulation would help increase compliance with treatment and patient satisfaction with topical therapy.

Additionally, liposomes have been studied as carriers of molecules for immunosuppressive therapies and chemotherapy [22, 23]. Liposome-encapsulated rapamycin has been shown to have the ability to reach the drug's site of action more quickly, with antiproliferative properties on T cells [23, 24].

Table 3 Physical and microbiological stability results

Physical stability results: properties for 56 days and liposome characterization (mean particle size, zeta potential, and EE% at $t = 0$ days)	Ointment	Emulsion	Gel	Liposomes
pH	7.0	6.0	6.0	7.5
Uniformity	Level 2	Level 3	Level 3	Level 3
Extensibility	Level 1	Level 2	Level 3	Level 3
Absence of crystals	Level 3	Level 3	Level 1	Level 3
Absence of phase separation	Level 3	Level 1	Level 3	Level 3
Mean particle size, <i>PdI</i>	NA	NA	NA	178.9 nm, <i>PdI</i> 0.093
Zeta potential (mV) $\pm$ SD	NA	NA	NA	-41.1 ± 13.4
EE% $\pm$ SD	NA	NA	NA	89.19 ± 4.57
Microbiological stability results: culture samples at $t = 28$ and 56 days	Negatives	Negatives	Negatives	Negatives

NA not applicable, *PdI* polydispersity index, *mV* millivolts, *SD* standard deviation, *EE* encapsulation efficiency

Therefore, liposomes exert their influence on the stratum corneum of the skin, improving the penetration of the active substance and providing an increased bioavailability of rapamycin [20]. This property makes liposomes particularly effective for cosmetic and pharmaceutical use.

In these therapies, the role of the hospital pharmacists is key in the preparation of the formulations, since rapamycin was added to the NIOSH list as a hazardous drug in 2014 [25], which results in greater control in the development of topical formulations [26]. In addition, pharmaceutical care has special relevance in the processes of dispensing, administration, and monitoring, promoting the supervision and control of these patients.

After galenic improvement and confirmation of stability in liposomes, clinical studies are needed to ensure effectiveness, safety, and high patient satisfaction.

Limitations

The authors are aware that there is significant variability in chemical stability results for all formulations. This is due to the fact that during the formulation process, the correct homogenization of the excipients is very difficult, and the extractability of solvents depends on the formulation and its excipients. In any case, this article provides new stability data, allowing support in therapeutic decisions for other authors and clinicians.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12247-023-09792-9>.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature.

Declarations

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

Key Findings

- The results obtained allow a substantial improvement of the therapy in terms of galenic optimization and provide favorable stability data for the liposomal formulation developed.

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

1. Narayanan V. Tuberous sclerosis complex: genetics to pathogenesis. *Pediatr Neurol*. 2003;29(5):404–9.
2. Rumsey N, Clarke A, White P. Exploring the psychosocial concerns of outpatients with disfiguring conditions. *J Wound Care*. 2003;12(7):247–52.
3. Zweegers J, van der Vleuten CJ. The psychosocial impact of an infantile haemangioma on children and their parents. *Arch Dis Child*. 2012;97(10):922–6.
4. Biondo G, Greco S, Mavilia L, Mercuri SR. Treatment of nodular facial angiofibromas in tuberous sclerosis, using ultrapulse carbon dioxide laser. *Clin Exp Dermatol*. 2014;39(6):738–40.
5. Balestri R, Neri I, Patrizi A, Angileri L, Ricci L, Magnano M. Analysis of current data on the use of topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis complex. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(1):14–20.
6. Koenig MK, Hebert AA, Roberson J, Samuels J, Slopis J, Woerner A, et al. Topical rapamycin therapy to alleviate the cutaneous manifestations of tuberous sclerosis complex: a double-blind, randomized, controlled trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied rapamycin. *Drugs R D*. 2012;12(3):121–6.
7. Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Tanaka M, Hayashi M, Matsumoto S, Yamamoto K, et al. Efficacy and safety of topical sirolimus therapy for facial angiofibromas in the tuberous sclerosis complex: a randomized clinical trial. *JAMA Dermatol*. 2017;153(1):39–48.
8. Koenig MK, Bell CS, Hebert AA, Roberson J, Samuels JA, Slopis JM, et al. Efficacy and safety of topical rapamycin in patients with facial angiofibromas secondary to tuberous sclerosis complex: the TREATMENT randomized clinical trial. *JAMA Dermatol*. 2018;154(7):773–80.
9. Chen PL, Hong JB, Shen LJ, Chen YT, Wang SJ, Liao YH. The efficacy and safety of topical rapamycin-calcitriol for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex: a prospective, double-blind, randomized clinical trial. *Br J Dermatol*. 2020;183(4):655–63.
10. Bougueon G, Lagarce F, Martin L, Pailhories H, Bastiat G, Vrignaud S. Formulation and characterization of a 0.1% rapamycin cream for the treatment of tuberous sclerosis complex-related angiofibromas. *Int J Pharm*. 2016;509(1–2):279–84.
11. Le Guyader G, Vieillard V, Andrieux K, Rollo M, Thirion O, Wolkenstein P, et al. Long-term stability of 0.1% rapamycin hydrophilic gel in the treatment of facial angiofibromas. *Eur J Hosp Pharm*. 2020;27(e1):e48–52.
12. Ghanbarzadeh S, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Application of response surface methodology in development of sirolimus liposomes prepared by thin film hydration technique. *Bioimpacts*. 2013;3(2):75–81.
13. Ghanbarzadeh S, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. *Adv Pharm Bull*. 2013;3(1):25–9.
14. Salido R, Garnacho-Saucedo G, Cuevas-Asencio I, Ruano J, Galan-Gutierrez M, Velez A, et al. Sustained clinical effectiveness and favorable safety profile of topical sirolimus for tuberous sclerosis - associated facial angiofibroma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(10):1315–8.
15. Tiedemann Svendsen M, Bygum A, Hansen LK, Broesby-Olsen S. Facial angiofibromas associated to tuberous sclerosis treated with topical sirolimus. *Ugeskr Laeger*. 2013;175(43):2569–70.
16. Ministry of Health, Consumption and Social Welfare. Madrid, Spain. Royal Decree 175/2001, of 23 February, which approves the standards of correct preparation and quality control of magistral formulas and officinal preparations. 2001. Available at: <https://>

- www.boe.es/buscar/pdf/2001/BOE-A-2001-5185-consolidado.pdf. Accessed Sep 2023.
17. Ministry of Health, Consumption and Social Welfare. Madrid, Spain. Guide to good practice of preparation of medications in hospital pharmacy services. June, 2014. Available at: <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/farmacia/pdf/GuiaBPP3.pdf>. Accessed Sep 2023.
 18. International Conference on Harmonisation. Validation of analytical procedures: text and methodology. 2015: 6–12.
 19. Ministry of Health, Consumption and Social Welfare, by mandate of Law 29/2006, of July 26, on guarantee and rational use of medicines and health products. National Drug Formulary. Madrid, Spain. 2019.; Available at: https://www.boe.es/biblioteca_juridica/abrir_pdf.php?id=PUB-NT-2019-112. Accessed Sep 2023.
 20. Yoon HY, Chang IH, Goo YT, Kim CH, Kang TH, Kim SY, et al. Intravesical delivery of rapamycin via folate-modified liposomes dispersed in thermo-reversible hydrogel. *Int J Nanomedicine*. 2019;5(14):6249–68.
 21. Park J, Yun SK, Cho YS, Song KH, Kim HU. Treatment of angiofibromas in tuberous sclerosis complex: the effect of topical rapamycin and concomitant laser therapy. *Dermatology*. 2014;228(1):37–41.
 22. Onyesom I, Lamprou DA, Sygellou L, Owusu-Ware SK, Antonijevic M, Chowdhry BZ, et al. Sirolimus encapsulated liposomes for cancer therapy: physicochemical and mechanical characterization of sirolimus distribution within liposome bilayers. *Mol Pharm*. 2013;10(11):4281–93.
 23. Rouf MA, Vural I, Renoir JM, Hincal AA. Development and characterization of liposomal formulations for rapamycin delivery and investigation of their antiproliferative effect on MCF7 cells. *J Liposome Res*. 2009;19(4):322–31.
 24. Valizadeh H, Ghanbarzadeh S, Zakeri-Milani P. Fusogenic liposomal formulation of sirolimus: improvement of drug antiproliferative effect on human T-cells. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015;41(9):1558–65.
 25. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH list of antineoplastic and other hazardous drugs in healthcare settings, 2014. Available in: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2014-138/pdfs/2014-138.pdf>. 2014. Accessed Sep 2023.
 26. Cortell Fuster C, Martínez Gómez MA, Cercós Lletí AC, Climente Martí M. Topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis: a systematic review based on evidence. *J Dermatolog Treat*. 2021;6:1–7.

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

FARMA-D-24-00022R3: decisión de los editores / editorial decision

em.farma.0.8ad69e.1362c2d5@editorialmanager.com
<em.farma.0.8ad69e.1362c2d5@editorialmanager.com>
en nombre de
Farmacia Hospitalaria <em@editorialmanager.com>

Sáb 20/04/2024 8:00

Para: Clara Cortell Fuster <cortell_cla@gva.es>

Apreciado/a Sra. Cortell-Fuster:

Es un placer comunicarle que su manuscrito "EFFECTIVENESS AND SAFETY OF LIPOSOMAL RAPAMYCIN FOR THE TREATMENT OF FACIAL ANGIOFIBROMAS IN TUBEROUS SCLEROSIS

EFFECTIVIDAD Y SEGURIDAD DE SIRÓLIMUS LIPOSOMAL PARA EL TRATAMIENTO DE ANGIOFIBROMAS FACIALES EN ESCLEROSIS TUBEROSA" (Ref. FARMA-D-24-00022R3) ha sido aceptado para su publicación en la sección Original de la Farmacia Hospitalaria.

Recuerde que en su momento le remitiremos las pruebas de autor en formato pdf a esta misma dirección electrónica.

Agradecemos su confianza por elegir a la revista Farm Hosp para la publicación de sus investigaciones.

Reciba un cordial saludo,

Vicente Merino Bohórquez
Editor
Farmacia Hospitalaria

Dear Sra. Cortell-Fuster,

We are glad to inform you that your article "EFFECTIVENESS AND SAFETY OF LIPOSOMAL RAPAMYCIN FOR THE TREATMENT OF FACIAL ANGIOFIBROMAS IN TUBEROUS SCLEROSIS

EFFECTIVIDAD Y SEGURIDAD DE SIRÓLIMUS LIPOSOMAL PARA EL TRATAMIENTO DE ANGIOFIBROMAS FACIALES EN ESCLEROSIS TUBEROSA" (Ref. FARMA-D-24-00022R3) has been accepted for its publication in Farmacia Hospitalaria.

Please remember that, before publication, you will receive an e-mail with the galley proofs of your article in pdf format.

Thank you for choosing Farm Hosp for the publication of your research.

Yours sincerely,

Vicente Merino Bohórquez
Editor
Farmacia Hospitalaria



Original article

Effectiveness and safety of liposomal rapamycin for the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis

Q1 Clara Cortell-Fuster^{a,*}, María Amparo Martínez-Gómez^a, Ana Cristina Cercós-Lletí^a, Mónica Climente-Martí^a, Tania Díaz Corpas^b, Almudena Mateu Puchades^b and Ángeles Revert Fernández^c

^a Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Doctor Peset, Valencia, Spain

^b Servicio de Dermatología, Hospital Universitario Doctor Peset, Valencia, Spain

^c Servicio de Dermatología, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2024

Accepted 20 April 2024

Available online xxxx

Keywords:

Rapamycin

Sirolimus

Liposomes

Formulation

Facial angiofibromas

Tuberous sclerosis

ABSTRACT

Aim: Topical rapamycin is the pharmacological treatment of choice for facial angiofibromas in rare tuberous sclerosis disease. A new, more advanced, and complex formula was developed in our pharmacy service: rapamycin 0.4% liposomal formulation, with better organoleptic characteristics and a more favorable release profile of the active ingredient.

The purpose of this study is to evaluate the effectiveness and safety of liposomal topical rapamycin for the treatment of facial injuries in this rare disease.

Method: This was an observational, prospective, and multicenter study. Effectiveness was evaluated mainly through facial angiofibromas severity index (FASI), investigator's global assessment (IGA) scores, and dermatology life quality index (DLQI) questionnaire. To assess the safety profile of rapamycin, adverse reactions were reported, and blood tests and plasma rapamycin levels were performed during treatment.

Results: Eleven patients were included, of which 8/11 (73%) patients obtained successful treatment according to FASI and IGA scores after 24 weeks of treatment. Statistical analysis demonstrated a significant improvement ($p < .05$) in FASI and IGA scores, erythema, and FA size after treatment with rapamycin liposomal formulation (FASI before treatment, median (interquartile range): 6.0 (2.0), FASI after treatment: 3.5 (2.0), $p = .0063$). Five patients also improved their quality of life after treatment. Regarding safety profile of rapamycin, the most common adverse reaction was mild pruritus and 2 patients reported erythema, who discontinued treatment prematurely. All hematological tests were normal, and plasma rapamycin levels were undetectable.

Conclusions: After galenic improvements and clinical evaluations, the rapamycin liposomal formulation proved to be effective and safe for this therapeutic indication. This new formulation was included as a magistral formula in our hospital pharmacy service, now accessible for prescribing by dermatologists. Drug development in hospital pharmacy is often the only pharmacological alternative available to treat the symptoms of rare diseases, when treatment options are limited or inadequate.

© 2024 Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (S.E.F.H.). Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Efectividad y seguridad de sirólimus liposomal para el tratamiento de angiofibromas faciales en esclerosis tuberosa

RESUMEN

Objetivo: El sirólimus tópico es el tratamiento farmacológico de elección para los angiofibromas faciales asociados a la enfermedad rara de la esclerosis tuberosa. En nuestro Servicio de Farmacia se desarrolló una nueva fórmula más avanzada y compleja: sirólimus liposomal al 0,4%, con mejores características organolépticas y un perfil de liberación del principio activo más favorable.

El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia y seguridad del sirólimus tópico liposomal para el tratamiento de los angiofibromas en esclerosis tuberosa.

Método: Estudio observacional, prospectivo y multicéntrico. La efectividad se evaluó principalmente a través de la escala FASI (Facial Angiofibromas Severity Index), la escala IGA (Investigator's Global Assessment) y el

Palabras clave:

Rapamicina

Sirólimus

Liposomas

Formulación

Angiofibromas faciales

Esclerosis tuberosa

* Corresponding author at: Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Doctor Peset, Avda. Gaspar Aguilar, 90, 46017 Valencia, Spain.

E-mail address: cortell_cla@gva.es (C. Cortell-Fuster).

cuestionario de calidad de vida en dermatología (DLQI). Para evaluar el perfil de seguridad de la formulación, se reportaron las reacciones adversas y se realizaron pruebas hematológicas y niveles plasmáticos de sirólímus durante el tratamiento.

Resultados: Se incluyeron once pacientes, de los cuales 8/11 (73%) obtuvieron un tratamiento exitoso según las puntuaciones FASI e IGA después de 24 semanas de tratamiento. El análisis estadístico demostró una mejora significativa ($p < 0,05$) en las puntuaciones FASI e IGA, el eritema y el tamaño de los AF después del tratamiento con la formulación liposomal de sirólímus (FASI antes del tratamiento, mediana(rango intercuartílico): 6,0(2,0), FASI después del tratamiento: 3,5(2,0), $p = 0,0063$). Cinco pacientes también mejoraron su calidad de vida tras el tratamiento. En cuanto al perfil de seguridad, la reacción adversa más frecuente fue prurito leve y dos pacientes refirieron eritema, por lo que suspendieron el tratamiento prematuramente. Todas las pruebas hematológicas fueron normales y los niveles plasmáticos de sirólímus fueron indetectables en todos los casos.

Conclusiones: Tras la optimización galénica y la evaluación clínica, el sirólímus liposomal demostró ser efectivo y seguro para esta indicación. Esta nueva formulación fue incluida como fórmula magistral en el nuestro servicio de farmacia, quedando disponible para su prescripción por parte de Dermatología. La elaboración de medicamentos en los servicios de farmacia hospitalaria es, en muchas ocasiones, la única alternativa farmacológica posible para tratar los síntomas de las enfermedades raras, cuando las opciones de tratamiento son limitadas o inadecuadas.

© 2024 Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (S.E.F.H.). Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Tuberous sclerosis (TS) is a rare autosomal dominant disease with an incidence of 1 in 6000 to 1 in 10 000 individuals¹ in which a series of mutations occur in tumor suppressor genes (TSC1 and TSC2). This leads to deregulation of the mTOR pathway and uncontrolled cell proliferation, resulting in multisystem formation of benign tumors called hamarthomas². These tumors can have different severity and locations, one of the most common being the kidneys. In addition, they can be affected by slight traumas that can also cause uncontrolled bleeding³.

The most common skin manifestation of TS is facial angiofibromas (FA). They constitute a fundamental diagnostic criterion for the disease since they are present in up to 80% of patients. FA appear at an early age and tend to stabilize in number and size in adolescence, which sometimes represents an esthetic and psychological problem for these patients^{4,5}.

Multiple treatments have been established for this skin condition. Physical treatments like radiofrequency, electrocoagulation, cryotherapy, dermabrasion, and laser therapy present certain problems because are invasive and painful and require anesthesia^{6,7}. The interest of mTOR inhibitors focuses pharmacological treatment on everolimus and sirolimus, and recent publications place topical rapamycin (sirolimus) as the most appropriate alternative. This molecule is a powerful mTOR inhibitor with immunosuppressive, antitumor, and antiangiogenic characteristics⁸.

We found multiple studies in the literature that ensure the effectiveness and safety of this pharmacological therapy, such as case series and several clinical trials, with a higher evidence level^{9–13}. However, significant variability was evident in the concentrations, dosages, and formulations tested in the literature.

In our hospital pharmacy service, we decided to optimize the conventional formulation commonly used by dermatologists in accordance with standard clinical practice: rapamycin 0.4% in vaseline. The result of galenic research and development was a more advanced and complex formula: a 0.4% liposomal formulation of rapamycin^{3,14} prepared in a biological safety cabinet. The exact composition of the liposomal formulation was rapamycin 0.4%, transcuto[®] 3%, liposomal solution (Guinoxome[®]) 25%, cholesterol 0.1%, isopropyl myristate 10%, propylene glycol 10%, carbopol 2%, NaOH 10% q.s. pH 7.5, and water for injection q.s. 20 g. In the cosmetic and pharmaceutical fields, pre-prepared and commercially available lipid solutions are used, which can form liposomes upon incorporating an aqueous solution. Specifically, the Guinoxome[®] liposomal solution allows for easy and high-quality liposome formation. The remaining components of the formulation serve as humectants and stabilizers, with special attention given to transcuto. This solvent functions as an excellent absorption promoter, showing a higher

solubility of rapamycin in this vehicle compared to liquid paraffin¹⁵. The liposomes obtained were lighter, with better extensibility, and because of their characteristics, they are compatible with all skin types¹⁶. In addition, previous studies have reported a greater release of the active ingredient in liposomal vesicles than in other formulations, like gels¹⁷. This new liposomal formulation was validated based on its chemical, physical, and microbiological stability, with an encapsulation efficiency of 89% for rapamycin¹⁸. The validity period was 3 months at 3–8 °C¹⁹.

According to standard clinical practice, topical liposomal rapamycin administration can improve the appearance of FA, demonstrating the drug's effectiveness and safety following formulation optimization.

This study aims to evaluate the effectiveness and safety of liposomal topical rapamycin for the treatment of FA in rare TS disease.

Method

Study design and development

This was an observational, prospective, longitudinal, and multicenter study. The study period during which patients were recruited was between December 2021 and October 2023. The participating centers were the Doctor Peset University Hospital and University Clinical Hospital of Valencia, Spain. The clinical services involved were the pharmacy service of the Doctor Peset University Hospital and the dermatology service of both hospitals.

Description

This study was divided into 3 distinct phases: screening, treatment, and follow-up. Detailed assessments can be found in Annex 1.

Screening phase

The suitability of the participants for inclusion in the study was assessed. Informed consent was obtained, and patient demographics, medical history, and concomitant medications were collected.

Treatment phase

The treatment phase consisted of a clinical visit at baseline (V_0) and 3 subsequent clinical visits after 2, 12, and 24 weeks of treatment with the rapamycin liposomal formulation (P_1 , V_2 , and V_3). Patients were instructed how to administer the treatment: 3 times per week in the afternoon using a nitrile glove. The amount of formulation required to produce a thin confluent layer on the skin was 6 mg/cm² and was based on the size of the affected area. Its gel texture allows for excellent application and absorption onto skin conditions on the cheeks, nose, and chin. Patients completely removed the formulation after 2 or 3 h of exposure

by washing with water and neutral soap. It was recommended to keep the area well hydrated, avoid sun exposure, and use sunscreen creams with SPF 50. Patients who discontinued treatment prematurely underwent a visit (V_x) in whom effectiveness and safety were evaluated.

Follow-up

A follow-up visit (P_4) was performed 4 weeks after the V_3 or V_x visit, in which early withdrawal of treatment was confirmed.

Inclusion criteria

1. Male and female patients aged ≥ 10 years and ≤ 65 years on the day informed consent was obtained.
2. Patients diagnosed with TS and presenting visible FA.
3. FASI (facial angiofibromas severity index) score²⁰ of at least 3 and no greater than 8 (Annex 2).
4. IGA (investigator's global assessment) score¹³ of at least 2 and no greater than 4 (Annex 2).

Exclusion criteria

1. Patients who have received any mTOR inhibitor in the 3 months prior to selection by any route of administration.
2. Patients with laser or surgical therapy in the 6 months prior to selection.
3. Patients with serious skin lesions like erosions or ulcers.
4. Patients with known hypersensitivity to any component of the study product.
5. Patients with immune dysfunction or receiving any form of immunosuppression.
6. Pregnant or lactating females.

Prohibited concomitant medications

The following medications are prohibited during the study to avoid potential interference with the assessment of effectiveness and safety:

- i. Laser and surgical treatment in the targeted treatment area.
- ii. Application of steroids or other immunosuppressive agents to the designated area.
- iii. Administration of mTOR inhibitors (rapamycin, everolimus, temsirolimus, etc.) by any route of administration.
- iv. Potent inhibitors of CYP3A4 and/or P-gp (such as ketoconazole, voriconazole, itraconazole, erythromycin, telithromycin, or clarithromycin) or strong inducers of CYP3A4 and/or P-gp (such as rifampicin) by any route of administration.

Evaluation of effectiveness

Objective evaluation by investigator (OEI)

Primary endpoints.

- Percentage of patients with successful treatment according to a decrease of 2 or more points on FASI score after treatment.
- Percentage of patients with successful treatment according to a decrease of 1 or more points on IGA score after treatment.
- Median values of FASI score and the subcategories: erythema, size, and extension before and after treatment.
- Median values of IGA score before and after treatment.

Secondary endpoints.

- Percentage of patients with successful treatment according to a decrease of 2 or more points on FASI score after 12 weeks of treatment.
- Percentage of patients with successful treatment according to a decrease of 1 or more points on IGA score after 12 weeks of treatment.

- Time to treatment success (weeks of treatment) according to FASI and IGA scores.

Subjective evaluation by investigator (SEI)

Primary endpoints.

- Subjective improvement score: SIS (minimal, moderate, good, or excellent) in photographs of FA after treatment.

Secondary endpoints.

- SIS (minimal, moderate, good, or excellent) in photographs of FA after 12 weeks of treatment.

Quality of life

Primary endpoints.

- Percentage of patients with an improvement in quality of life according to a decrease in score on the dermatology life quality index (DLQI) questionnaire after treatment (Annex 3).
- Median values of DLQI questionnaire before and after treatment.

Secondary endpoints.

- Percentage of patients with an improvement in quality of life according to a decrease in score on the DLQI questionnaire after 12 weeks of treatment.

Evaluation of safety

Adverse events (AEs)

- Notification of adverse reactions during P_1 , V_2 , V_3 , and P_4 visits.

Hematology

- Blood tests with complete blood count using flow cytometry (white blood cell, red blood cell, and platelet counts) during V_0 , V_2 , and V_3 visits. (Abbott ARCHITECT®, Abbott Park, IL, USA).

Pharmacokinetics

- Plasma rapamycin levels at V_2 and V_3 visits. A chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) was utilized for the quantitative determination of sirolimus in human whole blood (Abbott ARCHITECT®, Abbott Park, IL, USA). Prior to initiating the automated ARCHITECT sequence, a manual pretreatment step was undertaken. This involved extracting the whole blood sample (150 μ L) with a precipitation reagent (300 μ L), followed by heating (10 min at 42 °C) and centrifugation (5 min at 10,900 rpm). Subsequently, the supernatant was decanted into a Transplant Pretreatment Tube, which was then placed onto the ARCHITECT i System for further processing. The limit of detection of the ARCHITECT Sirolimus assay was 0.3 ng/mL.

Statistical methods

A standard descriptive analysis was performed on all variables at baseline, continuous variables will be expressed as mean and standard deviation, and qualitative variables will be expressed as absolute frequencies, percentages, and proportions. The statistical analysis was conducted using the intention-to-treat (ITT) approach. All study participants were included in the analysis, regardless of their compliance with the treatment or any protocol deviations. To evaluate the normality of the data, the Shapiro-Wilk test was employed, which is

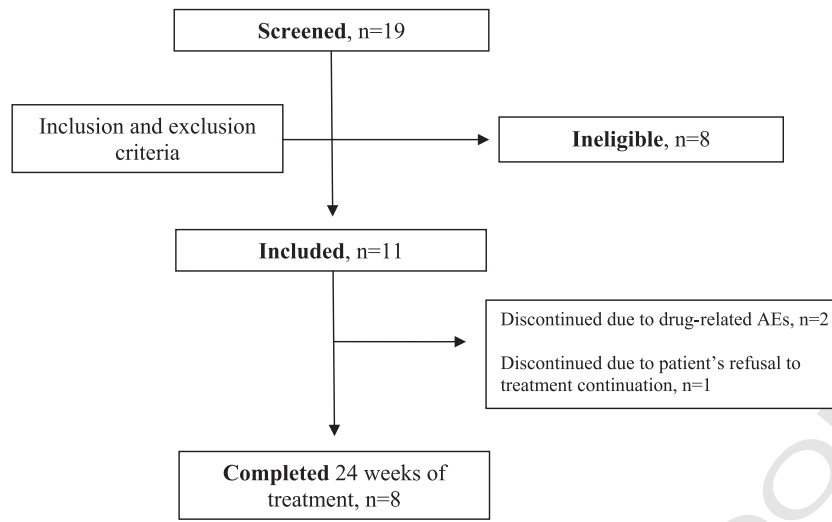


Fig. 1. Patient disposition. AEs: adverse events.

suitable for small samples ($n < 30$). The logistic transformation was applied due to the non-normal distribution but was not entirely effective in normalizing the data. Non-parametric tests were subsequently conducted, specifically the Wilcoxon signed-rank test for paired samples, with variables expressed as median values and interquartile ranges (IQR). Deviations were considered statistically significant when $p < .05$. Stata® 13.1 was used for the processing of statistical information.

Results

Eleven patients were screened. After exclusion of 8 ineligible patients, 11 patients were included (Fig. 1), of which 8 were women. The median age was 36 (11–64) years at screening. Most of the patients were of Caucasian ethnicity, which is predominant in Spain. Four patients additionally had hamarthromas in different locations, such as the kidneys or lungs. Three patients had prior treatment with topical rapamycin, while four underwent laser or surgical pre-treatment. However, these patients always met the inclusion/exclusion criteria. Two patients also presented atopic dermatitis as a dermatological pathology (Table 1). Baseline FASI and IGA scores can be seen in Table 2.

Eight patients completed 24 weeks of treatment, and 3 did not. Two due to drug-related AEs (patient 01 and patient 07) and one due to patient's refusal to treatment continuation (patient 08). Consequently, effectiveness and safety were evaluated in all patients except patient 08.

Evaluation of effectiveness

Objective evaluation by investigator (OEI)

Eight of eleven (73%) patients obtained successful treatment according to FASI and IGA scores after 24 weeks of treatment (Table 2). All

patients decreased or maintained their FASI and IGA scores after treatment. The final evaluation of effectiveness for patients 01 and 07 occurred at Vx (prior to week 24 of treatment). Table 2 displays the median values and IQR for the FASI score, including its subcategories (erythema, size, and extension), as well as the IGA score before and after treatment. The Fig. 2 corresponds to the box plots showing the distribution of FASI and IGA scores before and after treatment. The central line represents the median, the box spans the IQR, and outliers are depicted as individual data points.

After 12 weeks of treatment, 6/11 patients (55%) achieved successful treatment according to the FASI score. In contrast, based on the IGA score, successful treatment was observed in 7 patients (64%) (Table 2).

The time to treatment success, measured in weeks of treatment according to the FASI score, was 12 weeks for 6 patients and 24 weeks for 2 patients. Likewise, according to the IGA score, treatment success occurred at 12 weeks for 7 patients and at 24 weeks for 1 patient (Table 2).

Subjective evaluation by investigator (SEI)

SIS of FA after treatment was minimal for 2/11 (18%) patients, good for another 2 patients and excellent for 6/11 (55%) patients (Table 2).

SIS of FA after 12 weeks of treatment was good for 8/11 (73%) patients (Table 2). Representative photographs of 2 patients are presented in Annex 4, with an excellent SIS after treatment.

Quality of life

Five of eleven (45%) patients improve their quality of life according to a decrease in score on DLQI questionnaire after treatment.

Median values and IQR for the DLQI questionnaire before and after treatment are shown in Table 2. Fig. 2 corresponds to the box plot showing the distribution of DLQI scores before and after treatment.

Four of eleven (36%) patients improve their quality of life according to a decrease in score on DLQI questionnaire after 12 weeks of treatment.

Evaluation of safety

Adverse events (AEs)

No serious adverse events were reported during the treatment or follow-up period. Five of eleven (45%) patients reported an adverse event during the treatment phase. The most common adverse reaction was mild pruritus (5/11, 45%) in the administration area that stopped in all cases after 5–10 min of exposure to the formulation. Two of eleven (18%) patients communicated dry skin and 2 other patients reported a feeling of tightness. Of note, 2 patients informed of erythema, leading

Table 1
Patient characteristics at baseline ($n = 11$).

Characteristic	Value, n (%) or mean (SD)
Gender (female)	8 (73)
Age (years)	36.5 (18.6)
Ethnicity	
Caucasian	8 (73)
Hispanic or latino	2 (18)
Not hispanic or latino	1 (9)
Unknown or not reported	0 (0)
Hamarthromas in different locations	4 (36)
Pre-treated with topical rapamycin	3 (27)
Pre-treated with laser or surgery	4 (36)
Other dermatological pathologies	2 (18)

Table 2
Evaluation of effectiveness.

Patient	OEI						SEI		Quality of life		
	FASI V ₀	FASI V ₂	FASI V ₃	IGA V ₀	IGA V ₂	IGA V ₃	SIS V ₂	SIS V ₃	DLQI V ₀	DLQI V ₂	DLQI V ₃
SIRO-01	7	–	7*	4	–	4*	–	Minimal*	4	–	9*
SIRO-02	5	3	3	2	1	1	Good	Good	2	1	1
SIRO-03	7	5	4	3	2	1	Good	Excellent	1	1	5
SIRO-04	5	4	3	2	2	1	Good	Good	0	3	2
SIRO-05	8	6	5	4	3	2	Good	Excellent	5	2	0
SIRO-06	7	6	4	4	3	1	Good	Excellent	3	4	1
SIRO-07	5	–	5*	3	–	3*	–	Minimal*	0	–	2*
SIRO-08	6	–	–	3	–	–	–	–	1	–	–
SIRO-09	6	4	3	3	2	1	Good	Excellent	12	1	1
SIRO-10	6	4	3	3	2	1	Good	Excellent	0	0	0
SIRO-11	6	4	3	3	2	1	Good	Excellent	7	1	0
Wilcoxon signed-rank test for paired samples, $n = 11$. Median (interquartile range, IQR).											
			V ₀			V ₃					p value
FASI			6.0 (2.0)			3.5 (2.0)					.0063**
Erythema			2.0 (0.0)			1.0 (1.0)					.0069**
Size			2.0 (0.0)			1.0 (1.0)					.0253**
Extension			2.0 (1.0)			2.0 (0.0)					.1573
IGA			3.0 (1.0)			1.0 (1.0)					.0068**
DLQI			2.0 (5.0)			1.0 (2.0)					.5733

OEI: objective evaluation by investigator.
FASI: facial angiofibromas severity index.
IGA: investigator's global assessment.
SEI: subjective evaluation by investigator.
SIS: subjective improvement score.
DLQI: dermatology life quality index.

* Assessments in Vx.
** Statistically significance.

to premature discontinuation of treatment before V₂. All adverse reactions disappeared when treatment was stopped, as this was confirmed during the P₄ visit.

Hematology

All hematological tests were normal for all patients. There were no significant changes in white blood cell, red blood cell, or platelet counts. All analytical values fell within the normal range.

Pharmacokinetics

All plasma rapamycin levels were undetectable for all patients, being below the detection limit of the technique (<0.3 ng/mL).

Discussion

All patients who completed 24 weeks of treatment obtained successful treatment, according to FASI and IGA scores (8/11, 73%). Specifically, FASI score to measure effectiveness is a simple, reproducible, and

validated tool for assessing the severity of FA and subsequent response to rapamycin treatment. As demonstrated, this scale provides a more objective assessment, evaluating erythema, size, and extension of FA²⁰. Statistical analysis demonstrated a significant difference ($p < .05$) between FASI score, erythema, FA size, and IGA score before and after treatment with rapamycin liposomal formulation. The non-parametric tests did not show significant differences regarding the extension of FA (Table 2).

Patients who completed 24 weeks of treatment considerably improved the appearance of their FA in subjective evaluation. Particularly, 6/11 (55%) patients obtained excellent improvement of their injuries. Regarding Annex 4, FA in both patients decreased in erythema, size, and extension, achieving considerable flattening of the lesions.

Patient satisfaction also represent a relevant aspect in our study, with an improvement in quality of life in 5/11 (45%) patients after treatment. Nevertheless, significant differences regarding the DLQI scores were not observed in the non-parametric tests (Table 2). FA appeared between 2 and 5 years of age and grow in number and size, stabilizing

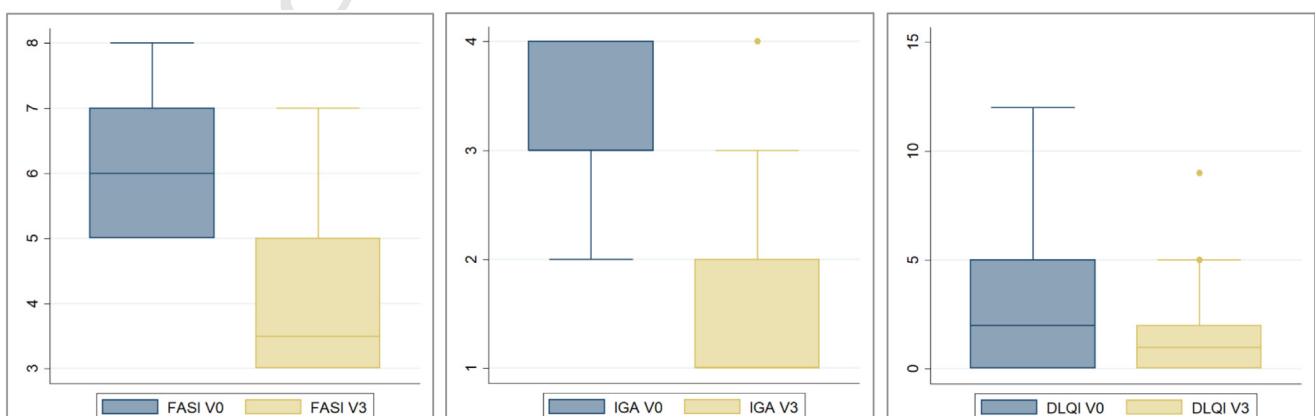


Fig. 2. Box plots of FASI, IGA, and DLQI scores before and after treatment, $n = 11$. FASI: facial angiofibromas severity index. IGA: investigator's global assessment. DLQI: dermatology life quality index.

in adolescence²¹. The visual impact of facial injuries implies a self-image issue^{4,5} especially in young patients, and sometimes dermatological treatment is not prioritized because there are other more serious complications associated with this rare disease. It has been observed that there is a greater angiogenic component at very early ages, while in elderly patients, fibromatous lesions tend to predominate. The exclusion criteria related to age are based on these observations and align with the criteria established by other similar clinical studies, including randomized clinical trials.

Overall, the new formulation was well tolerated, with mild adverse events reported that resolved upon completion of treatment. Two patients experienced moderate erythema, prompting early treatment discontinuation. Notably, both patients had a history of atopic dermatitis. Hematological and pharmacokinetic tests confirmed the lack of systemic absorption of rapamycin after topical administration, further enhancing the drug's safety profile.

Comparing our findings with existing studies proves difficult due to substantial variability in assessing effectiveness. Evaluation methods range from validated scales to subjective researcher opinions. Of the 5 randomized clinical trials found in the literature, only 2 studies evaluate effectiveness according to standardized objective scales.^{12,13} All patients treated with sirolimus showed statistically significant improvement according to FASI and IGA scores compared to placebo. In our study, all patients who completed the 24-week treatment period achieved favorable effectiveness outcomes and the results align with previously published studies. Adverse reactions were consistent with literature and prior experiences, with no reported serious adverse events.

Greater long-term follow-up of liposomal rapamycin treatment would be appropriate to ensure effectiveness and safety. However, it should be noted that patients are not treated continuously, but rest during the summer months, to minimize or prevent the adverse events derived from rapamycin phototoxicity.

In any case, liposomes provide several advantages that allow a substantial improvement in the treatment of FA. This innovative formula exhibits superior organoleptic characteristics, appearance, and extensibility. Moreover, the sensation after application is more comfortable compared to vaseline^{16,18}. Additionally, it can be more easily removed with water and neutral soap than other formulations due to its lightweight nature, thus preventing the patient from irritating the facial skin during the washing process. All these benefits contribute to enhancing treatment compliance and patient satisfaction with topical therapy.

On the other hand, liposomes have been demonstrated to serve as carriers for molecules in chemotherapy and immunosuppressive treatments^{22,23}. Specifically, liposome-encapsulated rapamycin can reach the drug's site of action more quickly with a better release profile, providing an increased bioavailability of rapamycin and improving the penetration of the active substance¹⁷. These results underscore the importance of focusing on the optimization of formulations and the incorporation of new drug delivery systems in magistral formulation within hospital pharmacy services. Our work is an example of this approach. Drug development in hospital pharmacy services is often the only pharmacological alternative available to treat the symptoms of rare diseases, when treatment options are limited or inadequate.

In these rare diseases, pharmacy services are key elements in the pharmacotherapeutic process. In collaboration with dermatologists, hospital pharmacists can conduct a clinical follow-up of patients, contributing to improve effectiveness and minimize adverse reactions³. Pharmaceutical care demonstrates special relevance in the processes of formulation, dispensing, administration, and follow-up, promoting the correct supervision of these patients and greater integration of hospital pharmacists into the multidisciplinary team.

After galenic improvements and clinical evaluations, the rapamycin liposomal formulation proved to be effective and safe for the treatment of FA in rare TS disease. This innovative formulation was included as a magistral formula in the pharmacy service of the Doctor Peset University Hospital, now accessible for prescribing by dermatologists.

The limited number of participants in this observational study could impact the reliability and applicability of the study's results. The initial sample size was not calculated due to it being a rare disease, and patient recruitment proceeded through casual or incidental sampling, as cases occurred and were referred by dermatologists. The methodology used and the statistical tests applied have taken into consideration the sample size ($n < 30$). However, it should be noted that TS is a rare disease that affects a minority of the population (fewer than 1 in 2000 people) and therefore recruiting patients is a more arduous and difficult task.

Impact statements

- This observational study proves the effectiveness and safety of a new rapamycin liposomal formulation for the treatment of facial angiofibromas in rare tuberous sclerosis disease.
- This innovative formula allows a substantial benefit for patients. Its organoleptic characteristics contribute to improve treatment compliance and patient satisfaction with topical rapamycin.
- Liposome-encapsulated rapamycin can reach the drug's site of action more quickly with a better release profile, improving the penetration of the active substance.
- This research provides new clinical data allowing support in therapeutic decisions for other authors, pharmacists, and dermatologists.

Ethics approval

This study was evaluated and approved by the Clinical Research Ethics Committee of Doctor Peset University Hospital (Registration number: 16.102 on 6 May 2021, in Valencia, Spain).

All tests and procedures of the study were performed in accordance with the Declaration of Helsinki for medical research involving human subjects, including research on identifiable human material and data (Helsinki, 1964).

Carta de presentación

A/A de la Dirección de la Revista Farmacia Hospitalaria.

Les escribimos para expresar nuestro interés en publicar nuestro trabajo en la revista Farmacia Hospitalaria.

Título: *Innovación terapéutica en farmacia hospitalaria: efectividad y seguridad de una nueva formulación liposomal de sirolimus para el tratamiento de los angiofibromas faciales asociados a esclerosis tuberosa.*

Actualmente este manuscrito no se encuentra bajo consideración o revisión por ninguna otra revista. Todos los autores son conscientes y han aprobado el envío del artículo a la revista Farmacia Hospitalaria, han declarado no poseer conflicto de intereses y han tenido en cuenta las instrucciones para el envío de manuscritos y las responsabilidades éticas. En cualquier caso, los autores somos conscientes del máximo de figuras y tablas permitido por normas de publicación para los originales, pero por la relevancia de los datos no hemos podido sintetizar estos anexos en un número menor. Deseamos que este aspecto no sea un inconveniente y aceptamos sugerencias y/o modificaciones.

El presente trabajo trata de un estudio observacional, prospectivo y multicéntrico sobre la evaluación de la efectividad y la seguridad de una nueva formulación liposomal para el tratamiento de los angiofibromas faciales en esclerosis tuberosa. Los autores centran sus conclusiones en el campo de la farmacia hospitalaria, la atención farmacéutica y la dermatología clínica, aportando esta investigación nuevos datos para la toma de decisiones terapéuticas de otros autores, farmacéuticos y dermatólogos. El cuerpo del manuscrito, las tablas y las figuras están escritos en inglés para mayor alcance del trabajo en caso de publicación, permitiendo la inclusión del estudio en futuras revisiones sistemáticas y evitando así la limitación del idioma.

Como farmacéuticas especialistas en Farmacia Hospitalaria y facultativas especialistas en Dermatología, nos complace aportar valor al campo de la farmacia hospitalaria y la dermatología clínica compartiendo los resultados de nuestra investigación con la comunidad académica y profesional en general.

Los autores somos conscientes del tiempo necesario para un proceso de revisión adecuado y riguroso, pero declaramos la necesidad de un proceso rápido de publicación por la especial actualidad de la investigación. Asimismo, la autora principal para la correspondencia, se encuentra en la fase final de su Tesis Doctoral y este último manuscrito es la publicación necesaria para completar el proceso debidamente por compendio de publicaciones.

Por último, hemos de destacar que los resultados preliminares del actual trabajo se expusieron en el 68 Congreso de la SEFH como presentación oral quedando seleccionada como una de las ocho mejores comunicaciones científicas.

Quedamos a vuestra disposición para cualquier duda o aclaración.

Muchas gracias por considerar nuestro manuscrito como posible publicación en la revista Farmacia Hospitalaria.

Saludos cordiales

Clara Cortell Fuster – 44525884T
María Amparo Martínez Gómez – 73391436T
Ana Cristina Cercós Lletí – 24329842M
Mónica Climente Martí – 22698468K
Tania Díaz Corpas – 48580305G
Almudena Mateu Puchades – 45630477H
Ángeles Revert Fernández – 20785248X

Funding

The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.

Appendix A. Schedule of assessments

Assesment	Study phases					
	Screening		Treatment			Follow-up
	IC	Screening	V ₀ Baseline	P ₁ 2 weeks	V ₂ 12 weeks	V ₃ 24 weeks
Tolerance	– 14 days to day 0		NA	± 5 days	± 5 days	± 5 days
Informed consent	X					
Inclusion/exclusion criteria		X				
Demographic data		X				
Medical history		X	X			X
Concomitant medications		X	X			X
Drug administration			X			
OEI (FASI, IGA)			X		X	X
SEI (Photographs, SIS)			X		X	X
DLQI			X		X	X
Hema			X		X	X
PK					X	X
AEs			X			X

Description of procedures.

V₀, V₂ and V₃: on-site visits.

P₁ and P₄: phone visits.

NA: not applicable.

OEI: objective evaluation by investigator.

FASI: facial angiofibromas severity index.

IGA: investigator's global assessment.

SEI: subjective evaluation by investigator.

SIS: subjective improvement score.

DLQI: dermatology life quality index.

Hema: hematology tests. White blood cell, red blood cell, and platelet counts.

PK: pharmacokinetics. Plasma rapamycin levels.

AEs: adverse events.

CRediT authorship contribution statement

Clara Cortell-Fuster: Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **María Amparo Martínez-Gómez:** Validation, Supervision, Investigation. **Ana Cristina Cercós-Lletí:** Validation, Supervision, Methodology, Conceptualization. **Mónica Climente-Martí:** Validation, Supervision, Resources, Methodology, Conceptualization. **Tania Díaz Corpas:** Validation, Supervision, Resources, Investigation. **Almudena Mateu Puchades:** Validation, Supervision, Resources, Methodology, Investigation, Conceptualization. **Ángeles Revert Fernández:** Validation, Supervision, Resources, Investigation.

Availability of data and material

The data generated during and/or analyzed for this article are available from the corresponding author on a reasonable request.

Declaration of competing interest

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Acknowledgements

This study was possible thanks to the collaboration and involvement of the following clinical services in Valencia, Spain:

- Pharmacy Service of the Doctor Peset University Hospital.
- Dermatology Service of the Doctor Peset University Hospital.
- Dermatology Service of the University Clinical Hospital.

The authors would also like to express their special gratitude to all the patients who participated in the study.

Appendix B. FASI and IGA scores

FASI score				FASI score Mild: ≤5 Moderate: 6–7 Severe: ≥8
Erythema				
Skin color = 0	Light red = 1	Red = 2	Dark red/purple = 3	
Size				
Small (<5 mm) = 1		Large (>5 mm) = 2	Confluent = 3	
Extension				
<50% cheek surface = 2		>50% cheek surface = 3		
IGA score				
grade	Short description	Detailed description		
0	Clear	No signs of facial angiofibroma		
1	Almost Clear	Small lesions (<2 mm), normal to pink coloration		
2	Mild	Predominantly small lesions (2–4 mm), pink to light red		
3	Moderate	Coloration		
4	Severe	Predominantly large lesions (4–6 mm), dull to bright red coloration		
		Large (>6 mm) or confluent lesions of dark red/purple coloration		

FASI: facial angiofibromas severity index.

IGA: investigator's global assessment.

Appendix C. DLQI questionnaire

Dermatology life quality index (DLQI)

- During the last month, have you experienced itching, inflammation, pain, or stinging on your skin?
 - Very much
 - A lot
 - A little
 - Not at all
- During the last month, have you felt uncomfortable or self-conscious because of your skin problems?
 - Very much
 - A lot
 - A little
 - Not at all
- During the last month, have your skin problems interfered with your shopping or household activities?
 - Very much
 - A lot
 - A little
 - Not at all
- Over the past month, have your skin problems influenced the clothes/makeup/hair style you wore?
 - Very much
 - A lot
 - A little
 - Not at all
- During the last month, have your skin problems affected any social or leisure activities?
 - Very much
 - A lot
 - A little
 - Not at all
- During the last month, has it been difficult for you to play a sport because of your skin problems?
 - Very much
 - A lot
 - A little
 - Not at all
- During the last month, have your skin problems prevented you from working or studying?
 - Very much
 - A lot
 - A little
 - Not at all
- During the last month, has your skin caused you problems with your partner or a close friend or relative?
 - Very much
 - A lot
 - A little
 - Not at all
- During the last month, have your skin problems made your sex life difficult?
 - Very much
 - A lot
 - A little
 - Not at all
- During the last month, has treating your skin been a problem for you, for example because it has made the house dirty or taken up your time?
 - Very much
 - A lot
 - A little
 - Not at all

DLQI score

- 3 points
- 2 points
- 1 point

d. 0 points
Maximum score = 30 points



Appendix D. Subjective evaluation by investigator (SEI) before (1, 3) and after treatment (2, 4)

References

- (1). Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet*. 2008 Aug 23;372 (9639):657–68. doi: [10.1016/S0140-6736\(08\)61279-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61279-9).
- (2). Narayanan V. Tuberous sclerosis complex: genetics to pathogenesis. *Pediatr Neurol*. 2003 Nov;29(5):404–9 S0887899403004338.
- (3). Cortell Fuster C, Martínez Gómez MA, Cercós Lletí AC, Climente Martí M. Topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis: a systematic review based on evidence. *J Dermatolog Treat*. 2022 Jun;33(4):1804–10. doi: [10.1080/09546634.2021.1905768](https://doi.org/10.1080/09546634.2021.1905768).
- (4). Rumsey N, Clarke A, White P. Exploring the psychosocial concerns of outpatients with disfiguring conditions. *J Wound Care*. 2003 Jul;12(7):247–52. doi: [10.12968/jowc.2003.12.7.26515](https://doi.org/10.12968/jowc.2003.12.7.26515).
- (5). Zweegers J, van der Vleuten CJ. The psychosocial impact of an infantile haemangioma on children and their parents. *Arch Dis Child*. 2012 Oct;97(10):922–6. doi: [10.1136/archdischild-2012-302470](https://doi.org/10.1136/archdischild-2012-302470).
- (6). Jozwiak S, Sadowski K, Kotulska K, Schwartz RA. Topical use of mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors in tuberous sclerosis complex—a comprehensive review of the literature. *Pediatr Neurol*. 2016 Aug;61:21–7. doi: [10.1016/j.pediatrneurol.2016.04.003](https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2016.04.003).
- (7). Biondo G, Greco S, Mavilia L, Mercuri SR. Treatment of nodular facial angiofibromas in tuberous sclerosis, using ultrapulse carbon dioxide laser. *Clin Exp Dermatol*. 2014 Aug;39(6):738–40. doi: [10.1111/ced.12327](https://doi.org/10.1111/ced.12327).
- (8). Balestri R, Neri I, Patrizi A, Angileri L, Ricci L, Magnano M. Analysis of current data on the use of topical rapamycin in the treatment of facial angiofibromas in tuberous sclerosis complex. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015 Jan;29(1):14–20. doi: [10.1111/jdv.12665](https://doi.org/10.1111/jdv.12665).
- (9). Koenig MK, Hebert AA, Roberson J, Samuels J, Slopis J, Woerner A, et al. Topical rapamycin therapy to alleviate the cutaneous manifestations of tuberous sclerosis complex: a double-blind, randomized, controlled trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied rapamycin. *Drugs R D*. 2012 Sep 1;12(3):121–6. doi: [10.2165/11634580-000000000-00000](https://doi.org/10.2165/11634580-000000000-00000).
- (10). Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Tanaka M, Hayashi M, Matsumoto S, Yamamoto K, et al. Efficacy and safety of topical sirolimus therapy for facial angiofibromas in the tuberous sclerosis complex: a randomized clinical trial. *JAMA Dermatol*. 2017 Jan 1;153(1):39–48. doi: [10.1001/jamadermatol.2016.3545](https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.3545).
- (11). Koenig MK, Bell CS, Hebert AA, Roberson J, Samuels JA, Slopis JM, et al. Efficacy and safety of topical rapamycin in patients with facial angiofibromas secondary to tuberous sclerosis complex: the treatment randomized clinical trial. *JAMA Dermatol*. 2018 Jul 1;154(7):773–80. doi: [10.1001/jamadermatol.2018.0464](https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2018.0464).
- (12). Chen PL, Hong JB, Shen LJ, Chen YT, Wang SJ, Liao YH. The efficacy and safety of topical rapamycin-calcitriol for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex: a prospective, double-blind, randomized clinical trial. *Br J Dermatol*. 2020 Oct;183(4):655–63. doi: [10.1111/bjd.18949](https://doi.org/10.1111/bjd.18949).
- (13). Aitken P, Stanescu I, Boddington L, Mahon C, Fogarasi A, Liao Y, et al. A novel rapamycin cream formulation improves facial angiofibromas associated with tuberous sclerosis complex: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Br J Dermatol*. 2023 Oct 25;189(5):520–30. doi: [10.1093/bjd/ljad243](https://doi.org/10.1093/bjd/ljad243).
- (14). Cortell C, Martinez MA, Molina C, Cercos AC, Climente M, Merino V. Physical, chemical, and microbiological stability of sirolimus 0.4% in topical formulations. Abstract Book 24th EAHP Congress Barcelona, Spain; 2019. p. A50. *EJHP*. 2019;26(Suppl 1):A1–311.
- (15). Bougeon G, Lagarce F, Martin L, Pailhories H, Bastiat G, Vignaud S. Formulation and characterization of a 0.1% rapamycin cream for the treatment of tuberous sclerosis complex-related angiofibromas. *Int J Pharm*. 2016 Jul 25;509(1–2):279–84 S03785173(16)30454-9.
- (16). Patel VB, Misra A, Marfatia YS. Topical liposomal gel of tretinoin for the treatment of acne: research and clinical implications. *Pharm Dev Technol*. 2000;5(4):455–64. doi: [10.1081/pdt-100102029](https://doi.org/10.1081/pdt-100102029).
- (17). Yoon HY, Chang IH, Goo YT, Kim CH, Kang TH, Kim S, et al. Intravesical delivery of rapamycin via folate-modified liposomes dispersed in thermo-reversible hydrogel. *Int J Nanomedicine*. 2019 Aug 5;14:6249–68. doi: [10.2147/IJN.S216432](https://doi.org/10.2147/IJN.S216432).
- (18). Cortell-Fuster C, Martínez-Gómez MA, Cercós-Lletí AC, Climente-Martí M. Optimization, formulation, and stability of topical rapamycin used for rare tuberous sclerosis disease: from ointment to liposomes. *J Pharmaceut Innov*. 2023 doi: [10.1007/s12247-023-09792-9](https://doi.org/10.1007/s12247-023-09792-9).
- (19). Cortell C, Martínez MA, Cercós AC, Climente M. Topical rapamycin in rare tuberous sclerosis disease: liposomal formulation stability. Abstract Book 27th EAHP Congress Lisbon, Portugal; 2023. p. 182. *Eur J Hosp Pharm*. 2023;30(Suppl 1):A1–239.

- (20). Salido-Vallejo R, Ruano J, Garnacho-Saucedo G, Godoy-Gijon E, Llorca D, Gomez-Fernandez C, et al. Facial Angiofibroma Severity Index (FA SI): reliability assessment of a new tool developed to measure severity and responsiveness to therapy in tuberous sclerosis-associated facial angiofibroma. Clin Exp Dermatol. 2014 Dec;39(8):888–93. doi: [10.1111/ced.12398](https://doi.org/10.1111/ced.12398).
- (21). Salido-Vallejo R, Garnacho-Saucedo G, Moreno-Gimenez JC. Current options for the treatment of facial angiofibromas. Actas Dermosifiliogr. 2014;105(6):558–68. doi: [10.1016/j.ad.2012.11.020](https://doi.org/10.1016/j.ad.2012.11.020).
- (22). Onyesom I, Lamprou DA, Sygellou L, Owusu-Ware SK, Antonijevic M, Chowdhry BZ, et al. Sirolimus encapsulated liposomes for cancer therapy: physicochemical and mechanical characterization of sirolimus distribution within liposome bilayers. Mol Pharm. 2013 Nov 4;10(11):4281–93. doi: [10.1021/mp400362v](https://doi.org/10.1021/mp400362v).
- (23). Rouf MA, Vural I, Renoir JM, Hincal AA. Development and characterization of liposomal formulations for rapamycin delivery and investigation of their antiproliferative effect on MCF7 cells. J Liposome Res. 2009;19(4):322–31. doi: [10.3109/08982100902963043](https://doi.org/10.3109/08982100902963043).