

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000031637
Data Deposito	17/12/2021
Data Pubblicazione	17/06/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	9	16

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	167

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	11	14

Titolo

POLVERI PER INALAZIONE E PROCEDIMENTO DI PRODUZIONE
--

11925M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

FM/mc **“POLVERI PER INALAZIONE E PROCEDIMENTO DI PRODUZIONE”**

a nome : **1. UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA (50%);**
2. UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE (25%);
3. AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA CAREGGI (25%)

con sede in: 1. Via Università, 12 - 43121 Parma;
2. Piazza San Marco, 4 - 50121 Firenze;
3. Largo Giovanni Alessandro Brambilla, 3 - 50134 Firenze

* * *

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda una combinazione di un farmaco anestetico locale (LANE) con un polimero biocompatibile idrofilo da somministrare come formulazione di polvere secca per inalazione attraverso un inalatore di polvere secca (DPI) per il trattamento della tosse cronica e la prevenzione della tosse indotta da trattamenti farmacologici, nonché per il trattamento della tosse acuta, ad es. in corso di infezioni virali delle vie aeree o nella tosse post-infettiva. L'invenzione è anche diretta a un processo per la sua preparazione.

STATO DELL'ARTE

La terapia inalatoria è uno degli approcci più antichi, ma anche più efficaci, alla terapia delle malattie delle vie respiratorie. Oggi è ben noto che il mezzo più efficace e sicuro per trattare i polmoni è somministrare farmaci direttamente alle vie aeree dando luogo così ad una bassa esposizione sistemica e una rapida insorgenza d'azione farmacologica.

La tosse è un importante meccanismo di difesa dell'apparato respiratorio, ed è il segno di più frequente osservazione in corso di malattie che interessano questo distretto

dell'organismo. Si parla di tosse acuta quando il disturbo dura meno di 4 settimane e di tosse cronica quando il disturbo persiste oltre le otto settimane (*Morice AH et al., Eur Respir J 2020 55: 1901136*).

La tosse cronica colpisce circa il 10% della popolazione adulta generale e costituisce un importante problema di salute a causa dell'impatto negativo sulla qualità della vita delle persone affette e per le possibili complicanze. In circa il 25% dei casi, la tosse cronica viene definita "inspiegabile" perché rimane senza spiegazione nonostante il paziente sia stato sottoposto a numerose indagini diagnostiche o "refrattaria" perché insensibile a vari trattamenti. Tale tipo di tosse che noi preferiamo chiamare "idiopatica" rappresenta una difficile sfida sul piano clinico (*Song, W.-J et al., Allergy Asthma Immunol Res 2016, 8 (2), 146-10*). Ad oggi non esiste alcun prodotto per inalazione autorizzato per questa indicazione. Tuttavia, è ben noto che gli anestetici locali (di seguito citati come LANE) potrebbero agire come farmaci antitosse periferici che bloccano i canali del sodio neuronali, riducendo l'eccitabilità, e quindi il riflesso della tosse (*Karlsson JA Bull Eur Physiopathol Respir. 1987;23 Suppl 10:29s-36s; Dicipinigaitis PV et al. Pharmacol Rev 2014; 66:468-512*).

L'uso *off label* di LANE per il trattamento locale mediante nebulizzazione di soluzioni rappresenta una prassi clinica non rara. Uno studio retrospettivo su adulti che hanno ricevuto una prescrizione e un'istruzione infermieristica per la somministrazione di soluzione di lidocaina nebulizzata per la tosse cronica tra il 2002 e il 2007 (*Lim, K. G. et al., Chest 2013, 143 (4), 1060-1065*) ha dimostrato che gli adulti tollerano l'auto-somministrazione di lidocaina nebulizzata per la tosse cronica difficile da controllare. Non si sono osservati effetti avversi gravi, tuttavia la maggior parte dei pazienti non ha gradito il trattamento per gli effetti negativi legati alla somministrazione per nebulizzazione come sapore sgradevole, irritazione alla gola o alla bocca, perdita della funzione sensoriale.

Recentemente uno studio clinico ha confrontato l'efficacia della somministrazione di lidocaina nel ridurre gli effetti correlati alla tosse cronica refrattaria, mostrando la maggiore efficacia di formulazioni spray in confronto alla nebulizzazione (*Rayid Abdulqawi et al., The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2021 in press*).

Oltre a questi problemi, il deposito di un LANE in forma liquida (es. goccioline nebulizzate) può comportare il rischio di deposizione del farmaco nella porzione profonda dei polmoni con conseguente assorbimento dello stesso e distribuzione sistemica. Ciò può dare origine a eccitazione del SNC seguita da depressione che rappresentano le manifestazioni più comuni di tossicità da anestetici locali (*Covino, B. G. et al., J. Dent. Res. 1981, 60 (8), 1454-1459*).

Ad oggi non sono descritte formulazioni particellari solide costituite da una combinazione di LANE e polimero adatto alla deposizione nella parte conduttiva dell'albero respiratorio.

Una formulazione di lidocaina inalabile priva di eccipienti è descritta per il trattamento dell'asma e per ridurre la necessità di corticosteroidi nei pazienti asmatici (WO 2006/6181). In questo caso la formulazione è costituita da farmaco senza alcun processo produttivo specifico. Lo stesso assegnatario ha rivendicato una formulazione pura di benzilfosfato o un profarmaco benzilfosfato di un corticosteroide, lidocaina o una composizione anestetica locale correlata per la somministrazione mediante aerosol per inibire l'infiammazione nei polmoni in pazienti asmatici (WO 2005/063777). Allo stesso modo, è stato descritto un profarmaco N-ossido di un anestetico locale per l'infiammazione associata a bronchite e BPCO (WO 2005/044233).

Sono reperibili altre due applicazioni di un anestetico locale inalabile: una come prodotto anti-emicrania in forma di aerosol liquido (US 20040184999) mentre l'altra è una

formulazione in forma di inalatore pressurizzato predosato (US 19975679325).

Pertanto, esiste ancora una significativa necessità di una terapia LANE più efficace e più sicura per il trattamento della tosse, in particolare della tosse cronica.

Nell'ambito della terapia inalatoria, possibili alternative alla nebulizzazione sono state studiate negli anni più recenti e i DPI sono stati proposti come una strategia promettente vista la possibilità di somministrare facilmente una quantità sufficiente di polvere micronizzata contenente la dose terapeutica. Un DPI comprende una formulazione che viene aerosolizzata attraverso un dispositivo inalatore passivo attivato dall'atto di inalazione del paziente. I DPI hanno la capacità di disperdere una quantità elevata di farmaco in un unico e rapido atto di inalazione (20 mg in pochi secondi); qualora sia richiesta una quantità maggiore la dose può essere inalata per inalazioni consecutive (*Buttini, F et al., Int J Pharm 2018, 548 (1), 182-191*).

In generale, lo sviluppo di polveri per inalazione comporta il superamento di un paradosso ben noto: poiché il principio attivo (API) deve avere una dimensione particellare molto ridotta per raggiungere i polmoni ma allo stesso tempo deve mostrare proprietà tecnologiche favorevoli (scorrevolezza, impaccamento, ri-dispersione) per permettere il rilascio della corretta dose e aerosol del farmaco aerosolizzato. Questa considerazione acquista maggiore importanza quando la dose di API è elevata. Le proprietà tecnologiche di una polvere costituita da solo API sono generalmente scarse e inadatte alla somministrazione inalatoria. Infatti, particelle di dimensioni adatte alla somministrazione inalatoria sono generalmente ottenute sottoponendo l'API ad un processo di micronizzazione, solitamente in mulini a getto fluido. Questi processi comportano un aumento del contenuto energetico delle particelle e della loro reattività, e inducono la creazione di superfici altamente coesive. Tutti questi aspetti risultano essere estremamente sfavorevoli per la somministrazione inalatoria. Nel caso in cui l'API sia un LANE, in

particolar modo un LANE a media durata d'azione, come ad esempio la lidocaina, il basso punto di fusione si presenta come un ulteriore aspetto che induce problematicità e di instabilità durante i processi di fabbricazione (primo fra tutti la micronizzazione) che, spesso, comportano un aumento della temperatura del materiale trattato.

Contrariamente a quanto accade per i farmaci somministrati al polmone che hanno come sito di azione la regione bronco alveolare, nel caso specifico della tosse, ed in particolare della tosse cronica e refrattaria, la somministrazione di LANE deve massimizzare la deposizione a livello della porzione conduttiva dell'albero respiratorio dove si manifesta la maggiore eccitabilità e dalla quale parte il riflesso della tosse. Dal punto di vista delle tecnologie di delivery, la deposizione nella porzione conduttiva, vale a dire della generazione 0-15 secondo il modello di Weibel (*Weibel ER. 1963. Morphometry of the human lung. Berlin: SpringerVerlag*) comporta la soluzione di una problematica sostanzialmente diversa e nuova rispetto a quelle relative alla somministrazione di farmaci che devono essere depositati a livello bronco-alveolare. Infatti, la regione conduttiva presenta un minor numero di ramificazioni che inducano una modifica del flusso con conseguente perdita di momento delle particelle ed è rivestita di un epitelio ciliato fisiologicamente deputato alla cattura e all'allontanamento delle particelle trasportate dal flusso inspiratorio. Ciò si traduce in una ridotta possibilità di deposizione particellare nel sito d'azione mediante formulazioni progettate per essere depositate nelle parti più profonde del polmone, come le miscele adesive (*De Boer, AHD et al., Expert opinion on drug delivery 14, 499-512*).

In generale è possibile sviluppare strategie di ingegnerizzazione delle particelle per controllare la forma fisica e controllare le dimensioni e la morfologia al fine di ottimizzare le prestazioni di DPI rispetto alla massimizzazione della frazione depositabile nella parte più profonda del polmone e al miglioramento delle proprietà di flusso (*Buttini, F et al.,*

J Control Release 2012, 161 (2), 693–702). Nel caso della somministrazione di farmaci che devono agire a livello della porzione conduttiva dell'albero respiratorio, tuttavia, per i motivi sopra esposti, il problema della deposizione nel sito d'azione di una polvere inalabile non può essere interamente risolto con la semplice ottimizzazione della dimensione delle particelle.

Risulta comunque indubbio che sarebbe altamente vantaggioso poter disporre di prodotti medicinali a base di LANE adatti alla somministrazione per inalazione, in grado di permettere una rapida e agevole somministrazione del farmaco dando luogo, nel contempo ad un'elevata deposizione di LANE sul sito target. Da questo punto di vista, è necessaria una formulazione in grado di favorire la deposizione del medicamento nell'area dell'apparato respiratorio in cui sono localizzati i recettori della tosse. I recettori della tosse o recettori irritanti che si adattano rapidamente si trovano principalmente sulla parete posteriore della trachea, della faringe e sulla carena della trachea, il punto in cui la trachea si dirama nei bronchi principali. I recettori sono meno abbondanti nelle vie aeree distali e assenti oltre i bronchioli respiratori. Pertanto, la dimensione aerodinamica più adatta per le particelle per indirizzare il medicamento in quest'area è compresa tra 6 e 12 micron.

Le problematiche sopra descritte vengono risolte dalla combinazione della presente invenzione e dal suo utilizzo.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

In un primo aspetto, l'invenzione ha per oggetto composizioni farmaceutiche in forma di polvere secca per inalazione comprendenti un anestetico locale e un polimero biocompatibile idrofilo.

Vantaggiosamente detta polvere è in forma di micro-particelle secche ottenute per essiccamento a spruzzo da somministrare per inalazione attraverso un inalatore di polvere secca (DPI). Dopo aerosolizzazione per mezzo di un dispositivo di inalazione, dette

micro-particelle hanno tipicamente un diametro aerodinamico mediano di massa compreso tra 4,0 e 6,0 micron e sono caratterizzate dall'avere una frazione di particelle fini non superiore al 35% in massa.

L'invenzione riguarda anche un processo per la preparazione delle micro-particelle e che comprende le seguenti fasi:

i) selezione di un polimero biocompatibile idrofilo solubile ad una concentrazione adeguata in un solvente adatto;

ii) selezione di un farmaco LANE e sua dissoluzione in acqua ad una concentrazione adeguata;

iii) aggiunta della soluzione fase ii) alla soluzione della fase i) mantenendo la soluzione risultante sotto agitazione;

iv) essiccamento a spruzzo della soluzione della fase iii), utilizzando un idoneo apparecchio di essiccamento a spruzzo;

v) raccolta della polvere ottenuta sotto forma di particelle; e

vi) opzionalmente micronizzazione di dette particelle.

In una forma di realizzazione preferita, utilizzando un ugello dell'essiccatore a spruzzo avente diametro compreso tra 0,7 mm e 3 mm, si ottengono particelle con il diametro adatto per l'uso secondo l'invenzione.

L'invenzione riguarda inoltre un inalatore di polvere secca riempito con la suddetta formulazione farmaceutica in polvere secca e un kit comprendente dette composizioni di polvere secca e un inalatore di polvere secca.

L'invenzione ha anche per oggetto dette composizioni per uso come medicamento, in particolare per il trattamento della tosse.

DEFINIZIONI

Nella presente invenzione:

- Il termine “LANE” si intende riferirsi a sostanze terapeutiche, appartenenti alla classe degli anestetici locali che hanno vantaggiosamente una solubilità in acqua di almeno 0,5% p / v secondo la definizione e le procedure di determinazione delle stesse riportate nella Farmacopee Americane, Europea e Britannica.

- Gli anestetici locali sono farmaci che possono essere classificati in base alla loro intrinseca potenza anestetica e alla durata dell'attività, secondo la letteratura. Ad esempio, la procaina e la cloroprocaina sono farmaci di potenza relativamente bassa e a breve durata d'azione. La lidocaina, la mepivacaina e la prilocaina rappresentano agenti di potenza e durata d'azione intermedia. La tetracaina, la bupivacaina e l'etidocaina sono agenti altamente potenti e ad azione prolungata.

- La tosse è un meccanismo fisiologico di difesa dell'apparato respiratorio finalizzato a mantenere libere le vie aeree da secrezioni in eccesso e materiale estraneo accidentalmente inalato. Può essere sia volontaria che involontaria. Nella letteratura medica esistono varie linee guida per la categorizzazione della tosse (*Irwin RS e Madison JM. New England Journal of Medicine 2000, 343 (23, 1715-1721; Morice AH, et al Eur Respir J 2020 55: 1901136; DOI: 10.1183/13993003.01136-2019*). La tosse inferiore a 4 settimane è generalmente considerata "acuta" e le infezioni virali del tratto respiratorio superiore sono la causa più comune di tosse acuta. La tosse di durata compresa tra tre e otto settimane è classificata come subacuta e la tosse che supera le otto settimane è definita come cronica.

- Per peso molecolare del polimero si intende il peso molecolare medio in massa (M_w).

- Il termine polimero mucoadesivo definisce un polimero idrofilo in grado di interagire con lo strato di muco che ricopre l'epitelio respiratorio attraverso legami deboli e reversibili (*S. Roy, et al. (2009) Polymers in Mucoadhesive Drug-Delivery Systems:*

A Brief Note, Designed Monomers and Polymers, 12:6, 483-495).

- Il termine "micronizzato" si riferisce a una polvere che presenti il 90% della distribuzione della dimensione particella inferiore a 10 μm micron.

- Il termine "grossolano" si riferisce a una sostanza avente una dimensione di qualche centinaio di micron.

- In termini generali, la dimensione delle particelle viene quantificata misurando un diametro della sfera equivalente caratteristico, noto come diametro volume, mediante diffrazione di luce laser.

- La dimensione delle particelle può essere quantificata anche misurando il diametro della massa mediante un idoneo strumento come, ad esempio, l'analizzatore a setaccio.

- Il diametro del volume (VD) è correlato al diametro in massa (MD) mediante la densità delle particelle (assumendo una densità indipendente dalla dimensione per le particelle).

- Nella presente descrizione, la dimensione delle particelle dei principi attivi e della frazione di particelle fini è espressa in termini di diametro volume, mentre quella delle particelle grossolane è espressa in termini di diametro di massa.

- Le particelle hanno una distribuzione normale o log-normale definita in termini di volume o diametro mediano di massa (VMD o MMD rispettivamente) che corrisponde al volume o diametro di massa del 50 percento in volume o in massa delle particelle e, facoltativamente, in termini di volume o diametro di massa rispettivamente del 10% e del 90% delle particelle.

- Un altro approccio comune per definire la distribuzione granulometrica consiste nell'utilizzare tre valori: i) il diametro mediano $d(0,5)$ che è il diametro che divide la distribuzione in due parti uguali; ii) $d(0,9)$ e iii) $d(0,1)$, corrispondenti rispettivamente al

90 ° e al 10 ° percentile della distribuzione.

- In termini generali, particelle aventi lo stesso o simile VMD o MMD possono avere una diversa distribuzione granulometrica, ed in particolare una diversa larghezza della distribuzione rappresentata dai valori $d(0.1)$ e $d(0.9)$.

- Al momento dell'aerosolizzazione, la dimensione delle particelle è espressa come diametro aerodinamico di massa (MAD), mentre la distribuzione delle dimensioni delle particelle è espressa in termini di diametro aerodinamico mediano di massa (MMAD) e Deviazione standard geometrica (GSD). Il MAD dipende dalla capacità delle particelle di essere trasportate sospese in un flusso d'aria. L'MMAD corrisponde al diametro aerodinamico di massa del 50 per cento in peso delle particelle.

L'espressione "frazione respirabile" si riferisce alla percentuale di particelle attive che raggiungerebbero i polmoni in un paziente, vale a dire la massa di particelle aventi un diametro aerodinamico inferiore a 5 μm .

- MMAD, GSD e frazione respirabile vengono valutate utilizzando un idoneo apparato impattatore come Andersen Cascade Impactor (ACI), Multi Stage Liquid Impinger (MLSI) o Next Generation Impactor (NGI), secondo procedure riportate nelle comuni Farmacopee, in particolare nella Farmacopea Europea 10^a Edizione.

- La frazione respirabile è calcolata dal rapporto percentuale tra la massa di particelle fini (altrimenti denominata dose di particelle fini) e la dose erogata che rappresenta la massa di ingrediente attivo emessa dal dispositivo all'attivazione.

- La dose erogata, intesa come la quantità di dose misurata emessa dall'inalatore a seguito di un atto di inalazione, viene calcolata dalla deposizione cumulativa nell'apparato impattatore, mentre la massa di particelle fini viene calcolata dalla deposizione di particelle di diametro aerodinamico < 5,0 micron.

- Anche la dose erogata viene valutata utilizzando un apparato di campionamento

della dose unitaria (DUSA) secondo procedure riportate nelle comuni Farmacopee, in particolare nella Farmacopea Europea 10^a Edizione.

- Per Dose Misurata (MD), si intende la massa di polvere caricata nell'inalatore e destinata a ad essere rilasciata (in tutto o in parte) per effetto dell'attivazione del dispositivo.

- La "Frazione emessa" (EF) è il rapporto tra la dose emessa e la dose misurata.

- La frazione di particelle non respirabili è calcolata dal rapporto percentuale tra la massa di particelle non respirabili (vale a dire con diametro aerodinamico $> 5 \mu\text{m}$) e la dose erogata.

- La massa delle particelle non respirabili (NR-PD) è definita come la quantità di farmaco con diametro aerodinamico superiore a $5 \mu\text{m}$, ottenuta come differenza tra la dose emessa e la massa delle particelle fini, ed espressa in mg.

- "Trattamento" della tosse della tosse significa ridurre la frequenza degli eventi di tosse e/o ridurre la gravità degli eventi di tosse (rispetto alla condizione non trattata). Questi termini si riferiscono sia al trattamento preventivo che al trattamento degli episodi di tosse in atto.

- Una "quantità terapeuticamente efficace" di una sostanza si riferisce a una quantità che porta a una riduzione clinicamente significativa della frequenza o della gravità degli eventi di tosse.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

L'invenzione è diretta ad una combinazione di un farmaco anestetico locale (LANE) con un polimero biocompatibile idrofilo (HBP), LANE e HBP essendo presenti in un prefissato rapporto.

Vantaggiosamente il LANE può essere qualunque principio attivo appartenente alla classe farmacologica degli anestetici locali. Più vantaggiosamente, il LANE ha una

solubilità in acqua in condizioni standard (15-25 °C, 1 atm) di almeno lo 0,05% p/v.

Ad esempio, i farmaci LANE possono essere scelti tra LANE a breve, intermedia e lunga durata d'azione come procaina, cloroprocaina, lidocaina, prilocaina, mepivacaina, bupivacaina, etidocaina, ropivacaina e tetracaina o loro sali e/o solvati. Qualora uno di questi composti possieda centri chirali, essi possono essere usati in forma otticamente pura, o possono essere presentati come miscele diastereoisomeriche o miscele racemiche.

Vantaggiosamente, il LANE può essere utilizzato in forma di base libera o sale farmaceuticamente accettabile come cloridrato e bromidrato. In una forma di realizzazione preferita, LANE è la lidocaina sotto forma di sale cloridrato.

Vantaggiosamente, il polimero biocompatibile idrofilo (HBP) può essere selezionato dal gruppo costituito da sostanze sicure e farmaceuticamente accettabili come sali dell'acido ialuronico, preferibilmente il sale di sodio (HA), derivati della cellulosa solubili in acqua, glicoli polietilenici, polivinil pirrolidoni e polivinil alcoli o qualsiasi loro miscela.

Preferibilmente, il polimero biocompatibile idrofilo è ialuronato di sodio (HA) di peso molecolare compreso tra 15 e 1500 kDa, preferibilmente tra 15 e 200 kDa, più preferibilmente tra 20 e 140 kDa e ancora più preferibilmente tra 20 e 100 kDa.

Più vantaggiosamente, il LANE è presente in una percentuale in peso della combinazione compresa tra 1 e 90%, preferibilmente tra 10 e 50% in peso della combinazione. Preferibilmente, la percentuale in peso di HA varia dall'90 al 50% p/p, più preferibilmente dall'80 al 70% p/p.

Vantaggiosamente la combinazione dell'invenzione è in forma di micro-particelle caratterizzate da una dimensione delle particelle definita.

Espressa come diametro del volume, la distribuzione granulometrica delle micro-particelle deve soddisfare i seguenti parametri: d(0.1) compreso tra 2,0 e 5,0 micron,

d(0.5) compreso tra 5,0 e 9,0 micron e d(0.9) compreso tra 11 e 18 micron.

Quando si esprime come diametro aerodinamico, il valore mediano di massa è compreso tra 4,0 e 6,0 micron.

Quando aerosolizzate mediante un comune DPI le micro-particelle mostrano un FPF (<5 micron) compresa in un intervallo 35-30%, preferibilmente nell'intervallo del 25-20%, più preferibilmente nell'intervallo del 15-20%.

I vantaggi delle composizioni in polvere secca dell'invenzione derivano dall'ottenimento di micro-particelle ingegnerizzate comprendenti un LANE in combinazione con un polimero biocompatibile idrofilo, idoneo per inalazione, e in grado di soddisfare i requisiti derivanti dalle particolari difficoltà specificatamente legate alla deposizione del medicamento nel tratto conduttivo dell'albero respiratorio.

La polvere dell'invenzione è costituita da particelle scorrevoli di LANE in grado di essere efficacemente rilasciate da un dispositivo inalatore e depositate sullo strato di mucosa che ricopre l'epitelio ciliato delle vie aeree conduttive grazie ad una dimensione definita compresa fra 2 e 18 micron e preferibilmente fra 5 e 14 micron e ancor più preferibilmente fra 5 e 12 micron.

La presenza nelle particelle di un polimero biocompatibile idrofilo mucoadesivo favorisce la loro adesione all'epitelio umido e un rilascio del LANE localizzato e prolungato nel tempo.

Le micro-particelle dell'invenzione sono stabili sia dal punto di vista chimico che fisico.

Le composizioni dell'invenzione presentano una omogenea distribuzione del principio attivo nella polvere e la possibilità di essere erogate ad alte dosi: il dosaggio massimo somministrabile tramite uno o più atti inspiratori da parte del paziente è 100 mg, preferibilmente di 80 mg a ancor più preferibilmente di 40 mg di polvere.

Sebbene non strettamente necessario, le formulazioni in polvere secondo l'invenzione possono comprendere inoltre particelle grossolane e/o fini di un eccipiente inerte farmaceuticamente accettabile come lattosio, preferibilmente alfa-lattosio monoidrato, trealosio, mannitolo, raffinosio.

La presente invenzione consente la preparazione di una polvere di particelle di HA efficacemente aerosolizzabili mediante l'aggiunta di un LANE. Secondo l'invenzione la dose di polvere emessa dall'inalatore è $> 70\%$ in peso della dose caricata e preferibilmente $> 85\%$ in peso della dose caricata.

La composizione dell'invenzione può essere caricata in capsule rigide, blister o inalatore a serbatoio senza l'aggiunta di alcun eccipiente di scorrimento o diluente.

Le micro-particelle dell'invenzione sono costituite da una matrice di un HPB in cui le molecole di LANE vengono intrappolate dando origine ad una struttura amorfa, cineticamente stabile per un tempo farmaceuticamente accettabile, semicristallina o cristallina stabile. Pertanto, le composizioni dell'invenzione possono essere aerosolizzate e inalate utilizzando un inalatore di polvere secca.

La dimensione delle particelle consente la loro deposizione sull'area dell'albero respiratorio (laringe, trachea, grossi bronchi) dove sono maggiormente concentrati i recettori per lo stimolo della tosse; questa caratteristica permette di massimizzare l'effetto terapeutico, riducendo al minimo l'assorbimento sistemico e gli effetti collaterali ad esso correlati.

Inoltre, le micro-particelle HBP-LANE dell'invenzione liberano il principio attivo in modo progressivo in un prolungato periodo di tempo.

La presente invenzione riguarda anche un processo di preparazione di dette micro-particelle ingegnerizzate agendo sulla scelta del tipo di polimero, del suo peso molecolare e sul rapporto polimero: farmaco.

In particolare, il processo dell'invenzione è effettuato mediante essiccamento a spruzzo.

Tipicamente l'essiccamento a spruzzo viene eseguito nebulizzando una soluzione contenente i soluti da essicare in una camera di essiccamento preriscaldata nella quale le piccole goccioline della soluzione sono sottoposte a un flusso di gas caldo a temperatura controllata e convertite in particelle di polvere. La polvere così generata passa, quindi, attraverso un separatore polvere/gas, ad esempio un ciclone nella quale perde energia cinetica in modo da poter essere raccolta in un apposito recipiente.

I parametri regolabili per ottenere una polvere con caratteristiche ben definite sono:
i) il tipo di nebulizzatore; ii) la temperatura del gas di ingresso utilizzato per essicare il materiale spruzzato nella camera di essiccamento (di seguito denominata temperatura di ingresso); iii) la portata del gas e iv) la portata della soluzione di alimentazione (di seguito la portata di alimentazione).

Detto processo di essiccamento a spruzzo comprende le seguenti fasi:

i) selezionare un idoneo polimero idrofilo biocompatibile (HBP) e scioglierlo in un opportuno solvente ad una opportuna concentrazione;

ii) selezionare un farmaco LANE e scioglierlo in acqua ad una concentrazione adeguata;

iii) aggiungere la soluzione della fase ii) alla soluzione della fase i) e mantenere sotto agitazione la soluzione risultante;

iv) essicare a spruzzo la soluzione della fase iii), utilizzando un idoneo apparecchio di essiccamento a spruzzo;

v) raccogliere la polvere ottenuta sotto forma di particelle; e

vi) opzionalmente micronizzare dette particelle.

Vantaggiosamente, nella fase i) il solvente è acqua o una soluzione idroalcolica

contenente etanolo come co-solvente in una concentrazione compresa tra 0,1 e 99,9% v/v.

Preferibilmente la fase i) viene eseguita in acqua a temperatura ambiente e sotto agitazione in cui la concentrazione di HBP è compresa tra 1 e 6% p/v.

Vantaggiosamente, anche nella fase ii) il solvente è acqua o una soluzione idroalcolica contenente etanolo come co-solvente in una concentrazione compresa tra 0,1 e 99,9% v/v.

Il tipo di HPB nella fase i) e il suo peso molecolare devono essere scelti dall'esperto del ramo in base alla specifica composizione qualitativa, al tipo di farmaco e al contenuto del farmaco. In una forma di realizzazione preferita dell'invenzione HA è scelto come polimero.

Preferibilmente, la fase ii) viene eseguita a temperatura ambiente e sotto agitazione in cui la concentrazione del farmaco LANE è compresa tra 0,6 1 10% e preferibilmente tra 1 e 6% p/v.

La soluzione del passaggio iii) deve avere una concentrazione di soluti compresa fra 0,5 e 6% p/v e preferibilmente compresa tra 3-5% p/v.

La concentrazione della LANE come base libera nella soluzione ottenuta dalla fase iii) è compresa fra 10 e 50% e preferibilmente tra 20 e 40% sul peso del soluto.

Vantaggiosamente, la soluzione risultante della fase iii) viene mantenuta sotto agitazione ad almeno 50 rpm per 10 minuti.

La fase i) e la fase ii) possono essere unificate e la soluzione può essere preparata unendo tutti i componenti delle due fasi e riscaldando il loro contenuto a una temperatura compresa tra 25 e 50°C, preferibilmente tra 30 e 44°C e preferibilmente tra 37e 42°C.

Nella fase iv), la soluzione HPB-LANE viene quindi essiccata a spruzzo con opportuni parametri, come ad esempio:

- temperatura di ingresso, preferibilmente tra 110°C e 160°C, preferibilmente tra

115°C e 150°C e ancor più preferibilmente tra 120°C e 140°C;

- portata della soluzione di alimentazione tra 1,0 e 10,0 mL/min, preferibilmente tra 1,5 e 5 mL/min e ancor più preferibilmente fra 2 e 4 mL/min;

- concentrazione di soluto della soluzione tra 1 e 7% p/v, preferibilmente fra 2 e 6% p/v e ancor più preferibilmente fra 3 e 5% p/v;

- portata del gas di nebulizzazione tra 135 e 820 L/ora, preferibilmente fra 300 L/ora e 750 L/ora e ancor più preferibilmente fra 473 e 670 L/ora;

- portata del gas di essiccamento tra 20 e 40 m³/ora preferibilmente fra 30 e 38 m³/ora e ancor più preferibilmente fra 33 e 35 m³/ora.

Nella fase v) le particelle possono essere raccolte secondo metodi noti.

Nella fase vi) le particelle raccolte possono essere opzionalmente micronizzate secondo metodi noti. Tuttavia, secondo l'invenzione, le micro-particelle della dimensione desiderate possono essere ottenute senza ulteriore micronizzazione utilizzando un ugello dell'essiccatore a spruzzo avente un diametro compreso tra 0,7 mm e 3,0 mm, preferibilmente tra 1,0 mm e 2,5 mm e più preferibilmente tra 1,4 mm e 2,0 mm.

La soluzione della fase iii) è preparata aggiungendo la soluzione di LANE a quella di HBP, tuttavia, l'esperto del ramo può scegliere metodologie e condizioni di preparazione differenti in base alle proprie conoscenze.

Nella fase iii, in particolare nel caso di polveri di lidocaina e 50-90% in peso di HA, si è trovato che il peso molecolare di HA preferito di HA è nell'intervallo di 20-100 kDa che garantisce la formazione di micro-particelle di struttura totalmente amorfa che viene mantenuta per un tempo farmaceuticamente accettabile. Per pesi molecolari di HA superiori, dell'ordine di 750-1000 kDa, le micro-particelle ottenute possono mostrare una struttura parzialmente cristallina osservata, ad esempio, mediante microscopia a luce polarizzata, attribuibile alla non completa dispersione molecolare della lidocaina fra le

catene polimeriche di HA.

La distribuzione delle dimensioni delle particelle della polvere è significativamente influenzata dal diametro dell'ugello impiegato per il processo di essiccamento a spruzzo. Utilizzando un diametro di 1,4 mm, $d(v, 10)$ era di 2,4-2,8 micron ed $(v, 90)$ di 11,0-14,0 micron. Queste popolazioni di particelle avevano un MMAD di 3,8-4,1 micron e un FPF del 34% che indicava una percentuale di particelle di (66%) nell'intervallo 5-14 micron. Quando è stato utilizzato un diametro maggiore di 2,0 mm, le micro-particelle hanno mostrato un MMAD di 5,7-6,0 micron e un FPF del 14% indicando un'alta percentuale di particelle (86%) nell'intervallo 5-17 micron. Questa osservazione è confermata dall'analisi di diffrazione laser che rivela un $d(v, 10)$ di 3,3-4,6 micron ed $(v, 90)$ di 14,2-17,0 micron.

Questa caratteristica peculiare fa sì che la polvere si depositi in particolare sulle zone dell'albero respiratorio (laringe trachea, grossi bronchi) dove sono maggiormente localizzati i recettori della tosse, minimizzando il deposito nel cavo orale responsabile di spiacevoli e/o gravi effetti collaterali come la perdita di sensibilità o addirittura il soffocamento all'assunzione di cibi e bevanda.

Un ulteriore vantaggio dell'invenzione è rappresentato dal fatto che il polimero, ad esempio HA, funge da elemento di controllo del rilascio del LANE, prolungandone la liberazione nel sito di azione per diverse ore a fronte di una dissoluzione del LANE come tale che invece avviene solitamente in pochi minuti. Questo aspetto è favorevole per ottenere una prolungata soppressione della tosse.

Infine, la capacità mucoadesiva dell'HPB favorisce l'adesione delle particelle alla mucosa che riveste l'epitelio del tratto conduttivo dell'albero respiratorio evitando che le particelle scivolino nelle basse vie respiratorie dove l'assorbimento sistemico è maggiore.

La quantità terapeutica della combinazione può variare entro ampi limiti a seconda della natura della sostanza attiva, del tipo e della gravità della condizione da trattare e della

condizione del paziente che necessita di trattamento.

In particolare, le sostanze attive vengono aggiunte alle composizioni dell'invenzione seguendo attentamente la preparazione della soluzione e il procedimento di essiccamento.

Un'ottima uniformità di distribuzione del principio attivo si ottiene quando detto ingrediente attivo ha un contenuto di farmaco entro il 5% rispetto al valore teorico. La determinazione dell'uniformità del contenuto deve essere effettuata dagli esperti utilizzando un metodo analitico convalidato.

La composizione dell'invenzione può essere utilizzata con qualsiasi inalatore di polvere secca: i) inalatori monodose (dose unitaria), per la somministrazione di dosi singole suddivise del composto attivo; ii) inalatori multidose pre-dosati o inalatori reservoir precaricati con quantità di principi attivi sufficienti per cicli di trattamento più lunghi.

La composizione dell'invenzione può essere somministrata a un paziente a una frequenza fissa come prescritto da un medico, per esempio in dosi singole o multiple, tipicamente una, due o più volte al giorno. In alternativa, le composizioni dell'invenzione possono essere somministrate da un *caregiver* o autosomministrate dal paziente secondo necessità.

La quantità di polvere secca composta da inalare dipende dalla concentrazione del principio attivo nella polvere essiccata a spruzzo. Ad esempio, saranno richiesti 16 mg di polvere per somministrare 8 mg di LANE da una miscela 50:50 p/p HBP:LANE, oppure saranno richiesti 40 mg di polvere per somministrare 8 mg di LANE da una miscela 80:20 p/p HBP: LANE. Preferibilmente la quantità di farmaco verrà somministrata in un singolo atto di inalazione (tutta la dose di polvere in pochi secondi), ma in una particolare forma di realizzazione dell'invenzione, se è richiesta una quantità maggiore di polvere, la dose può essere inalata mediante svariate inalazioni consecutive attraverso lo stesso

inalatore.

Le composizioni dell'invenzione sono efficaci per il trattamento di tosse acuta, subacuta o cronica di varia eziologia, ad esempio tosse associata all'asma o causata dalla somministrazione di un altro medicinale, ad esempio un ACE inibitore o qualsiasi medicinale usato per trattare l'asma o la broncopneumopatia cronica ostruttiva.

L'invenzione è illustrata in dettaglio dai seguenti esempi.

Esempio 1. Produzione di polveri essiccate a spruzzo di lidocaina cloridrato-HA di peso molecolare compreso fra 20-50 kDa.

L'ottimizzazione è stata incentrata su tre parametri di processo vale a dire concentrazione di soluti nella soluzione da essiccare, portata di alimentazione e diametro dell'ugello. Ognuna delle tre variabili è stata considerata a due livelli applicando un disegno fattoriale a 2 livelli completo utilizzando il software Minitab® 17 (Minitab Inc., State College, PA, USA) effettuando un totale di 8 esperimenti (2^3).

Come attributi di qualità delle polveri essiccate sono stati valutati:

- Contenuto di umidità residua della polvere essiccata;
- Dimensione granulometrica come dv_{50} ;
- Frazione non respirabile.

La polvere composita essiccata a spruzzo conteneva lidocaina cloridrato (ACEF, Fiorenzuola, Italia) 20% p/p e HA 20-50 kDa (Prymalhyal 50, 20-50 kDa, Givaudan, Francia) 80% p/p come polimero mucoadesivo.

Le polveri sono state prodotte utilizzando un apparecchio Mini spray drier B290 (Büchi, Svizzera) mantenendo fissi i seguenti parametri di processo: portata aria (600 L/ora) temperatura in ingresso (130°C) e portata in aspirazione ($35\text{ m}^3/\text{ora}$). Con tale condizione la temperatura in uscita era di circa 70°C .

Il diametro mediano di massa, Dv_{50} , è stato determinato mediante diffrazione laser

come descritto nell'Esempio 2.

Il contenuto di acqua delle polveri essiccate a spruzzo è stato misurato mediante analisi termogravimetrica (TGA) utilizzando un apparecchiatura TGA-DSC 1 STAR^e system (Mettler Toledo, USA). Approssimativamente, 5 mg di ciascuna polvere essiccata a spruzzo sono stati sottoposti ad un programma di riscaldamento da 25 a 130°C con una velocità di riscaldamento costante di 10°C/minuto sotto flusso di 50 mL/minuto di azoto secco.

Il contenuto di umidità residua era rappresentato dalla percentuale di perdita di peso compresa tra 25 e 110°C.

La frazione non respirabile è stata valutata in vitro utilizzando un Fast Screening Impactor (FSI, Copley Scientific, UK). Questa apparecchiatura impiega due stadi di segregazione: il primo denominato CFC, nel quale si depositano le particelle con un diametro aerodinamico maggiore di 5 µm e uno denominato FFC che raccoglie particelle con un diametro aerodinamico inferiore a 5 µm. L'FSI è composto da una gola (IP), un CFC riempito con 10 mL di una soluzione metanolo-acqua 70:30 v/v, che agiva come una trappola liquida per le particelle con diametro aerodinamico > 5 µm e da un FFC dotato di filtro in fibra di vetro (Tipo A/E, Pall Corporation, USA). Dopo aver completato l'assemblaggio secondo le istruzioni fornite dal costruttore, l'FSI è stato collegato a una pompa per vuoto VP 1000 (Erweka, Germania) e il flusso di aria di 60 mL/min è stato registrato attraverso l'impattatore è stato misurato da un flussometro (modello 3063, TSI, USA). L'aerosolizzazione della polvere è stata effettuata per mezzo di un dispositivo per polveri secche RS01 (Plastiap, Italia) caricato con una capsula di ipromellosa formato #3 (Qualicaps, Spagna) contenente 20 mg di polvere. Dopo la deposizione, la quantità di polvere in ogni stadio, nel dispositivo e nella capsula, è stata raccolta utilizzando un volume definito di solvente e mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). L'analisi

è stata condotta in triplicato.

La Frazione non respirabile è stata calcolata dividendo la quantità depositata nello stadio CFC per la quantità di polvere totale emessa dal dispositivo che corrispondeva alla somma della quantità depositata su CFC e FFC.

La Tabella 1 riassume i parametri di processo e i corrispondenti attributi di qualità ottenuti per le polveri lidocaina cloridrato-HA.

Tabella 1. Variabili di processo e corrispondenti attributi di qualità (valore medio $\pm$ deviazione standard) delle polveri contenenti 20% p/p di lidocaina cloridrato e 80% di HA (20-50 kDa) ottenute con un disegno fattoriale completo 2^3 .

Polvere	Parametri di processo			Attributi di qualità		
	Concentrazione di soluti (% p/v)	Portata di alimentazione (mL/minuto)	Diametro dell'ugello (mm)	Dv50	Umidità residua (% p/p)	Frazione non respirabile (%)
#1	5	2.00	2.0	8.1 ± 0.2	7.4	81.3 ± 2.9
#2	3	2.00	2.0	8.5 ± 0.2	8.26	73.0 ± 2.0
#3	5	4.00	2.0	8.9 ± 0.1	8.6	73.0 ± 0.9
#4	3	4.00	2.0	7.3 ± 0.2	8.69	72.8 ± 3.8
#5	5	4.00	1.4	6.6 ± 0.1	8.91	58.2 ± 2.4
#6	5	2.00	1.4	6.9 ± 0.1	7.74	57.9 ± 1.0
#7	3	2.00	1.4	5.8 ± 0.4	8.01	51.2 ± 3.6
#8	3	4.00	1.4	5.4 ± 0.0	8.00	53.3 ± 0.3

Uno studio statistico dei dati (ANOVA) è stato condotto con il software Minitab® 17 e gli effetti dei parametri di processo e attributi di qualità sono stati analizzati con modelli di regressione lineare.

Le equazioni di regressione hanno mostrato che il diametro dell'ugello aveva un effetto statisticamente significativo più importante sulla distribuzione delle dimensioni delle particelle e sulla frazione non respirabile: aumentando il diametro dell'ugello, la dimensione delle particelle delle polveri essiccate a spruzzo e la dose non respirabile

aumentavano.

Esempio 2. Distribuzione granulometrica e contenuto di farmaco delle polveri essiccate a spruzzo lidocaina cloridrato-HA (20-50 kDa).

La distribuzione delle dimensioni delle particelle delle polveri essiccate a spruzzo lidocaina-HA preparate secondo quanto riportato nell'esempio 1, è stata valutata mediante diffrazione laser utilizzando lo strumento Spraytech (Malvern, UK).

Circa 10 mg di polvere essiccata a spruzzo sono stati dispersi in una soluzione di polisorbato 80 (SPAN® 80, sigma Aldrich, USA) in cicloesano nel quale la lidocaina cloridrato è insolubile (concentrazione della polvere 0,1% p/v), e posti in un bagno ad ultrasuoni per 5 minuti prima della misura diffrattometrica.

Ogni misurazione è stata eseguita in triplicato. L'oscuramento del raggio laser è stato mantenuto tra l'8 e il 10%.

La dimensione delle particelle è stata espressa come diametro della sfera equivalente in volume, ovvero dv_{10} , dv_{50} e dv_{90} .

Il contenuto di farmaco e l'omogeneità delle polveri essiccate sono stati valutati mediante HPLC utilizzando uno strumento LC Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA). L'analisi è stata condotta su 6 campioni preparati pesando 25 mg di polvere sciolti in 10 mL di acqua. Sono state effettuate tre repliche per ogni campione.

La determinazione dell'uniformità del contenuto è stata eseguita utilizzando un metodo analitico validato e le seguenti condizioni cromatografiche:

- Colonna: C18 Agilent® Eclipse (5 μ m, 4.6x150 mm, Waters Corp, USA);
- Lunghezza d'onda: 230 ± 2 nm;
- Temperatura della colonna: 25°C;
- Flusso: 1 mL/minuto;
- Fase mobile: soluzione tampone fosfato: metanolo (25:75 v/v)).

Il tampone fosfato è stato preparato sciogliendo 1,38 g di NaH_2PO_4 anidro in 500 mL di acqua ultrapura, quindi il pH è stato regolato a 8 mediante l'aggiunta di poche gocce di una soluzione acquosa di NaOH 1M/40 g/L). La soluzione è stata filtrata con un filtro PTFE da 0,45 μm . Il tempo di ritenzione del farmaco era di 3 ± 1 minuto.

Il contenuto del farmaco è risultato omogeneo in tutti i campioni ed entro il 5% p/p rispetto al valore teorico. Il coefficiente di variazione, CV, (calcolato come percentuale del rapporto tra deviazione standard e valore medio sulle cinque misurazioni) era inferiore al 2,5%. Il risultato indica che la tecnica di essiccamento a spruzzo è adatta per preparare particelle lidocaina cloridrato-HA in combinazione fissa.

Tabella 2. Distribuzione granulometrica e contenuto di farmaco (valori medi $\pm$ deviazione standard) delle polveri prodotte secondo l'esempio 1.

Polvere	Dv ₁₀	Dv ₅₀	Dv ₉₀	Contenuto di lidocaina % p/p della polvere	Contenuto di lidocaina % p/p del valore teorico	CV (%)
#1	4.7 $\pm$ 0.1	8.1 $\pm$ 0.2	14.5 $\pm$ 0.5	20.1 $\pm$ 0.4	100.4 $\pm$ 2.1	2.1
#2	3.6 $\pm$ 0.1	8.5 $\pm$ 0.2	15.9 $\pm$ 0.4	19.9 $\pm$ 0.4	99.5 $\pm$ 2.0	2.0
#3	4.0 $\pm$ 0.0	8.9 $\pm$ 0.1	17.6 $\pm$ 0.4	20.1 $\pm$ 0.1	100.7 $\pm$ 0.6	0.6
#4	3.3 $\pm$ 0.0	7.3 $\pm$ 0.2	14.2 $\pm$ 0.5	20.5 $\pm$ 0.3	102.3 $\pm$ 1.4	1.4
#5	2.9 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.1	13.7 $\pm$ 0.1	19.4 $\pm$ 0.3	97.2 $\pm$ 1.5	1.5
#6	3.1 $\pm$ 0.0	6.9 $\pm$ 0.1	14.1 $\pm$ 0.0	19.0 $\pm$ 0.1	95.0 $\pm$ 0.6	0.6
#7	2.6 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.4	12.7 $\pm$ 0.5	18.9 $\pm$ 0.3	94.6 $\pm$ 1.6	1.7
#8	2.4 $\pm$ 0.0	5.4 $\pm$ 0.0	11.1 $\pm$ 0.0	19.6 $\pm$ 0.3	98.0 $\pm$ 1.5	1.5

Esempio 3. Analisi mediante microscopia elettronica a scansione di polveri essiccate a spruzzo secondo l'esempio 1 prodotte con ugelli di diverso diametro.

La morfologia delle polveri essiccate come descritto nell'esempio 1 è stata studiata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) utilizzando uno strumento SUPRA 40 (Carl Zeiss, Germania). Ciascun campione di polvere (10 mg) è stato posto su un

portacampioni precedentemente ricoperto da un nastro biadesivo di carbonio conduttivo in modo da consentire la dispersione della carica. Le particelle in eccesso sono state rimosse da un flusso delicato di azoto.

I campioni sono stati analizzati in condizioni di alto vuoto a $2,75 \cdot 10^{-6}$ Torr e le immagini sono state raccolte all'ingrandimento di 5000x utilizzando una tensione di accelerazione di 1,0 kV.

La Figura 1 mostra le immagini SEM delle polveri essiccate prodotte con un ugello di diametro 2 o 1,4 mm.

Si può notare che, in entrambi i casi, le polveri composite HA_LANE erano caratterizzate da particelle arrotondate prevalentemente con superficie collassata e in pochi casi con superficie gonfiata e levigata. Tuttavia, la polvere prodotta con un diametro dell'ugello di 1,4 mm ha mostrato una grande quantità di particelle più piccole legate a particelle più grandi rispetto a quella prodotta con un diametro dell'ugello di 2 mm in cui la quantità di particelle più piccole era inferiore.

Esempio 4. Diffrazione di raggi X di polveri.

L'analisi di diffrazione dei raggi X su polvere è stata effettuata su due polveri prodotte con due differenti HA:

- Prymalhyal 50 (20-50 kDa, Givaudan, Francia);
- PLUS-PH 100 kDa Ph.Eur. grade (Altergon, Italia).

Con entrambi i polimeri è stata prodotta una polvere contenente 20% p/p di lidocaina cloridrato e 80% HA.

Le polveri sono state prodotte a partire da una soluzione contenente complessivamente 3% p/v di soluti utilizzando un apparecchio Buchi B290 impiegando i seguenti parametri di processo:

diametro dell'ugello (2 mm); portata di alimentazione (2 mL/min), portata del gas

(600 L/ora) temperatura ingresso (130°C), temperatura uscita (70°C) portata aspirazione (35 m³/ora). La diffrazione di raggi X di queste polveri è stata registrata utilizzando un diffrattometro Miniflex (Rigaku, Giappone) impiegando una radiazione di Cu K α 30 kV, con una velocità di scansione di 0,05°/minuto e un campo di scansione (2 θ) da 5 a 35°. L'analisi (Figura 2) ha mostrato che entrambe le polveri erano amorfe.

Esempio 5. Distribuzione dimensionale aerodinamica delle particelle determinata mediante procedura di impatto di polveri essiccate a spruzzo contenenti lidocaina cloridrato e HA (20-50 kDa).

La polvere composita essiccata a spruzzo conteneva lidocaina cloridrato 20% p/p e HA 20-50 kDa 80% p/p.

I componenti sono stati sciolti separatamente in acqua. Le due soluzioni sono state quindi unite per ottenere una soluzione finale da essiccare con un contenuto di soluti pari a 3% p/v.

Sono state prodotte due polveri utilizzando un essiccatore a spruzzo Büchi B290i impiegando rispettivamente ugelli di 2,0 o 1,4 mm di diametro. Sono stati impiegati i seguenti parametri di processo: portata di alimentazione 4 mL/ min); portata del gas 600 L/h; temperatura di ingresso 130 °C; temperatura di uscita (70 °C; flusso di aspirazione 35 m³/ora.

Ogni formulazione è stata caricata in capsule di ipromellosa (idrossipropilmetilcellulosa) Quali-V-I formato # 3 (Qualicaps, Spagna) e aerosolizzata per mezzo di un inalatore a polvere secca a resistenza medio-alta RS01 (Plastiapae, Italia). Ciascuna capsula è stata caricata con 40 $\pm$ 0,1 mg di polvere corrispondente a una dose nominale di lidocaina di 8 mg. La dimensione aerodinamica delle particelle è stata valutata utilizzando un Next Generation Impactor (NGI, Copley Scientific, UK) dotato di una gola (IP) come descritto in Farmacopea Americana, USP. Ogni determinazione è stata effettuata

scaricando il contenuto di 4 capsule ad una portata di campionamento di 60 L/min per 4 secondi in modo che 4 L di aria fossero aspirati attraverso l'apparecchiatura secondo quanto raccomandato dalla Farmacopea Europea 10^a Edizione 2.9.18.

Alla fine dell'esperimento di deposizione, l'NGI è stato smontato e la quantificazione della lidocaina nelle polveri depositate in ogni stadio è stata eseguita utilizzando un metodo convalidato da HPLC.

La lidocaina cloridrato depositata su ogni stadio dell'impattatore è stata recuperata con aliquote di acqua: metanolo (25:75 v/v), che sono state infine trasferite in matracci tarati di volume adeguato e portate a volume con la stessa miscela di solventi. Le soluzioni ottenute sono state filtrate attraverso un filtro a siringa in acetato di cellulosa (porosità 0,45 µm e diametro 2,5 cm, GVS Filter Technology, USA) prima di essere iniettate in HPLC. Un matraccio tarato è stato utilizzato per raccogliere la polvere rimasta nel dispositivo RS01® e nelle capsule che sono state disciolte in acqua ultrapura alla fine dell'esperimento per verificare il completo recupero del principio attivo.

La dose erogata è stata determinata anche utilizzando la metodologia DUSA (Dose Unit Spray Apparatus). La dose erogata di lidocaina è stata raccolta da 10 capsule separate. Il contenuto della capsula è stato aerosolizzato utilizzando il dispositivo RS01 a 60 L/min e il volume di aria campionata è stato pari a 2.0 L. Tutte le polveri sono state testate in triplicato.

La quantità di lidocaina dosata, la dose erogata, la dose di particelle fini, la frazione di particelle fini, il diametro aerodinamico mediano di massa (MMAD) e la deviazione standard geometrica (GSD) per ciascuna misurazione eseguita con l'impattatore sono stati calcolati in conformità con la Farmacopea europea (10^a edizione 2.9.18).

La performance aerodinamica delle due polveri è stata valutata calcolando:

- dose emessa (ED), ottenuta come somma delle porzioni di farmaco recuperate

dalla gola e da tutte gli stadi dell' NGI espressa in mg, e la sua percentuale rispetto alla dose nominale;

- la dose di particelle fini (FPD), ovvero la quantità di farmaco contenuta in particelle con diametro inferiore a 5 μm , calcolata per interpolazione secondo la Farmacopea Europea ed espressa in mg;

- la frazione di particelle fini (FPF), calcolata come rapporto tra FPD e ED espressa in percentuale;

- dose di particelle non respirabili (NR-PD), ovvero la quantità di farmaco contenuta in particelle con diametro aerodinamico superiore a 5 μm , ottenuta come differenza tra la dose emessa nell' NGI e la dose di particelle fini, espressa in mg;

- frazione di particelle non respirabili (NR-PF), calcolata come rapporto tra la dose di particelle non respirabili e l'ED espresso in percentuale.

Nel presente documento, il termine "dose" indica la quantità di ingrediente attivo erogato da una singola attivazione dell'inalatore.

Le prestazioni di aerosolizzazione delle due polveri sono riassunte nella Tabella 3.

I valori medi della dose erogata per le polveri essiccate a spruzzo con gli ugelli di entrambi i diametri determinati mediante misura NGI, erano compresi tra l'88 e il 95% del valore della Quantità dosata (quantità di lidocaina recuperata in tutto l'impattatore sommata a quella recuperata nella capsula e nel dispositivo), mentre, utilizzando la metodologia DUSA risultavano > di 97% p/p.

La differenza nella frazione di particelle fini e nella frazione di particelle non respirabili era una diretta conseguenza delle diverse distribuzioni granulometriche (aerodinamiche) delle due polveri come evidenziato anche dai valori di MMAD e dalle quantità di farmaco contenute nelle particelle depositatesi nei vari stadi nell'apparato NGI, nella gola (IP) e rimasta nel dispositivo RS01 o nella capsula. In Figura 3 è riportata la

distribuzione del farmaco negli stadi NGI delle due polveri prodotte con ugelli di diverso diametro, rispettivamente 1,40 (istogramma vuoto) e 2,00 mm (istogramma pieno). Le barre rappresentano la deviazione standard ($n = 3$).

Tabella 3. Parametri aerodinamici delle due polveri contenenti 8 mg di lidocaina prodotte con ugelli di diametro differente. Valori medi $\pm$ deviazione standard ($n = 3$).

Parametri	Diametro ugello 1.40 mm	Diametro ugello 2.00 mm
Dose Emessa (mg) DUSA	7.78 ± 0.08	7.85 ± 0.10
Quantità dosata (mg)	7.46 ± 0.09	7.36 ± 0.03
Dose Emessa (mg) NGI	6.60 ± 0.05	6.93 ± 0.01
Dose di particelle fini $\leq 5 \mu\text{m}$ (mg)	2.24 ± 0.08	1.05 ± 0.09
Frazione di particelle fini $\leq 5 \mu\text{m}$ (%)	33.93 ± 1.41	15.12 ± 1.23
Dose di particelle non respirabili $> 5 \mu\text{m}$ (mg)	4.36 ± 0.12	5.89 ± 0.08
Frazione di particelle non respirabili $> 5 \mu\text{m}$ (%)	66.07 ± 1.41	84.88 ± 1.23
MMAD (mm)	3.94 ± 0.11	5.60 ± 0.12
GSD	2.36 ± 0.16	2.54 ± 0.05

Esempio 6. Comparazione fra la dissoluzione di polvere essiccata a spruzzo e lidocaina.

I test di dissoluzione in vitro sono stati condotti sulla polvere di lidocaina materia prima e sulla polvere essiccata a spruzzo di HA-lidocaina, prodotta utilizzando PLUS-PH 100 kDa Ph.Eur (Altergon, IT, lotto n.1000008976) come polimero bioadesivo, attraverso un essiccatore a spruzzo (Buchi) ed impiegando i seguenti parametri di processo: diametro dell'ugello (2 mm), flusso (2 mL/min), portata dell'aria (600 L/h), temperatura d'ingresso (130°C), temperatura d'uscita (70°C) e flusso aspirazione (35 m³/h).

La polvere essiccata a spruzzo conteneva lidocaina cloridrato al 20% (p/p) e HA all'80% (p/p) e aveva un contenuto solido del 3% p/v.

I test di dissoluzione in vitro sono stati effettuati per confrontare le prestazioni delle due polveri, utilizzando RespiCellTM (Sonvico, *F et al. Pharmaceutics* 2021, 13, 1541), una cella a diffusione verticale che comprende un serbatoio di 170 cm³, riempito con il mezzo

di dissoluzione, e un braccio laterale di 10 cm di lunghezza.

L'apparato è composto da una parte superiore, la camera donatrice, e da una parte inferiore, la camera ricevente, tenute insieme tramite una pinza metallica, ma separate da un filtro in microfibra di vetro, utilizzata come membrana di diffusione e posta orizzontalmente a contatto con il mezzo di dissoluzione. La camera ricevente contiene al suo interno un agitatore magnetico.

Il mezzo di dissoluzione impiegato per l'analisi è tampone fosfato salino (PBS), preparato pesando 8 g di NaCl, 0,2 g di KCl, 1,44 g di Na₂HPO₄ e 0,12 g di KH₂PO₄ sciolti in 1 L di acqua distillata, con un pH finale di 7.4.

Durante l'analisi, RespiCellTM è stata termostata (Lauda eco silver E4, DE) a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

La camera ricevente è stata riempita con PBS e campionata ad intervalli di tempo prestabilito attraverso il braccio laterale della cella. 1 mL di mezzo di dissoluzione è stato applicato sul filtro, in modo da bagnarlo completamente, prima dell'analisi.

Ad inizio analisi, circa 8 mg esattamente pesati di lidocaina in un caso, e 40 mg esattamente pesati di polvere essiccata a spruzzo lidocaina-HA (corrispondente a circa 8 mg di lidocaina) nel secondo caso, sono stati sparsi manualmente sul filtro umido e, ad intervalli di tempo prefissati, 1 mL della soluzione ricevente è stato prelevato dalla camera tramite ricevente il braccio laterale e sostituito con 1 mL di nuovo PBS dopo ogni prelievo per mantenere un volume costante di liquido all'interno della cella.

Per valutare la quantità di farmaco non disciolto o intrappolato nel filtro, la polvere residua non disciolta è stata recuperata lavando il filtro con 5 mL di una miscela di metanolo: acqua 75:25 v/v, al termine dell'esperimento. La quantità di farmaco nei campioni è stata quantificata mediante analisi HPLC.

I dati sono stati espressi come percentuale di lidocaina disciolta; il 100% della

dissoluzione corrisponde alla quantità complessiva di farmaco recuperata alla fine dell'esperimento (nella camera ricevente della cella più in quella filtro). Il tempo di dissoluzione totale è stato: 25 minuti per la polvere di LANE materia prima e 135 minuti per la polvere essiccata a spruzzo lidocaina-HA.

La Figura 4 mostra il profilo di dissoluzione di lidocaina materia prima e della polvere essiccata a spruzzo lidocaina-HA.

I risultati ottenuti hanno mostrato il diverso profilo di dissoluzione delle polveri di LANE materia prima e lidocaina-HA.

In particolare, la dissoluzione della polvere essiccata a spruzzo lidocaina-HA è significativamente più lenta: nel caso della polvere lidocaina materia prima, la quantità totale di lidocaina si è completamente sciolta dopo 15 minuti nel mezzo di dissoluzione, mentre la quantità di LANE nella polvere essiccata a spruzzo con HA, si è completamente disciolta dopo circa 2 ore.

La Tabella 4 riassume la quantità di lidocaina disciolta, la quantità di lidocaina trattenuta sopra e all'interno del filtro e il bilancio di massa (recupero complessivo) dell'esperimento.

Tabella 4: quantità di lidocaina recuperata dal test di dissoluzione (circa 8 mg di LANE)

	Lidocaina disciolta (mg)	Lidocaina trattenuta sul e all'interno del filtro (mg)	Recupero totale (%)
Polvere di lidocaina materia prima	7.9 ± 0.4	0.1 ± 0.0	94.0 ± 3.3
Polvere essiccata a spruzzo di lidocaina-HA	8.4 ± 0.2	0.8 ± 0.2	98.6 ± 2.4

Esempio 7. Studio di stabilità di polveri essiccate a spruzzo HA-lidocaina cloridrato.

Gli studi di stabilità sono stati condotti su due essiccate a spruzzo contenenti 20% p/p di lidocaina cloridrato e due diversi tipi di HA : Prymalhyal 50 (20-50 kDa,) e PLUS-PH 100 kDa Ph.Eur prodotte secondo l'esempio 4.

Le polveri sono state conservate in capsule di ipromellosa formato #3, sigillate in sacchetti di alluminio e analizzate dopo 1 mese e 4 mesi di conservazione in due diverse condizioni:

25°C - 60% umidità relativa;

40°C - 75% umidità relativa).

La stabilità chimica è stata valutata quantificando il contenuto di lidocaina cloridrato mediante analisi HPL ai vari tempi di conservazione.

La stabilità fisica è stata valutata mediante Hot Stage Microscopy (HSM), in cui i campioni sono stati osservati al microscopio ottico a luce polarizzata prima (T zero) e dopo la conservazione (1 e 4 mesi). I campioni sono stati riscaldati da 25°C a 130°C, con un intervallo di riscaldamento di 5°C/minuto in atmosfera di azoto. I dati ottenuti sono riportati in Tabella 5.

L'analisi ha mostrato che le polveri non mostravano tendenza a sviluppare porzioni cristalline nemmeno a seguito di riscaldamento, sia appena preparate che ai due diversi tempi di conservazione.

Tabella 5. Contenuto di lidocaina e struttura particellare polveri preparate con HA di diverso peso molecolare e mantenute in diverse condizioni di conservazione.

Mw HA (kDa)	Condizioni di conservazione	Contenuto di lidocaina a T0 (p/p)	Contenuto di lidocaina a 1 mese (p/p)	Contenuto di lidocaina a 4 mesi (p/p)	Struttura a 4 mesi
20-50	25°C-60 UR%	20.9 ± 0.6	19.9 ± 0.3	20.5 ± 0.8	amorfa
100	40°C-75 UR%	20.9 ± 0.6	21.2 ± 0.6	20,8 ± 0,2	amorfa

Esempio 8. Challenge test per la tosse.

Il challenge tussigeno (*Fontana, GA, et al. Eur Respir J 1997; 10: 983–98; Lavorini, F et al. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 1117–1120*) è stato effettuato su 10 volontari sani (8 maschi) di età compresa fra 35 e 70 anni prima e dopo l'inalazione di una polvere placebo di una polvere di lidocaina-HA preparata secondo l'esempio 4 con ialuronato di sodio PLUS-PH (100 kDa).

La tosse è stata indotta dall'inalazione di acqua distillata nebulizzata ad ultrasuoni (nebbia) prodotta da un nebulizzatore a ultrasuoni Mist-O2-Gen (Modello EN143A, Timeter, PA, USA). È riportato in letteratura che il diametro aerodinamico mediano di massa delle goccioline di aerosol generate dal nebulizzatore è di 3,6-5,7 µm (*Phipps, PR, et al. Chest 1990; 7 1327–1332*). Il serbatoio del nebulizzatore è stato riempito con 180 mL di acqua distillata; l'uscita ("output") dell'aerosol è stata regolata tramite un potenziometro e monitorata come un segnale in corrente continua (DC) su un oscilloscopio. L'output poteva essere progressivamente aumentato per livelli corrispondenti al 5% del livello di output massimo raggiungibile.

La nebbia è stata inalata da volontari durante la normale respirazione a riposo e il tempo di inalazione per ciascuna concentrazione è stato standardizzato a 1 minuto. Sono stati programmati 2-3 minuti di riposo tra le concentrazioni di aerosol di nebbia. Il range di output del nebulizzatore usato negli esperimenti poteva variare dal 30 al 100% del

segnale DC massimo e la corrispondente quantità di acqua nebulizzata (valori medi) variava da 0,08 a 4,45 mL/minuto.

La comparsa della tosse è stata rilevata registrando il flusso espiratorio utilizzando un pneumotacografo tipo Fleish n.4. Alla comparsa della tosse, il test è stato interrotto e ai soggetti è stato permesso di riposarsi per 30 min.

Il test è stato quindi ripreso con l'inalazione della nebbia corrispondente ad un valore di output immediatamente inferiore all'ultimo somministrato. Se la tosse poteva essere provocata di nuovo alla stessa emissione di nebbia che era stata precedentemente in grado di evocare la tosse, la provocazione veniva interrotta e flusso di nebbia è stato preso come soglia (*threshold*, T) della tosse del soggetto. Al contrario, se non era possibile ottenere una risposta alla tosse, il test è stato ripreso e continuato a fino a quando è stato possibile provocare due volte la tosse alla stessa emissione di nebbia. Pertanto, la soglia della tosse è stata presa come la concentrazione di nebbia più bassa in grado di evocare almeno un colpo di tosse durante due prove consecutive separate da un intervallo di 30 minuti.

Durante l'inalazione di ciascuna output di nebbia è stata valutata l'intensità della sensazione di bisogno di tossire (UTC) per mezzo di una scala analogica visiva di 10 cm in continuo (*Lavorini, F et al. Am J Respir Crit Care Med 2006; 176: 825-32*). Gli estremi della sensazione (cioè "nessuna voglia di tossire" e "voglia di tossire estrema") erano visualizzati sulle due estremità di un display posto di fronte al soggetto. Il "bisogno estremo di tossire" è stato spiegato a ciascun partecipante come un bisogno di tossire a cui è impossibile resistere. Il display era collegato ad un potenziometro lineare dotato di un cursore tramite il quale il soggetto poteva quantificare il livello di UTC. Sia il display che il potenziometro erano lunghi 10 cm. Distanze uguali sul display e sul potenziometro rappresentavano variazioni uguali nell'intensità della sensazione di UTC.

Dopo la valutazione della soglia di base della tosse, al soggetto, in giornate separate da 24-48 ore, è stato somministrato placebo (lattosio) o polvere di HA-lidocaina utilizzando il DPI RS01. I soggetti sono stati accuratamente istruiti da personale medico addestrato ad inspirare con la massima forza possibile partendo dal livello vicino al volume residuo fino alla capacità polmonare totale, trattenendo successivamente il respiro di circa 10 secondi. Per ogni soggetto la capsula è stata inalata due volte per ridurre al massimo eventuale residuo di polvere secca. Dopo circa 5 minuti il challenge tussigeno veniva ripetuto seguendo le stesse modalità della prova di base. Se il soggetto non tossiva, veniva sottoposto ad inalazione di nebbia pari a 1.3XT, 1.6XT e pari al 100% dell'output del nebulizzatore. E' stato calcolato anche il tempo necessario per ristabilire il livello di soglia pre-inalazione del soggetto.

L'inalazione di placebo non ha influenzato la soglia della tosse e il corrispondente UTC. Al contrario, la polvere di HA-lidocaina ha aumentato significativamente la soglia della tosse e l'UTC nei 10 soggetti testati con un aumento mediano pari a 2,13 volte. La durata dell'effetto è stata di circa 50 ± 8 min.

RIVENDICAZIONI

1. Composizioni farmaceutiche in forma di polvere secca per inalazione comprendenti un anestetico locale e un polimero biocompatibile idrofilo.
2. Composizioni secondo la rivendicazione 1 in cui l'anestetico locale è scelto fra procaina, cloroprocaina, lidocaina, prilocaina, mepivacaina, bupivacaina, etidocaina, ropivacaina e tetracaina o loro sali e/o solvati.
3. Composizioni secondo la rivendicazione 2 in cui l'anestetico locale è lidocaina.
4. Composizioni secondo una delle rivendicazioni da 1 a 3 in cui il polimero biocompatibile idrofilo è scelto fra sali dell'acido ialuronico, preferibilmente il sale di sodio, derivati della cellulosa solubili in acqua, glicoli polietilenici, polivinil pirrolidoni, polivinil alcoli e loro miscele.
5. Composizioni secondo la rivendicazione 4 in cui il polimero biocompatibile idrofilo è ialuronato di sodio.
6. Composizioni secondo una delle rivendicazioni da 1 a 5 in cui la polvere secca è costituita da micro-particelle essiccate a spruzzo aventi dimensione definita compresa fra 2 e 18 micron, un diametro aerodinamico mediano di massa compreso tra 4,0 e 6,0 micron e una frazione di particelle fini non superiore al 35% in massa.
7. Composizioni secondo la rivendicazione 6 in cui la distribuzione granulometrica delle micro-particelle è caratterizzata da $d(0.1)$ compreso tra 2,0 e 5,0 micron, $d(0.5)$ compreso tra 5,0 e 9,0 micron e $d(0.9)$ compreso tra 11 e 18 micron.
8. Processo per la preparazione delle micro-particelle delle rivendicazioni 6-7, che comprende le seguenti fasi:
 - i) dissoluzione di un polimero biocompatibile idrofilo solubile in un solvente adatto;
 - ii) dissoluzione di un LANE in acqua;

- iii) aggiunta della soluzione ii) alla soluzione i) sotto agitazione;
- iv) essiccazione a spruzzo della soluzione della fase iii);
- v) raccolta della polvere ottenuta sotto forma di particelle; e
- vi) opzionale micronizzazione dette particelle.

- 9. Processo secondo la rivendicazione 8 in cui nella fase iv) si impiega un ugello dell'essiccatore a spruzzo avente diametro compreso tra 0,7 mm e 3 mm.
- 10. Un inalatore di polvere secca comprendente le composizioni delle rivendicazioni 1-7.
- 11. Un kit comprendente le composizioni delle rivendicazioni 1-7 e un inalatore di polvere secca.
- 12. Composizioni delle rivendicazioni da 1 a 7 per uso nel trattamento della tosse.

Milano, 17 dicembre 2021

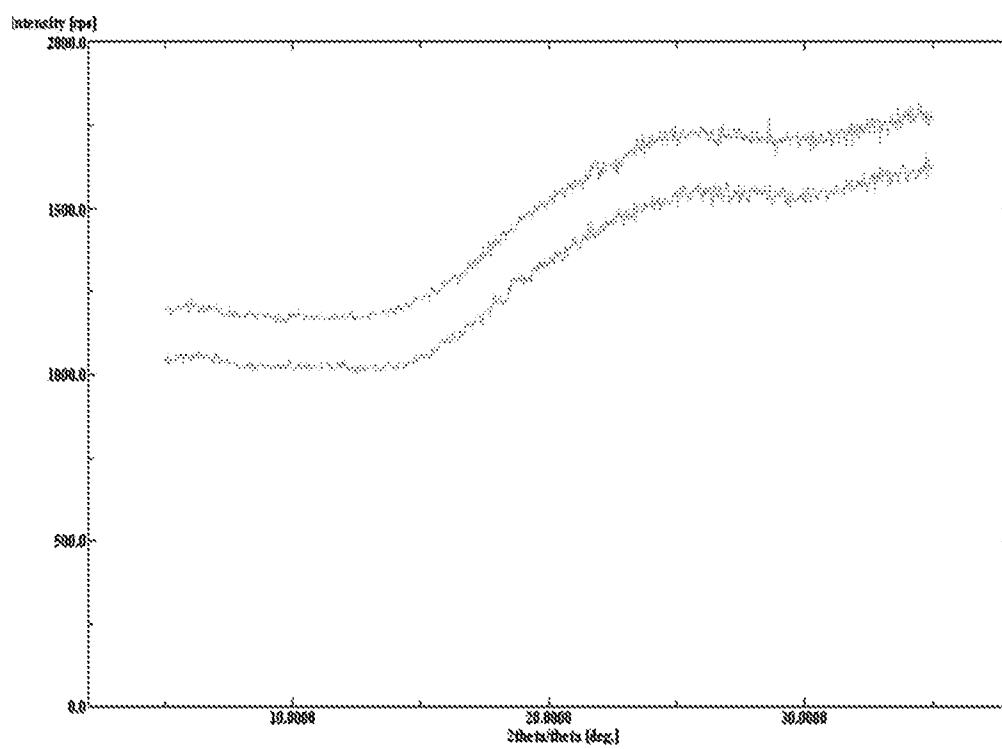


FIGURA 2

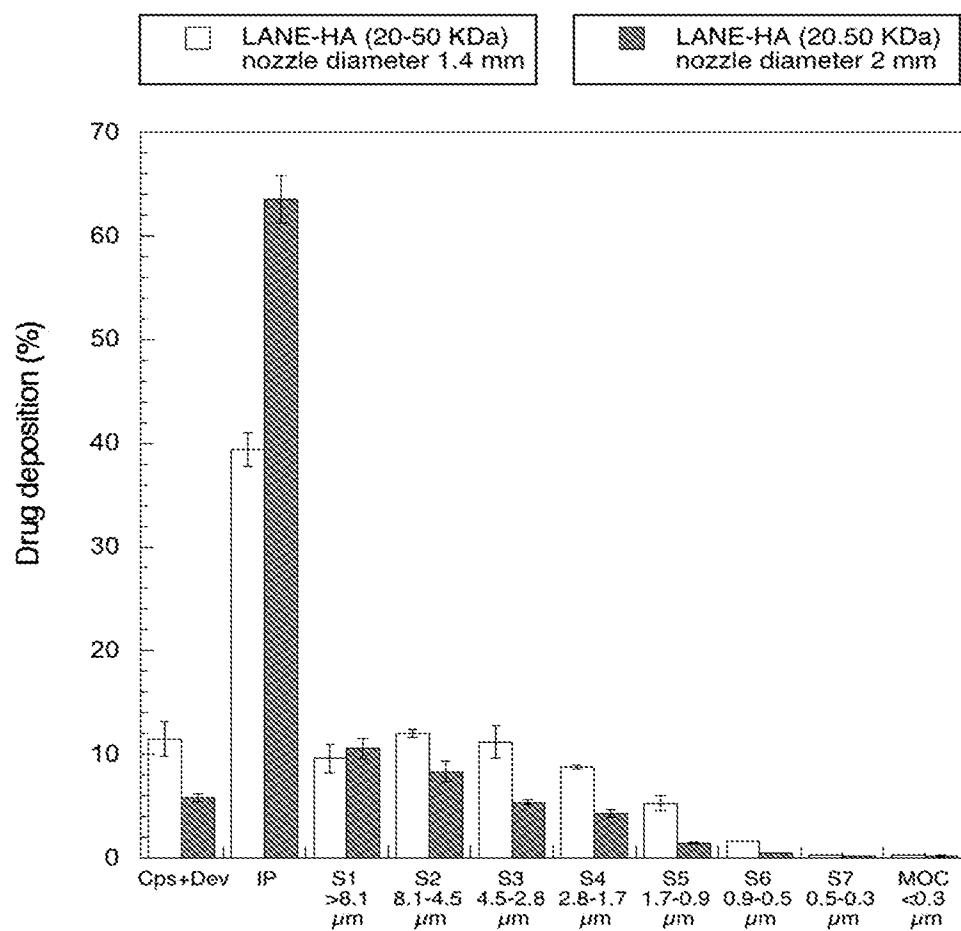


FIGURA 3

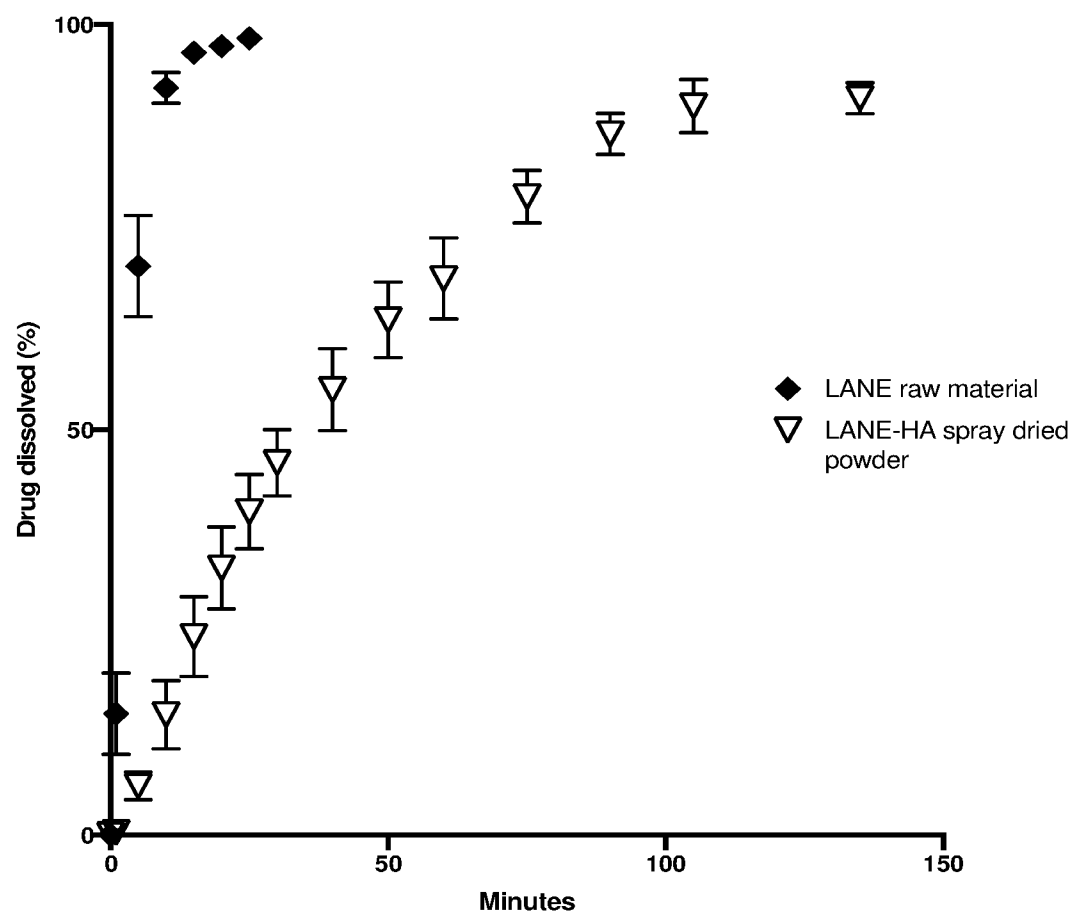


FIGURA 4