

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000031133
Data Deposito	13/12/2021
Data Pubblicazione	13/06/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	65

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	31	04

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	9	16

Titolo

Composizione farmaceutica comprendente tigeciclina
--

DESCRIZIONE

Della Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale dal Titolo:

“ Composizione farmaceutica comprendente tigeciclina”

a nome : ZAMBON S.p.A.

Inventori : Loretta Maggi, Cristina Veneziani, Heike Butti, Laura Zanellotti, Giovanni Tangherlini, Giovanni Caponetti

* * * * *

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda una composizione farmaceutica sotto forma di polvere secca per somministrazione inalatoria dotata di elevata respirabilità e stabilità.

In particolare, la presente invenzione riguarda una polvere inalatoria indicata per il trattamento di infezioni polmonari provocate da micobatteri, in particolare micobatteri non tubercolari, contenente farmaci appartenenti alla classe delle glicilciline, in particolare tigeciclina.

STATO DELL'ARTE

I micobatteri appartengono al genere *Mycobacterium* identificato per la prima volta nel 1896. Il genere *Mycobacterium* comprende circa 190 specie batteriche caratterizzate da una parete cellulare cerosa e ricca di acido micolico che conferisce resistenza alla pressione osmotica, ai fattori ambientali e agli antibiotici.

Per quanto riguarda le infezioni polmonari da micobatteri, si possono distinguere due principali agenti eziologici, il *Mycobacterium tuberculosis* e i micobatteri non tubercolari (NTM, *Non Tuberculous Mycobacteria*).

Il *Mycobacterium tuberculosis*, l'agente eziologico della tubercolosi (TB), si differenzia nettamente per habitat, patogenicità, contagiosità e sensibilità ai chemioterapici da tutte le altre specie di micobatteri e rimane una delle cause più comuni di infezione e mortalità in tutto il mondo.

Diversamente, le infezioni polmonari da NTM (NTM pulmonary disease, NTM-PD) sono meno conosciute, sebbene stiano lentamente diventando una delle principali preoccupazioni per la salute globale a causa della loro costante crescita in tutto il mondo.

La classificazione dei micobatteri non tubercolari ha seguito due fasi. La prima fase ha portato alla classificazione utilizzando la velocità di crescita come criterio distintivo, suddividendo i micobatteri in due gruppi. Colonie osservabili a occhio nudo dopo 7 giorni dalla semina venivano considerate appartenenti a NTM a lenta crescita (*slowly-growing mycobacteria*, SGM), mentre colonie visibili in meno di 7 giorni erano attribuite a NTM a rapida crescita (*rapidly-growing mycobacteria*, RGM).

La seconda fase della classificazione dei micobatteri non tubercolari è iniziata negli anni '90 con gli studi della sequenza del gene codificante per il DNA ribosomiale 16S, che hanno portato ad un significativo incremento del numero di specie, ad oggi quasi 150.

Gli NTM sono patogeni opportunisti, che causano principalmente malattie polmonari simili alla tubercolosi in gran parte in pazienti immuno-compromessi o pazienti con condizioni polmonari preesistenti, come la fibrosi cistica (*Cystic Fibrosis*, CF), bronchiectasie o broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO).

Sebbene l'incidenza della tubercolosi abbia iniziato a diminuire lentamente negli ultimi anni (riduzione del 2,3% dal 2016), la prevalenza globale di infezioni polmonari da NTM è rapidamente aumentata. Quella annuale varia nelle diverse regioni, ed è generalmente compresa tra 0,2/100 000 e 9,8/100 000 con un tasso di crescita globale allarmante. La situazione è peggiore tra le popolazioni vulnerabili e la crescente consapevolezza che la prevalenza di NTM in tutto il mondo potrebbe anche essere maggiore di quanto stimato a causa di diagnosi errate è causa di ulteriore preoccupazione.

Nei paesi in via di sviluppo, la diagnosi errata di NTM scambiata per TB è comune, a causa del loro aspetto simile all'esame microscopico degli strisci di espettorato. Questo è problematico in molti modi: l'incidenza di NTM è ampiamente sottovalutata, drena inutilmente risorse dedicate alla lotta globale contro la tubercolosi e porta ad errati trattamenti dei pazienti perché le infezioni da NTM non rispondono ai classici regimi farmacologici per la tubercolosi.

Le infezioni polmonari da micobatteri sono generalmente causate dall'inalazione di aerosol. La fonte di questi aerosol può essere ambientale, come spesso accade per l'NTM, o da altri individui infettati, come si nota per la tubercolosi. Una volta nei polmoni, si ritiene che la fisiopatologia di queste infezioni sia relativamente simile, sebbene la gravità clinica sembri variare. In entrambi i casi, l'invasore patogeno viene rapidamente riconosciuto e

fagocitato dai macrofagi alveolari, dove i micobatteri sopravvivono e proliferano a livello intracellulare. In risposta, l'organismo umano recluta il proprio sistema immunitario sotto forma di monociti circolanti, neutrofili, cellule T e cellule dendritiche per formare un granuloma, uno dei segni distintivi delle infezioni polmonari da micobatteri. Questa strategia spesso consente la sopravvivenza dei patogeni all'interno dell'area in quarantena portando alla cavitazione dei tessuti, alla disseminazione e al declino della funzione respiratoria. Pertanto, qualsiasi terapia micobatterica deve essere in grado di penetrare in questo ambiente infiammatorio per colpire efficacemente gli agenti patogeni invasori.

Tra i NTM che causano infezioni polmonari, il *Mycobacterium abscessus* complex (MABc) è uno tra i più significativi associati alle infezioni polmonari, in particolare nei pazienti con fibrosi cistica. Il *Mycobacterium abscessus* complex, isolato per la prima volta nel 1992, è stato suddiviso in 3 sottospecie filogeneticamente molto simili: *M. abscessus* sensu stricto (*M. abscessus* s.s.), *M. massiliense*, e *M. bolletii*.

Il MABc è considerato il più patogeno dei micobatteri a rapida crescita (RGM). In particolare, il MABc è associato alla resistenza intrinseca e acquisita alla maggior parte degli agenti anti-micobatterici, inclusi i macrolidi.

Negli ultimi anni, i casi di infezione umana da MABc sono aumentati progressivamente destando non poca preoccupazione in ambito clinico. Il numero di lavori in letteratura riguardo l'isolamento clinico di MABc da pazienti con fibrosi cistica, pazienti con malattie respiratorie croniche e pazienti con bronchiectasie è costantemente aumentato, rivestendo un'importanza clinica sempre maggiore. Attualmente, si ritiene che MABc sia la causa di circa l'80% delle infezioni polmonari da RGM.

I trattamenti noti per le infezioni da micobatteri sono spesso lunghi e richiedono aderenza rigorosa, principalmente a causa della natura tenace dei micobatteri e dello sviluppo di strutture granulomatose. Le attuali terapie per la tubercolosi comportano la somministrazione di isoniazide, rifampicina, etambutolo e pirazinamide per 6-30 mesi. Il trattamento di infezioni polmonari da NTM è in gran parte empirico, basato sull'uso di tre o quattro antibiotici, per almeno 12 mesi.

In generale vengono prescritti regimi multifarmaco a base di macrolidi (claritromicina o azitromicina) in combinazione con antibiotici parenterali,

come per esempio, un aminoglicoside (streptomina, neomicina, kanamicina, amikacina e tobramicina), cefoxitina, imipenem o tigeciclina, per trattamenti di almeno 12 mesi, che spesso si prolungano per 18-24 mesi.

Il trattamento di infezioni polmonari da NTM spesso comporta un onere economico e psicologico significativo per i pazienti che ha come conseguenza un elevato tasso di interruzione del trattamento. Le principali cause di interruzione del trattamento sono la lunga durata del trattamento, la mancanza di miglioramenti osservati e i gravi effetti collaterali associati alla somministrazione orale e parenterale.

Per le ragioni esposte in precedenza, vi è un'urgente necessità medica di sviluppare regimi più efficaci e sicuri costituiti da farmaci maggiormente biodisponibili per il trattamento delle infezioni polmonari da NTM, che ha portato allo sviluppo di trattamenti con antibiotici per via inalatoria.

Attualmente la somministrazione di farmaci per via inalatoria è ottenuta mediante erogazione con dispositivi inalatori quali:

- nebulizzatori, per i quali il farmaco è disciolto o disperso in forma di sospensione e veicolato nel polmone come goccioline fini nebulizzate;
- inalatori pressurizzati, mediante i quali il farmaco - ancora sotto forma di goccioline di soluzione o sospensione - è veicolato nel polmone da un gas inerte espanso rapidamente in aria da una bomboletta pressurizzata;
- inalatori per polveri, in grado di erogare il farmaco presente nell'inalatore e veicolarlo nel polmone come particelle secche micronizzate.

Nella domanda di brevetto internazionale pubblicata con il numero WO2020/239696 è stato suggerito l'uso di una glicilciclina, in particolare tigeciclina, nel trattamento di infezioni da micobatteri per via inalatoria. WO2020/239696 descrive l'uso di soluzioni per nebulizzatori e di polveri per inalatori, queste ultime realizzate secondo il procedimento descritto in WO2011/073002 e comprendenti il 98-99,9% di glicilciclina e il 0,1-2% di un lubrificante (in particolare stearato di magnesio).

Sono altrettanto note soluzioni di una glicilciclina, in particolare tigeciclina, nel trattamento di infezioni da micobatteri per via parenterale, come descritto in WO2006/099258, ottenute per ricostituzione in soluzione acquosa di una polvere comprendente tigeciclina, un carboidrato scelto tra lattosio, mannosio,

saccarosio e glucosio, e un acido e/o un tampone in quantità tale da fornire alla soluzione un pH tra 4 e 5.

Ciononostante, le glicilcicline, ed in particolare la tigeciclina, sono principi attivi che presentano difficoltà tecniche formulative tali per cui ad oggi, nonostante tali principi attivi siano noti da oltre quarant'anni, esistono solo formulazioni in soluzione per infusione endovenosa in ambiente ospedaliero, e non esistono formulazioni, né in via di approvazione, né tantomeno approvate dalle autorità regolatorie, adatte ad una somministrazione per via inalatoria.

Le formulazioni inalatorie in forma di polvere sono state convenzionalmente ottenute attraverso la macinazione/micronizzazione di principi attivi in forma cristallina fino ad ottenere particelle di diametro generalmente inferiore a 5,0 μm , più preferibilmente inferiori a 2,0 μm . In generale l'impiego di eccipienti è stato limitato alla risoluzione di problematiche di scorrevolezza delle polveri dei principi attivi micronizzati.

Risulta evidente che la tecnica formulativa basata sulla macinazione/micronizzazione presenta diverse limitazioni dal punto di vista della possibilità di processare principi attivi, anche molto differenti per caratteristiche chimiche e chimico-fisiche, assicurando che la formulazione finale possieda proprietà aerodinamiche adeguate alla somministrazione inalatoria nelle regioni profonde dell'apparato respiratorio.

In questo senso un approccio efficace per l'ottenimento di polveri inalatorie con buone proprietà aerodinamiche è rappresentato dall'ingegnerizzazione delle particelle (particle engineering) ottenibile attraverso la tecnica produttiva dell'essiccamento a spruzzo (spray drying). Secondo tale tecnica principio attivo ed opportuni eccipienti possono essere combinati a formare particelle le cui proprietà aerodinamiche sono definite dalla composizione e dalle condizioni di processo adottato.

Nonostante le opportunità offerte dall'ingegnerizzazione delle particelle questa tecnica non è priva di difficoltà formulative da superare. Tra le più rilevanti incontrate nello sviluppo di prodotti inalatori in polvere vi è sicuramente l'esigenza di assicurare al prodotto in sviluppo sufficiente stabilità chimica durante l'esecuzione del processo di produzione.

La stabilità di un prodotto inalatorio è particolarmente importante in relazione al fatto che questo deve essere somministrato nel polmone profondo

mantenendo le proprie caratteristiche fisiche per una penetrazione quantitativa di particelle fino alle regioni più profonde di questo. A questo deve essere aggiunto il fatto che il numero di eccipienti al momento approvati per la somministrazione inalatoria, e quindi accettabili in termini di tossicità nei confronti del tessuto polmonare, è estremamente limitato.

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

Alla luce di tutte le considerazioni sopra esposte, risulterebbe vantaggioso realizzare una composizione farmaceutica per somministrazione inalatoria in forma di polvere secca comprendente una glicilciclina, in particolare tigeciclina, che sia stabile e facilmente somministrabile con i comuni inalatori per polveri secche, mantenendo al contempo una facilità di realizzazione.

Allo stato della tecnica rimane infatti irrisolto, o risolto in modo non soddisfacente, il problema di provvedere una formulazione inalatoria comprendente una glicilciclina, in particolare tigeciclina, che sia stabile e sia somministrabile con i comuni inalatori per polveri secche, mantenendo caratteristiche di elevata erogabilità e respirabilità, e che possa essere prodotta industrialmente con un processo vantaggioso sotto il profilo economico.

La Richiedente ha quindi affrontato il problema tecnico di realizzare una formulazione inalatoria comprendente una glicilciclina, in particolare tigeciclina, per il trattamento delle infezioni polmonari da micobatteri non tubercolari, con particolare interesse nei confronti delle infezioni causate da micobatteri facenti parte della specie *Mycobacterium Abscessus Complex*.

In particolare la Richiedente ha affrontato il problema di ottenere un'elevata stabilità della tigeciclina, sia durante il procedimento di produzione, sia nel prodotto finito sotto forma di polvere secca.

Al contempo, la Richiedente ha affrontato il problema di assicurare un'elevata respirabilità al fine di raggiungere, in quantità terapeutiche elevate, le regioni del polmone più profondo, identificate come la regione bronchiale più distale ed alveolare con lo scopo di raggiungere i macrofagi alveolari ed essere in grado di penetrare all'interno di questi attraverso un meccanismo di permeazione diretta e rapida attraverso la parete cellulare.

La Richiedente ha osservato che l'uso di lattosio in una soluzione contenente tigeciclina mantenuta a pH 7 mediante l'aggiunta di un composto

acido, in particolare un acido organico od inorganico, preferibilmente volatile alle temperature di lavoro del procedimento di essiccazione, permetteva di ottenere una soluzione stabile durante il procedimento di produzione della polvere per mezzo di essiccazione ed al contempo realizzava una polvere secca stabile nel tempo e con caratteristiche ottimali di respirabilità.

In particolare, la Richiedente ha osservato che tali risultati si ottenevano quando la quantità di lattosio era pari o superiore alla quantità di tigeiciclina.

La Richiedente ha inoltre osservato che l'aggiunta di leucina alla soluzione utilizzata nel procedimento di essiccazione permetteva di migliorare ulteriormente le caratteristiche di respirabilità e scorrevolezza della polvere secca risultante nonché la stabilità nei confronti dell'umidità ambientale.

Pertanto, in un primo aspetto, la presente invenzione riguarda una composizione farmaceutica sotto forma di polvere secca per somministrazione inalatoria comprendente una glicilciclina, in particolare tigeiciclina, in quantità inferiore al 50% in peso rispetto al peso totale della composizione, e lattosio in quantità uguale o superiore alla quantità di detta glicilciclina.

Vantaggiosamente, la composizione farmaceutica secondo il primo aspetto della presente invenzione comprende inoltre leucina.

La Richiedente ha osservato che la tigeiciclina presente nella polvere secca secondo la presente invenzione era sostanzialmente in forma amorfa.

In un secondo aspetto, la presente invenzione riguarda inoltre un procedimento per preparare una composizione farmaceutica sotto forma di polvere secca per somministrazione inalatoria comprendente una glicilciclina, in particolare tigeiciclina, dove detto procedimento comprende le seguenti fasi:

- (a) preparare una soluzione in solvente acquoso comprendente una glicilciclina, in particolare tigeiciclina, lattosio, e facoltativamente leucina;
- (b) essiccare la soluzione della fase (a) per ottenere una polvere secca avente X_{90} inferiore a 10 μm , e
- (c) raccogliere detta polvere secca,

caratterizzata dal fatto che detta soluzione comprende inoltre un acido organico od inorganico in quantità necessaria ad impartire a detta soluzione un valore di pH compreso tra 6,5 e 7,5, preferibilmente circa 7,0.

In un terzo aspetto, la presente invenzione riguarda una composizione

farmaceutica sotto forma di polvere secca per somministrazione inalatoria per uso nel trattamento di infezioni da micobatteri, in particolare micobatteri non tubercolari, dove detta composizione comprende una glicilciclina, in particolare tigeciclina, in quantità inferiore al 50% in peso rispetto al peso totale della composizione, e lattosio in quantità uguale o superiore alla quantità di detta glicilciclina.

In un quarto aspetto, la presente invenzione riguarda un metodo per il trattamento di infezioni da micobatteri, in particolare micobatteri non tubercolari, in un soggetto in stato di necessità che comprende la somministrazione per via inalatoria di una quantità efficace di una composizione farmaceutica sotto forma di polvere secca che comprende una glicilciclina, in particolare tigeciclina, in quantità inferiore al 50% in peso rispetto al peso totale della composizione, e lattosio in quantità uguale o superiore alla quantità di detta glicilciclina.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La descrizione verrà esposta qui di seguito con riferimento agli uniti disegni, forniti a solo scopo indicativo e, pertanto, non limitativo, nei quali:

- la figura 1 illustra la formazione di prodotti di degradazione di colore sempre più intenso dopo 24 ore di conservazione di una soluzione di tigeciclina rispettivamente a 5°C, a 25°C e a 40°C;
- la figura 2 illustra il diffrattogramma ottenuto con una polvere ottenuta per essiccazione a spruzzo, comprendente tigeciclina e lattosio in rapporto 1:1 (curva A) e con una polvere comprendente tigeciclina, lattosio e leucina in rapporto 1:1:1 (curva B):
- la figura 3 illustra una foto al microscopio elettronico di un campione della formulazione 1 (3A) e della formulazione 2 (3B) descritta nell'esempio 1.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda una composizione farmaceutica sotto forma di polvere secca per somministrazione inalatoria comprendente una glicilciclina, in particolare tigeciclina, in quantità inferiore al 50% in peso rispetto al peso totale della composizione, e lattosio in quantità uguale o superiore alla quantità di detta glicilciclina.

Secondo la presente invenzione con l'espressione "polvere per

somministrazione inalatoria” si intende una polvere adatta per la somministrazione polmonare. Una polvere per somministrazione inalatoria può essere dispersa ed inalata per mezzo di un opportuno inalatore, cosicché le particelle che la compongono possano penetrare all'interno dei polmoni fino agli alveoli al fine di espletare le caratteristiche farmacologiche del principio attivo da cui è composta. Sono da ritenersi normalmente inalabili particelle con diametro aerodinamico inferiore a 5,0 μm .

Secondo la presente invenzione con l'espressione “polvere secca” si intende una polvere che presenta un contenuto di umidità inferiore al 10%, preferibilmente inferiore al 5%, più preferibilmente al di sotto del 3%.

Vantaggiosamente, la glicilciclina utilizzata nella composizione farmaceutica della presente invenzione è la tigeciclina. Altre glicilcicline utili nella composizione farmaceutica della presente invenzione sono la eravaciclina, e altre glicilcicline sperimentali note con l'acronimo DMG-DMDOT, DMG-MINO, e DMG-DOXY.

La quantità di tigeciclina presente nella composizione farmaceutica sotto forma di polvere secca della presente invenzione è preferibilmente compresa da 15% a 45%, più preferibilmente da 20% a 40%, ancora più preferibilmente da 25% a 35% in peso rispetto al peso totale della composizione.

La quantità di lattosio presente nella composizione farmaceutica della presente invenzione è preferibilmente compresa da 30% a 85%, più preferibilmente da 35% a 80%, ancora più preferibilmente da 40% a 75% in peso rispetto al peso totale della composizione.

Vantaggiosamente, il rapporto in peso tra la quantità di tigeciclina e la quantità di lattosio presenti nella composizione farmaceutica secondo la presente invenzione è compreso tra 1:1 e 1:3, preferibilmente tra 1:1 e 1:2.

Vantaggiosamente, la composizione farmaceutica della presente invenzione comprende inoltre leucina.

Secondo un aspetto preferito della presente invenzione, la composizione farmaceutica della presente invenzione comprende leucina in quantità dal 5% al 30%, preferibilmente dal 10% al 25% in peso rispetto al peso totale della composizione.

La leucina è un aminoacido naturale le cui caratteristiche di tollerabilità locale a seguito di inalazione sono ormai ampiamente riconosciute e

documentate anche se al momento non è ancora stato introdotto sul mercato un prodotto in polvere inalatoria contenente leucina come eccipiente.

La leucina è un aminoacido idrofobico e la Richiedente ha osservato che durante il procedimento di essiccamento la leucina tende a depositarsi sulla superficie delle particelle formando uno strato sostanzialmente idrofobico che favorisce la resistenza all'umidità e la scorrevolezza delle particelle prodotte.

Vantaggiosamente, la composizione farmaceutica della presente invenzione comprende tigeciclina in quantità compresa tra 20% e 40%, preferibilmente tra 25% e 35%, lattosio in quantità compresa tra 30% e 80%, preferibilmente tra 40% e 70% in peso rispetto al peso totale della composizione, e leucina per la parte restante nella quantità necessaria per arrivare al 100% in peso.

In un aspetto particolarmente preferito, la composizione farmaceutica della presente invenzione comprende tigeciclina in quantità di circa il 30%, lattosio in quantità compresa tra 45% e 60%, e leucina in quantità compresa tra 25% e 10% in peso rispetto al peso totale della composizione.

La composizione farmaceutica secondo la presente invenzione ha preferibilmente una distribuzione dimensionale (X_{90}) per cui almeno il 90% delle particelle ha un diametro equivalente inferiore a 10,0 μm , preferibilmente inferiore a 7,0 μm , più preferibilmente inferiore a 5,0 μm .

La Richiedente ha osservato che tanto minore è il valore di X_{90} tanto maggiore è l'area superficiale della polvere, e tanto più profonda è la deposizione polmonare.

In particolare, la composizione farmaceutica in polvere secondo la presente invenzione presenta un diametro mediano aerodinamico delle particelle (Mass Median Aerodynamic Diameter – MMAD) inferiore a 5 μm , preferibilmente da 2 μm a 4 μm .

Vantaggiosamente, la composizione farmaceutica in polvere secondo la presente invenzione presenta una frazione di particelle fini (FPF) respirabile superiore al 50%, preferibilmente superiore al 60%, più preferibilmente superiore al 70%.

Con il termine di “frazione di particelle fini (FPF)” si intende la frazione di polvere, rispetto al totale di quella erogata da un inalatore, che presenta un diametro aerodinamico (dae) inferiore a 5,0 μm . Con il termine di “frazione

emessa (DF)” si intende la frazione di principio attivo erogata, rispetto al totale di quella caricata. Il test di caratterizzazione che viene eseguito per valutare tali proprietà della polvere è quello del Next Generation Impactor (NGI) come descritto nella Farmacopea Europea ed. corrente. Secondo la presente invenzione, le condizioni di esecuzione di tale test consistono nel sottoporre la polvere ad una aspirazione attraverso l’inalatore tale da generare un flusso di 60 ± 2 litri/min. Tale flusso nel caso dell’inalatore mod. RS01 (Plastiapae, Osnago IT) è ottenuto generando una caduta di pressione nel sistema di 1,4 KPa.

Secondo un aspetto preferito, la tigeciclina ed il lattosio presente nella composizione farmaceutica in polvere secondo la presente invenzione sono sostanzialmente in forma amorfa, mentre la leucina, quando presente, è sostanzialmente in forma cristallina.

Secondo la presente invenzione con l’espressione “sostanzialmente in forma amorfa” si intende che la percentuale di tigeciclina o lattosio in forma amorfa è compresa tra 51-100%, preferibilmente tra 70-100% ed ancor più preferibilmente tra 90-100% rispetto al quantitativo totale di tigeciclina o lattosio nella composizione farmaceutica in polvere.

Secondo la presente invenzione con l’espressione “sostanzialmente in forma cristallina” si intende che la percentuale di leucina in forma cristallina è compresa tra 51-100%, preferibilmente tra 70-100%, più preferibilmente 80-100%, ed ancor più preferibilmente tra 90-100% rispetto al quantitativo totale di leucina nella composizione farmaceutica in polvere.

Secondo la presente invenzione la polvere può comprendere altresì eccipienti adatti alla somministrazione inalatoria.

Tali eccipienti sono preferibilmente tensioattivi, come per esempio, tensioattivi non ionici quali i polisorbati e i copolimeri a blocchi di poliossietilene e polioossipropilene, noti come “Poloxamers, in particolare il polisorbato 80 noto come “Tween 80”, zuccheri quali ad esempio lattosio, mannitolo, saccarosio, trealosio, maltodestrine e ciclodestrine; acidi grassi; esteri di acidi grassi; lipidi, preferibilmente fosfolipidi quali, ad esempio, sfingofosfolipidi naturali e sintetici oltre a glicerofosfolipidi naturali e sintetici tra cui diacilfosfolipidi, alchil-acil fosfolipidi e alchenil-Acil fosfolipidi; aminoacidi; e peptidi come di-leucina e tri-leucina o proteine idrofobiche.

La presenza di un tensioattivo è utile ad assicurare l’abbattimento di cariche

elettrostatiche eventualmente presenti nella formulazioni senza di esso, la presenza di acidi grassi ed altre sostanze lipidiche è utile ad assicurare la scorrevolezza della polvere, e la presenza di ulteriori zuccheri può essere utile per ulteriore rivestimento della polvere.

Vantaggiosamente, gli eccipienti in grado di ridurre l'umidità residua della polvere, come per esempio eccipienti di natura idrofoba, sono particolarmente utili per migliorare la stabilità della composizione farmaceutica della presente invenzione.

In un secondo aspetto, la presente invenzione riguarda un procedimento per preparare una composizione farmaceutica sotto forma di polvere secca per somministrazione inalatoria comprendente una glicilciclina, in particolare tigeciclina, dove detto procedimento comprende le seguenti fasi:

- (a) preparare una soluzione in solvente acquoso comprendente una glicilciclina, in particolare tigeciclina, lattosio, e facoltativamente leucina,
- (b) essiccare la soluzione della fase (a) per ottenere una polvere secca avente X_{90} inferiore a 10 μm , e
- (c) raccogliere detta polvere secca,

caratterizzata dal fatto che detta soluzione comprende inoltre un acido organico od inorganico in quantità necessaria ad impartire a detta soluzione un valore di pH compreso tra 6,5 e 7,5, preferibilmente circa 7,0.

La tigeciclina è un principio attivo estremamente instabile in soluzione acquosa nella quale subisce fenomeni di degradazione principalmente per ossidazione ed epimerizzazione come evidenziato nella Figura 1, che illustra la formazione di prodotti di degradazione di colore sempre più intenso dopo 24 ore di conservazione di una soluzione di tigeciclina rispettivamente a 5°C, a 25°C e a 40°C.

La Richiedente ha osservato che una soluzione acquosa comprendente tigeciclina, lattosio, e facoltativamente leucina nella quale viene aggiunto un acido organico od inorganico in quantità necessaria ad impartire a detta soluzione un valore di pH compreso tra 6,5 e 7,5, preferibilmente circa 7,0 permette di effettuare il procedimento di essiccazione senza alcun fenomeno di degradazione della tigeciclina.

Preferibilmente, l'acido organico od inorganico è un composto volatile alle

temperature di lavoro del procedimento di essiccazione, ed in particolare è scelto nel gruppo che comprende acido formico, acido acetico, acido propionico, acido butirrico, acido cloridrico, acido bromidrico, acido nitrico e acido fosforico.

L'acido formico è particolarmente preferito, perché la Richiedente ha osservato che alle temperature di lavoro del procedimento di essiccazione l'acido formico si decompone in anidride carbonica e acqua, senza lasciare traccia nella polvere risultante.

Vantaggiosamente, la fase (a) di preparazione della soluzione viene effettuata al riparo dalla luce e ad una temperatura uguale o inferiore a 20°C, preferibilmente inferiore a 10°C, e più preferibilmente compresa tra 0° e 5°C.

Preferibilmente, il solvente impiegato è costituito da acqua, vantaggiosamente acqua demineralizzata, acqua distillata, acqua sterile, o acqua deionizzata, ma possono anche essere usate miscele idro-alcoliche con un rapporto acqua : alcol compreso tra 70:30 v/v e 30:70 v/v.

Vantaggiosamente, il solvente impiegato viene opportunamente degassato in modo da avere un contenuto di ossigeno disciolto inferiore al 10%, preferibilmente inferiore al 5%, più preferibilmente inferiore al 3%.

La Richiedente ha osservato che la riduzione del contenuto di ossigeno nel solvente permette di ridurre i fenomeni di ossidazione della tigeciclina, con conseguente maggiore stabilità della stessa nella soluzione preparata per il procedimento di essiccazione.

Gli alcoli preferibilmente impiegati sono scelti dal gruppo che comprende metanolo, etanolo, 1-propanolo, 2-propanolo, 2-metil-1-propanolo, 1-butanolo, 2-butanolo, 3-metil-1-butanolo, 1-pentanol da soli o in miscela. L'uso di etanolo è particolarmente preferito.

Vantaggiosamente, la soluzione viene preparata aggiungendo una glicilciclina, in particolare tigeciclina, lattosio, e facoltativamente leucina al solvente impiegato, preferibilmente acqua, e successivamente regolando il pH al valore desiderato, preferibilmente a circa 7,0, mediante aggiunta di una soluzione acquosa al 10% di acido formico.

Secondo una forma di realizzazione particolarmente preferita del secondo aspetto della presente invenzione, la fase (a) comprende le seguenti fasi:

(a1) degassare detto solvente acquoso fino ad ottenere un contenuto di

ossigeno disciolto inferiore al 10% in peso;

- (a2) aggiungere a detto solvente acquoso detto lattosio, e facoltativamente detta leucina, e dopo completa dissoluzione di detto lattosio, e facoltativamente di detta leucina, aggiungere detta glicilciclina, in particolare tigeciclina;
- (a3) aggiungere un acido organico o inorganico in quantità necessaria ad impartire a detta soluzione un valore di pH di circa 7,0;
- (a4) raffreddare detta soluzione a temperatura inferiore a 5°C in un recipiente a tenuta di luce.

Vantaggiosamente, la fase (b) del procedimento di preparazione secondo la presente invenzione avviene con la tecnica di essiccazione a spruzzo (spray drying) utilizzando un essiccatore a spruzzo (spray dryer).

La Richiedente ha osservato che l'essiccazione a spruzzo permette di ottenere una polvere secca con particelle uniformi e sostanzialmente amorfe.

In particolare, la Richiedente ha osservato che il procedimento di essiccazione a spruzzo consente di ottenere polveri costituite da particelle di dimensioni molto fini ed inalabili attraverso un meccanismo di asciugatura di una soluzione opportunamente atomizzata in un ambiente a temperatura d'ingresso ed uscita controllate, che si verifica in pochissimi centesimi di secondo garantendo una sostanziale stabilità della polvere ottenuta dopo il processo.

Il flusso di alimentazione a cui si può operare al fine di ottenere una polvere secca con le caratteristiche desiderate secondo l'invenzione, è dettato dal tipo di essiccatore a spruzzo che si utilizza, ovvero un essiccatore a spruzzo di scala industriale oppure un essiccatore a spruzzo di scala "pilota", oppure ancora un essiccatore a spruzzo di laboratorio.

Vantaggiosamente, la Richiedente ha osservato che in essiccatori a spruzzo di laboratorio la fase (b) di essiccazione a spruzzo fornisce risultati ottimali con un flusso di alimentazione uguale o superiore a 3 g/minuto, mentre su impianti pilota si ottengono risultati ottimali con un flusso di alimentazione uguale o superiore a 10 g/minuto, preferibilmente superiore a 15 g/minuto, ancor più preferibilmente uguale o superiore a 20 g/minuto.

Generalmente, il flusso di alimentazione utilizzato da essiccatori a spruzzo di scala industriale è generalmente compreso tra 150 e 200 g/minuto, ma non

vi sono limiti qualora si utilizzassero essiccatori di dimensioni maggiori.

Vantaggiosamente, la fase (b) di essiccazione a spruzzo viene condotta ad una temperatura d'ingresso (inlet temperature) compresa tra 80° e 200°C, vantaggiosamente tra 90° e 160°C.

Con il termine temperatura d'ingresso secondo la presente invenzione si intende la temperatura che incontra la soluzione all'uscita dell'ugello dell'essiccatore a spruzzo, all'ingresso della camera di essiccamento.

Preferibilmente, la fase (b) di essiccazione a spruzzo viene condotta ad una temperatura di uscita (outlet temperature) compresa tra 40° e 120°C, vantaggiosamente tra 50° e 100°C.

Con il termine temperatura di uscita secondo la presente invenzione, si intende la temperatura del prodotto già essiccato dopo che è uscito dalla camera di essiccamento, prima di entrare nel ciclone separatore.

In un terzo aspetto, la presente invenzione riguarda una composizione farmaceutica sotto forma di polvere secca per somministrazione inalatoria per uso nel trattamento di infezioni da micobatteri, dove detta composizione comprende una glicilciclina, in particolare tigeciclina, in quantità inferiore al 50% in peso rispetto al peso totale della composizione, lattosio in quantità uguale o superiore alla quantità di detta tigeciclina, e facoltativamente leucina.

In particolare, la composizione farmaceutica della presente invenzione trova applicazione nel trattamento di infezioni da *Mycobacterium tuberculosis* e da micobatteri non tubercolari (NTM), preferibilmente scelti nel gruppo che consiste di NTM a lenta crescita (SGM) e NTM a rapida crescita (RGM).

In particolare, i micobatteri non tubercolari a lenta crescita (SGM) sono scelti nel gruppo che consiste di *Mycobacterium avium complex* (MAC), *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium kansasii*.

Vantaggiosamente, i micobatteri non tubercolari a rapida crescita (RGM) sono scelti nel gruppo che consiste di *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus sensu stricto*, *Mycobacterium massiliense*, *Mycobacterium bolletii*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium abscessus complex*.

La presente invenzione sarà illustrata ulteriormente di seguito per mezzo di un certo numero di esempi preparativi, che sono forniti a scopi puramente indicativi e senza alcuna limitazione della presente invenzione.

ESEMPIO 1

Preparazione della soluzione da essiccare

Per la preparazione della composizione farmaceutica sotto forma di polvere secca della presente invenzione è stata utilizzata una soluzione acquosa comprendente tigeciclina e gli eccipienti indicati nelle seguenti tabelle tale da avere una concentrazione in solidi compresa fra il 5 ed il 5,5% in peso, il cui valore di pH è stato portato a circa 7,0 con una soluzione acquosa di acido formico al 10%.

La procedura di preparazione della soluzione acquosa di tigeciclina comprende vari passaggi ed accorgimenti, al fine di mantenerne la stabilità chimica durante tutta la fase di essiccamento.

L'acqua utilizzata quale solvente è stata sottoposta a processo di degassamento, allo scopo di eliminare l'ossigeno disciolto, mediante corrente di azoto al flusso di (12l/min per 25 minuti nel caso di 100 ml di soluzione), fino ad ottenere un contenuto di ossigeno inferiore al 10%, misurato mediante una sonda (Oxygen meter Hanna HI98198).

Nell'acqua degassata vengono disciolti gli eccipienti e dopo completa dissoluzione viene aggiunto il principio attivo (Tigeciclina), nella quantità indicata in ciascun esempio, pari ad una concentrazione in solidi compresa fra il 5% ed il 5,5% in peso.

Dopo dissoluzione del principio attivo, la soluzione viene regolata a pH 7,00 mediante aggiunta di acido formico.

La soluzione così ottenute viene mantenuta refrigerata ad una temperatura uguale o inferiore a 5°C, all'interno di un recipiente oscurato al fine di proteggerla dalla luce a cui il principio attivo risulta sensibile.

Preparazione della composizione in polvere

La soluzione così ottenuta è stata processata per mezzo di un apparecchio Spray Dryer ProCepT, impostando i seguenti parametri di processo:

- ugello di diametro 0,6 mm per l'uscita della soluzione
- gas di atomizzazione: aria

- pressione di atomizzazione : 3 bar
- gas di essiccamento: aria
- flusso gas di essiccamento: 0,35 m³/min
- temperatura di ingresso (Temperatura di inlet): 90 °C
- temperatura di uscita (Temperatura di outlet): 45-47°C
- velocità di alimentazione: 3 g/min
- sistema di raccolta della polvere: ciclone separatore

Al termine del processo di essiccamento, subito dopo la produzione, la composizione in polvere è stata confezionata in atmosfera di azoto in contenitori in vetro, a loro volta conservati in sacchetti di alluminio termosaldati.

Le tabelle seguenti illustrano una serie di esempi di confronto e dell'invenzione condotti secondo le specifiche sopra riportate.

La tabella 1 riassume i risultati della determinazione analitica e dell'analisi dimensionale delle particelle ottenute con la composizione indicata nella prima colonna di tabella 1.

TABELLA 1

Composizione %	WC %	X ₉₀ µm	TGC Titolo %	Impurezze %	FPF %
TGC 100%	4,8	3,3	94,7	2,8	91,4
TGC:LEU 50:50	3,3	3,5	95,4	2,3	88,4
TGC:LAT 50:50	5,4	4,8	100,6	0,9	73,6
TGC:ALB 50:50	5,8	4,2	96,9	2,2	80,1
TGC:LAT:LEU 33:33:33	4,0	4,0	99,4	1,2	75,8
TGC:ALB:LEU 33:33:33	4,3	5,0	98,7	1,8	69,5
TGC:LAT:ALB 33:33:33	5,3	7,0	100,9	1,0	58,6

TGC : Tigeciclina

LEU : Leucina

LAT : Lattosio

ALB : Albumina

WC : Contenuto di acqua

X₉₀ : Diametro al di sotto del quale sta il 90% delle particelle

FPF : Frazione di particelle fini inferiori a 5µm

I risultati riassunti nella tabella 1 relativi alla determinazione analitica della tigeclina e delle impurezze presenti nella polvere risultante hanno dimostrato che la presenza di lattosio è necessaria per la stabilità della tigeclina, mentre la presenza di leucina o albumina da sole non è sufficiente a stabilizzare la tigeclina, con conseguente formazione di impurezze.

Al contempo, i risultati riassunti nella tabella 1 relativi al contenuto di acqua hanno dimostrato che la presenza di leucina permette di ottenere una polvere più secca con un minor contenuto di acqua, inferiore al 5% e anche uguale o inferiore al 4%.

Al contrario, i risultati riassunti nella tabella 1 hanno dimostrato che la presenza di albumina, anche in combinazione con lattosio, non permetteva di ottenere il contenuto di acqua ed il valore di X₉₀ desiderati, fornendo i valori più bassi di FPF%.

Infine, i risultati dell'analisi dimensionale delle particelle insieme alla loro aerodinamicità, (X₉₀ e FPF%) hanno dimostrato che tutte le combinazioni, ad eccezione della combinazione ternaria TGC:LAT:ALB fornivano buoni risultati.

La tabella 2 riassume i risultati della determinazione analitica e dell'analisi dimensionale delle medesime particelle dopo conservazione a temperatura ambiente (25°C e 60% RH) per 9 mesi e a 4°C per 15 mesi.

TABELLA 2

Composizione	9 mesi, temperatura ambiente				15 mesi, 4°C			
	WC %	X ₉₀ µm	TGC %	Impurezze %	WC %	X ₉₀ µm	TGC %	Impurezze %
TGC 100%	6,4	3,2	81,9	18,1	5,1	3,1	-	-
TGC:LEU 1:1	4,3	3,8	84,4	15,6	3,9	3,5	-	-
TGC:LAT 1:1	7,0	4,6	95,9	4,1	5,7	4,6	98,3	1,7

TGC:ALB 1:1	7,0	4,1	-	-	6,4	4,0	-	-
TGC:LAT:LEU 1:1:1	5,3	4,1	95,9	4,1	4,3	4,0	98,2	1,8
TGC:ALB:LEU 1:1:1	5,4	5,3	-	-	4,7	5,0	-	-
TGC:LAT:ALB 1:1:1	6,8	6,6	-	-	6,0	6,3	-	-

TGC : Tigeciclina

LEU : Leucina

LAT : Lattosio

ALB : Albumina

I risultati della Tabella 2 hanno confermato la stabilità a lungo termine delle composizioni comprendenti lattosio, dopo conservazione a 4°C o a temperatura ambiente.

La tabella 3 riassume i risultati della determinazione analitica delle particelle ottenute con la composizione indicata nella prima colonna di tabella 1 dopo conservazione in massa (in bulk) o in capsula per 1 o 3 mesi a varie condizioni di temperatura e umidità relativa.

TABELLA 3

	Bulk		Standard capsule		Capsule anidre	
Composizione	40°C 75% RH 1 mese	30°C 65% RH 1 mese	25°C 60% RH		25°C 60% RH	
			1 mese	3 mesi	1 mese	3 mesi
TGC:LAT 1:2	KO	OK	OK	KO	OK	OK
TGC:LAT 1:1,5	KO	OK	OK	KO	OK	OK
TGC:LAT 1:1	KO	OK	OK	KO	OK	OK
TGC:LAT 2:1	KO	KO	KO	-	KO	-
TGC:LAT 3:1	KO	KO	KO	-	KO	-
TGC:LAT 4:1	KO	KO	KO	-	KO	-

TGC : Tigeciclina

LEU : Leucina

LAT : Lattosio

RH : Umidità relativa

KO : Prova non superata, formazione di impurezze maggiori del 5%

OK : Prova superata, prodotto stabile

I risultati della Tabella 3 hanno evidenziato la necessità di avere una quantità di lattosio uguale o superiore alla quantità di tigeclina, con un rapporto in peso tra la quantità di tigeclina e la quantità di lattosio compreso tra 1:1 e 1:2.

La tabella 4 riassume i risultati della determinazione analitica delle particelle ottenute con la composizione indicata nella prima colonna di tabella 1 dopo conservazione in massa (in bulk) o in capsule essiccate dopo riempimento in atmosfera di azoto, per 1 mese a varie condizioni di temperatura e umidità relativa.

TABELLA 4

		40°C 75% RH		30°C 65% RH	
Composizione %	TGC:LAT	Bulk	Capsule	Bulk	Capsule
TGC:LAT:LEU 50:40:10	1:0,8	KO	OK	OK	OK
TGC:LAT:LEU 40:40:20	1:1	KO	OK	OK	OK
TGC:LAT:LEU 30:45:25	1:1,5	KO	OK	OK	OK
TGC:LAT:LEU 30:60:10	1:2	KO	OK	OK	OK
TGC:LAT:LEU 25:50:25	1:2	KO	OK	OK	OK

TGC : Tigeciclina

LEU : Leucina

LAT : Lattosio

RH : Umidità relativa

KO : Prova non superata, formazione di impurezze maggiori del 5%

OK : Prova superata, prodotto stabile

I risultati della Tabella 4 hanno confermato l'utilità della leucina nel migliorare la stabilità a lungo termine della polvere, che riesce in tal modo a superare la prova a 30° e 65% di umidità relativa ed anche la più severa prova a 40°C e 75% di umidità relativa in capsule essiccate dopo riempimento in atmosfera di azoto.

Anche in questo caso i risultati migliori si ottengono con un rapporto tigeiciclina : lattosio compreso tra 1:1 e 1:2, e si è osservato dai risultati dell'analisi dimensionale (X_{90} e FPF%) che la quantità ottimale di tigeiciclina risultava essere non superiore al 30% in peso.

La seguente tabella 5 riassume i risultati della determinazione analitica e dell'analisi dimensionale di due formulazioni ternarie comprendenti il 30% in peso di tigeiciclina e quantità ottimali di lattosio e leucina secondo la presente invenzione.

La formulazione 1 comprendeva TGC:LAT:LEU in rapporto percentuale pari a 30:45:25 con un rapporto tigeiciclina : lattosio di 1:1,5 mentre la formulazione 2 comprendeva TGC:LAT:LEU in rapporto percentuale pari a 30:60:10 con un rapporto tigeiciclina : lattosio di 1:2.

TABELLA 5

		Formulazione 1	Formulazione 2
TGC:LAT:LEU %		30:45:25	30:60:10
TGC:LAT		1:1,5	1:2
BULK WC %		4,4	4,7
CPS WC %		2,6	2,0
TGC %		101,7	99,7
Impurezze %		1,1	0,9
PSD	X_{50}	2,5	2,2
	X_{90}	5,0	4,3
	VMD	2,7	2,4
PA	FPF	62,1	73,7

	MMAD	3,7	2,6
	GSD	1,77	1,83

TGC : Tigeciclina

LEU : Leucina

LAT : Lattosio

BULK WC % : Contenuto di acqua in massa

CPS WC % : Contenuto di acqua in capsule

PSD : Distribuzione dimensionale delle particelle

VMD : Diametro Mediano Volumetrico

PA : Parametri Aerodinamici

FPF : Frazione di particelle fini

MMAD : Diametro mediano aerodinamico

GSD : Deviazione Standard Geometrica

I dati della tabella 5 hanno confermato i risultati ottimali ottenuti con entrambe le composizioni 1 e 2, sia dal punto di vista della respirabilità, con valori ottimali di PSD e PA, sia dal punto di vista della stabilità, con valori ottimali di tigeciclina e minime quantità di impurezze.

La figura 3 illustra una foto al microscopio elettronico di un campione della formulazione 1 (3A) e della formulazione 2 (3B).

ESEMPIO 2

Descrizione dei metodi analitici impiegati

I valori riportati nelle tabelle precedenti sono stati determinati con i seguenti metodi.

Caratterizzazione della composizione in polvere

1. Analisi dimensionale

Le composizioni in polvere ottenute sono state caratterizzate in termini di dimensioni delle particelle a secco utilizzando un apparecchio Laser Diffraction Sympatec HELOS/BR, in grado di analizzare le dimensioni delle particelle, equipaggiato con sistema di dispersione RODOS/L per l'analisi di polveri, associato al sistema ASPIROS/L per il caricamento automatico del campione.

Lo strumento è stato calibrato con materiale di riferimento e preparato seguendo le istruzioni fornite nel manuale d'uso dello strumento.

Procedura di analisi:

Il prodotto è stato campionato in apposito portacampione (vial) per Aspiros e analizzato.

Il gas di dispersione utilizzato è stata aria compressa opportunamente depurata di particelle.

La modalità con cui è stata effettuata l'analisi di Particle Size Distribution è stata la seguente:

- Strumento di analisi: Laser Light Diffraction Particle Sizer Sympatec HELOS/BR
- Lente: R1 (0,1-35 μm)
- Sistema di dispersione del campione: RODOS/L
- Sistema di alimentazione del campione: ASPIROS/L
- Pressione di dispersione: 3 bar, con auto-adjustment della depressione
- Tempo di integrazione del segnale: 10,0 s
- Durata della misura di reference: 10,0 s
- Misurazione valida nel range di concentrazione del canale 20 da 1,5% a 50%
- Versione del software: PAQXSOS 3.1.1
- Modalità di calcolo: FREE

Tutte le analisi sono state condotte in ambiente a temperatura e umidità ambiente.

L'analisi dimensionale restituisce i valori di diametro al di sotto del quale si colloca rispettivamente il 50% della popolazione (X_{50}), il 90% della popolazione (X_{90}) e il diametro medio volumetrico (VMD - Volume Mean diameter) della popolazione di particelle nel campione di composizione in polvere.

2. Determinazione del principio attivo e degli altri componenti nella composizione in polvere

Per la determinazione del contenuto in principio attivo e degli altri componenti nella composizione in polvere è stata impiegata una metodica analitica HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Il metodo analitico impiegato è caratterizzato dai seguenti parametri:

Solvente: 80/20 tampone fosfato pH 8/acetonitrile

Fase mobile: acetonitrile/tampone fosfato pH 6,4

Eluizione a gradiente

Tempo (min)	% Acetonitrile	% tampone pH 6,4
0	11,8	88,2
2	11,8	88,2
42	24,4	75,6
57	50	50
60	50	50
+ 10 min post time		

Flusso: 1 ml/min

Volume d'iniezione: 25 µl

Colonna per analisi: Agilent Pursuit XRs C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm

Temperatura della colonna: 30°C

Temperatura dell'autocampionatore: 5°C

Lunghezza d'onda: 248 nm

Tempo di ritenzione: 20 min

Per le analisi è stato impiegato un HPLC Agilent modello 1200 con rivelatore tipo diode array, modello G1315C.

I campioni per le analisi del contenuto in principio attivo sono stati ottenuti disciogliendo nel solvente una quantità di composizione in polvere tale da ottenere una concentrazione tra 500 µg/ml e 600 µg/ml per tigeclina, come da soluzione di riferimento.

I campioni per l'analisi del contenuto in principio attivo sono stati utilizzati anche per l'analisi delle impurezze.

La soluzione di riferimento è iniettata tre volte consecutive prima del campione per determinare la precisione del sistema, espressa come

deviazione standard relativa percentuale (RSD%) che deve essere inferiore al 2%.

Il contenuto del principio attivo è ottenuto per rapporto dell'area rispetto all'area del picco di tigeclina nella soluzione di riferimento a concentrazione nota. La degradazione del prodotto è calcolata come rapporto tra la somma delle aree dei picchi analitici corrispondenti ai prodotti di degradazione, corrette per ciascun fattore di risposta e l'area totale (attivo + impurezze) nel campione. Sono conteggiati all'interno della somma dei prodotti di degradazione tutti i picchi analitici la cui area è risultata superiore a 0,1% rispetto all'area totale.

3. Test di respirabilità con NGI (Next Generation Impactor)

Il Next Generation Impactor (NGI) è un impattatore per polveri, descritto in farmacopea (EP; USP), impiegato per la misura del diametro aerodinamico di particelle di polvere disperse in aria sotto forma di aerosol.

Una formulazione inalatoria, erogata da opportuno inalatore e convogliata nell'apparecchio per aspirazione, si deposita nei vari stadi (stages) dell'impattatore, posti in serie, in funzione delle sue caratteristiche aerodinamiche, che dipendono dalle dimensioni delle particelle, densità e forma. Ad ogni stadio dell'NGI corrisponde un intervallo di dimensioni particellari aerodinamiche della polvere in esso depositata, determinata mediante analisi quantitativa per UV del principio attivo presente.

Attraverso la determinazione quantitativa di principio attivo in ogni stadio si ottiene la distribuzione dimensionale aerodinamica della polvere e si può calcolare il diametro medio aerodinamico e la frazione respirabile, definita dalla Farmacopea Europea come la frazione avente diametro aerodinamico inferiore a 5,0 μm .

Per il test di respirabilità le polveri delle formulazioni degli esempi sono state ripartite in capsule di HPMC size 3 ed erogate attraverso un inalatore per polveri RS01 – modello 7 monodose, cod. 239700001AB (Aerolizer - Plastiapè S.p.A.).

L'apparecchio è stato assemblato secondo le istruzioni d'uso e le indicazioni della Farmacopea Europea.

Dal punto di vista analitico, per l'esecuzione del test, è sufficiente l'erogazione di una singola capsula di polvere per ogni test di respirabilità. I

test sono stati condotti ad un flusso di 60 Lpm per 4 secondi derivato da una caduta di pressione nel sistema di 1,4 KPa.

A tale valore di flusso per ogni stadio dell'NGI corrispondono i seguenti cut-off di diametro aerodinamico.

- stadio 1: > 8,06 μm
- stadio 2: tra 8,06 μm e 4,46 μm
- stadio 3: tra 4,46 μm e 2,82 μm
- stadio 4: tra 2,82 μm e 1,66 μm
- stadio 5: tra 1,66 μm e 0,94 μm
- stadio 6: tra 0,94 μm e 0,55 μm
- stadio 7: tra 0,55 μm e 0,34 μm
- stadio 8 (MOC): < 0,34 μm

La frazione respirabile (Fine Particle Fraction) è la quantità di farmaco, calcolata rispetto alla dose erogata, caratterizzata da particelle aventi diametro aerodinamico medio inferiore a 5,0 μm ed è calcolata mediante un apposito software convalidato (CITDAS Copley).

I parametri aerodinamici di una formulazione inalatoria sottoposta ad analisi NGI, vengono espressi in termini di:

- Delivered Fraction (DF): ovvero la percentuale della dose di principio attivo erogata fuori dal boccaglio dell'inalatore, rispetto alla dose caricata.
- Fine Particle Dose (FPD): dose teoricamente respirabile di principio attivo, caratterizzata da diametro aerodinamico inferiore a 5,0 μm .
- Fine Particle Fraction (FPF): frazione teoricamente respirabile (diametro aerodinamico inferiore a 5,0 μm) di principio attivo espressa come percentuale della quantità erogata.
- Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD): diametro mediano aerodinamico delle particelle erogate.
- Geometric Standard Deviation (GSD): Deviazione Standard Geometrica rispetto al diametro medio aerodinamico.

La determinazione quantitativa di principio attivo in ogni stadio è stata

effettuata mediante spettrofotometria UV impiegando la metodica analitica qui di seguito descritta:

Solvente: 80/20 tampone fosfato pH 8/acetonitrile

Cuvette per analisi: plastica, usa e getta, con cammino ottico di 10 mm

Lunghezza d'onda: 411 nm

Per le analisi è stato impiegato uno spettrofotometro Agilent modello Cary 3500 multicell.

I campioni per le analisi del contenuto in principio attivo, derivanti dal test NGI, sono stati ottenuti impiegando volumi di solvente tali da ottenere un range di concentrazione tra 0,4 µg/ml e 60 µg/ml per tigeciclina, con una soluzione di riferimento avente una concentrazione di tigeciclina di circa 25 µg/ml.

Il contenuto del principio attivo è ottenuto per rapporto dell'assorbanza rispetto all'assorbanza del picco di tigeciclina nella soluzione di riferimento a concentrazione nota.

ESEMPIO 3

Caratterizzazione della polvere: determinazione dello stato solido per diffrazione a raggi X

Misura di diffrazione ai raggi X

Per la determinazione dello stato solido della polvere sono state condotte misure di diffrazione ai raggi X.

I cristalli diffrangono i raggi X in modo caratteristico della loro struttura. Per questo la tecnica di diffrazione ai raggi X permette di determinare lo stato solido cristallino o amorfo dei componenti del campione.

Lo strumento utilizzato è il D2-Phaser di Bruker AXS con sensore LYNXEYE, software di misurazione DIFFRAC.MEASUREMENT CENTER.V7.

I campioni di polvere sono stati disposti in strato uniforme su portacampioni in silicio con diametro 20 mm e spessore 0,5 mm.

Il metodo di analisi scelto impiega la seguente conformazione dello strumento:

- Sorgente: rame
- Divergence Slit: 0,2 mm

- Soller Slit: 4°
- Knife: 1 mm

I parametri di scansione sono stati i seguenti:

- Range di angolo: 3-50° 2Theta
- Lunghezza del passo tra le misure: 0,02°
- Tempo di sosta ad ogni angolo: 1s
- Apertura del detector: 4 mm
- Rotazione del campione: 15 rpm

La figura 2 illustra il diffrattogramma ottenuto con una polvere comprendente tigeciclina e lattosio in rapporto 1:1 (curva A) e con una polvere comprendente tigeciclina, lattosio e leucina in rapporto 1:1:1 (curva B).

Come facilmente osservabile, la curva A non mostra alcuna picco di natura cristallina, risultando la polvere sostanzialmente in forma amorfa. La curva B mostra due picchi riconducibili alla leucina che rivela un suo allineamento con tendenza alla cristallizzazione.

ESEMPIO 4

Valutazione dell'attività anti-micobatterica

La prova è stata condotta per valutare l'attività citotossica e l'attività anti-micobatterica contro i micobatteri non tubercolari (NTM) (*Mycobacterium abscessus*) nella linea cellulare di macrofagi THP-1 della formulazione 2 dell'esempio 1 costituita da tigeciclina/lattosio/L-leucina (30/60/10 w/w/w) rispetto al principio attivo puro tigeciclina.

Terreno DMEM completo utilizzato per la composizione dei macrofagi

Modifica del mezzo Dulbecco Eagle (Cellgro 15-017-cv) integrato con:

Siero fetale di vitello inattivato al calore (Atlas Biologicals, Fort Collins, CO, F-0500-A) (10%)

LCM (10%)

Terreno condizionato da L929: le cellule L-929 (CCL-1) (ATCC) secernono il fattore stimolante le colonie di macrofagi (M-CSF), la citochina che differenzia i progenitori dei macrofagi/monociti del midollo osseo in una popolazione omogenea di macrofagi maturi. Sono seminati a $4,7 \times 10^5$ cellule

in 55 ml di DMEM + 10% di siero fetale di vitello in un pallone da 75 cm². Le cellule vengono lasciate crescere per 3 giorni e quindi il surnatante viene raccolto e filtrato attraverso un filtro da 0,45 µm, aliquotato e congelato a -20°C.

Il filtrato privo di cellule viene utilizzato nei mezzi DMEM.

L-glutamina (Sigma G-7513) (2 mM)

Tampone HEPES (Sigma H-0887) (10 mM) Antibiotico/antimicotico (Sigma A-9909) (1X)

MEM amminoacidi non essenziali (Sigma M-7145) (1X)

2-mercaptoetanololo (Sigma M-6250) (50 nM)

Preparazione e coltura della linea cellulare di macrofagi THP-1

Le cellule THP-1 sono state espanse per 2 settimane. Successivamente, le cellule THP-1 sono state sospese in un mezzo DMEM completo (per i macrofagi a una concentrazione di 5×10^5 cellule/mL. Le cellule sono state seminate in piastre di coltura tissutale da 24 pozzetti, 2 mL per pozzetto (1×10^6 per pozzetto).

La piastra di cellule da 24 pozzetti consente di testare in triplicato un intervallo di 7 concentrazioni di farmaco più controlli non trattati. Le cellule sono state incubate a 37°C con 5% di CO₂ in una camera umidificata.

I terreni completi privi di antibiotici/antimicotici DMEM non sono stati modificati durante il test di 3 giorni.

Infezione e trattamento dei macrofagi THP-1

Il giorno 0, i terreni sono stati rimossi dalle cellule e sostituiti con 0,2 mL di DMEM privo di antibiotico/antimicotico contenente *Mycobacterium abscessus* con rapporto di 10 batteri per macrofago.

Le piastre di coltura tissutale sono state poste all'interno di buste Ziploc chiuse e sono state trasportate nell'incubatrice. Una volta all'interno dell'incubatrice, i sacchetti sono stati aperti. Le cellule sono state incubate con i batteri per 2 ore.

Dopo l'infezione, i batteri extracellulari sono stati rimossi, lavando ogni pozzetto una volta con PBS. Quindi sono stati aggiunti 2 mL di terreno DMEM completo privo di antibiotici/antimicotici e varie concentrazioni di farmaco.

Per preparare le concentrazioni del farmaco, sono state eseguite diluizioni seriali di 2 volte aggiungendo 10 ml della sospensione precedente a 10 ml di terreno completo più siero nella provetta successiva, ottenendo un intervallo di test di 0,25, 1, 4 e 16x MIC.

Ogni concentrazione di farmaco è stata testata in triplicato. Le piastre di coltura sono state incubate con antibiotici a 37°C + 5% CO₂ per 3 giorni.

Dopo 3 giorni, le cellule sono state trattate con gentamicina per 2 ore per uccidere i batteri extracellulari e poi lavate 3 volte con i media. La placcatura dei lisati cellulari infettati ed esposti alla formulazione 2 e alla tigeciclina materia prima e la valutazione della vitalità cellulare per le cellule THP-1 sono state eseguite dopo 4 ore, 1 giorno e 2 giorni.

I risultati sono riassunti nelle seguenti tabelle 6 e 7.

TABELLA 6

Risultati con tigeciclina pura

Tigeciclina pura µg/ml	Giorno 1 CFU	Giorno 2 CFU	Giorno 3 CFU
0	217	1233	13.333
1	287	2067	2667
2	263	203	1743
4	427	123	267
8	303	203	220
16	333	203	153
24	287	90	143

TABELLA 7

Risultati con formulazione 1

Formulazione 1 µg/ml	Tigeciclina µg/ml	Giorno 1 CFU	Giorno 2 CFU	Giorno 3 CFU
0	0	217	1233	13.333
1	0,3	123	203	3300

2	0,6	170	163	2600
4	1,2	177	160	2000
8	2,4	163	183	517
16	4,8	193	147	497
24	7,2	163	183	160

La prova ha dimostrato una rilevante perfusione di tigeciclina all'interno dei macrofagi infetti sia da parte del principio attivo puro che della formulazione 1.

Il confronto tra l'efficacia della formulazione 1 rispetto al principio attivo puro ha evidenziato una sostanziale equivalenza di comportamento tra i due preparati tenendo conto che la quantità di tigeciclina nella formulazione 1 è pari al 30% del totale.

Nel caso della formulazione 1 la concentrazione massima di tigeciclina utilizzata è stata pari a 7,2 µg/ml ben al di sotto di quanto valutato con tigeciclina pura.

Ciononostante la riduzione delle CFU di *Mycobacterium abscessus* è evidente anche a concentrazioni basse di tigeciclina dimostrando pertanto velocità di dissoluzione paragonabili tra formulazione 1 e principio attivo e soprattutto stabilità della tigeciclina dopo preparazione per essiccazione a spruzzo.

Il test di citotossicità eseguito preliminarmente con la formulazione 1 non ha mostrato alcuna tossicità. I macrofagi esposti alla formulazione 1 hanno mantenuto la vitalità del 95% dopo esposizione.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica sotto forma di polvere secca per somministrazione inalatoria comprendente una glicilciclina, in particolare tigeiciclina, in quantità inferiore al 50% in peso rispetto al peso totale di detta composizione, e lattosio in quantità uguale o superiore alla quantità di detta glicilciclina.

2. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, dove il rapporto in peso tra la quantità di glicilciclina e la quantità di lattosio è compreso tra 1:1 e 1:3, preferibilmente tra 1:1 e 1:2.

3. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, dove detta composizione comprende leucina.

4. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 3, dove detta composizione comprende detta leucina in quantità dal 5% al 30%, preferibilmente dal 10% al 25% in peso rispetto al peso totale di detta composizione.

5. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detta polvere presenta un X_{90} inferiore a 10,0 μm , preferibilmente inferiore a 7,0 μm , più preferibilmente inferiore a 5,0 μm .

6. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detta polvere presenta un MMAD inferiore a 5 μm , preferibilmente da 2 μm a 4 μm .

7. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detta polvere presenta una frazione respirabile (FPF) superiore al 50%, preferibilmente superiore al 60%, più preferibilmente superiore al 70%.

8. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, dove detta composizione comprende detta glicilciclina in quantità dal 15% al 45%, preferibilmente dal 20% al 40%, più preferibilmente dal 25% al 35% in peso rispetto al peso totale di detta composizione.

9. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, dove detta composizione comprende detto lattosio in quantità dal 30% al 85%, preferibilmente dal 35% al 80%, più preferibilmente dal 40% al 75% in peso rispetto al peso totale di detta composizione.

10. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui detta glicilciclina è presente nello stato solido amorfo in quantità compresa dal 90 al 100% rispetto al quantitativo totale della stessa in detta composizione.

11. Procedimento per preparare una composizione farmaceutica sotto forma di polvere secca per somministrazione inalatoria comprendente una glicilciclina, in particolare tigeciclina, dove detto procedimento comprende le seguenti fasi:

- (a) preparare una soluzione in solvente acquoso comprendente una glicilciclina, in particolare tigeciclina, lattosio, e facoltativamente leucina,
- (b) essiccare la soluzione della fase (a) per ottenere una polvere secca avente X_{90} inferiore a 10 μm , e
- (c) raccogliere detta polvere secca,

caratterizzata dal fatto che detta soluzione comprende inoltre un acido organico od inorganico in quantità necessaria ad impartire a detta soluzione un valore di pH compreso tra 6,5 e 7,5.

12. Procedimento secondo la rivendicazione 11, dove detta fase (b) viene effettuate mediante un essiccatore a spruzzo.

13. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 12, dove detto acido organico o inorganico è scelto nel gruppo che consiste di acido formico, acido acetico, acido propionico, acido butirrico, acido cloridrico, acido bromidrico, acido nitrico e acido fosforico, preferibilmente acido formico e acido fosforico.

14. Composizione farmaceutica sotto forma di polvere secca per somministrazione inalatoria per uso nel trattamento di infezioni da micobatteri, dove detta composizione comprende una glicilciclina, in particolare tigeciclina, in quantità inferiore al 50% in peso rispetto al peso totale di detta composizione, lattosio in quantità uguale o superiore alla quantità di detta glicilciclina, e facoltativamente leucina.

15. Composizione farmaceutica per uso secondo la rivendicazione 14, dove detti micobatteri sono micobatteri non tubercolari (NTM), preferibilmente scelti nel gruppo che consiste di NTM a lenta crescita (SGM) e NTM a rapida crescita (RGM).

Fig. 1

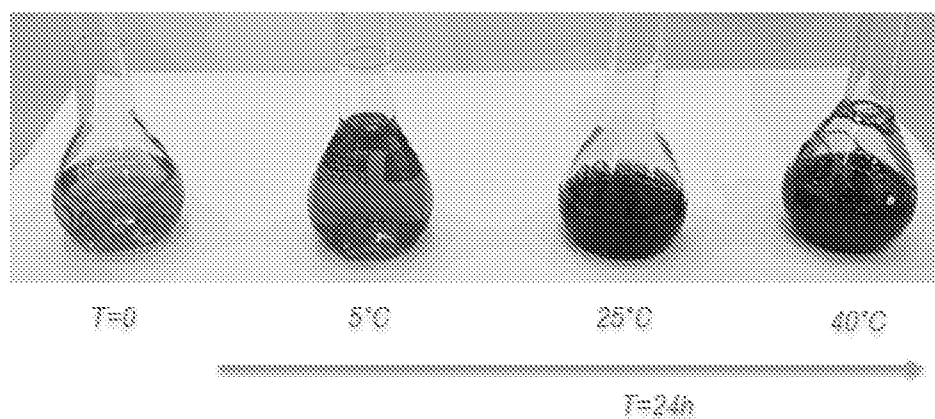


Fig. 2

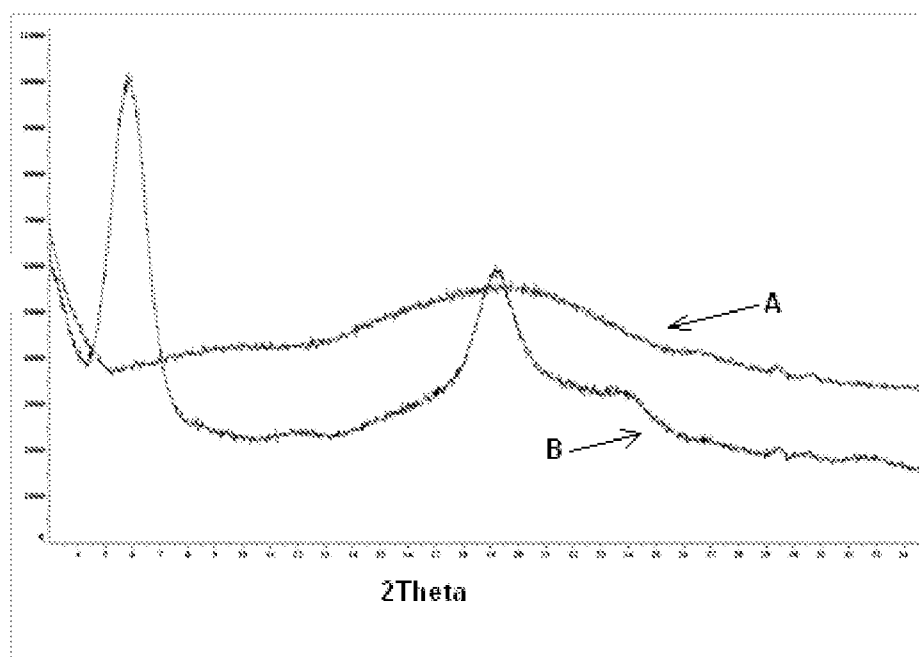
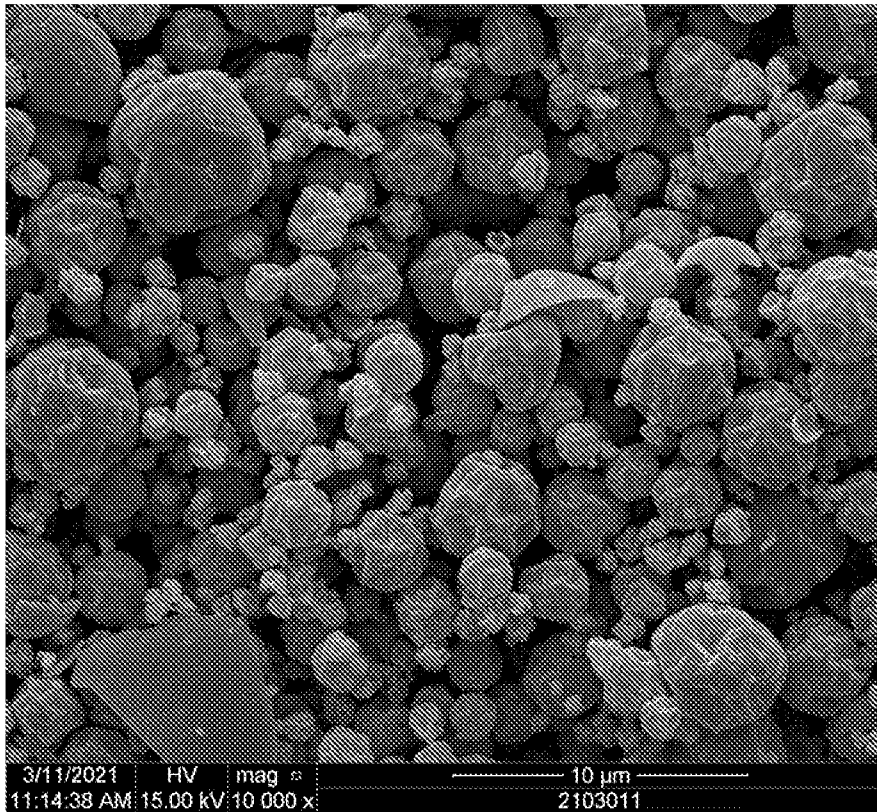
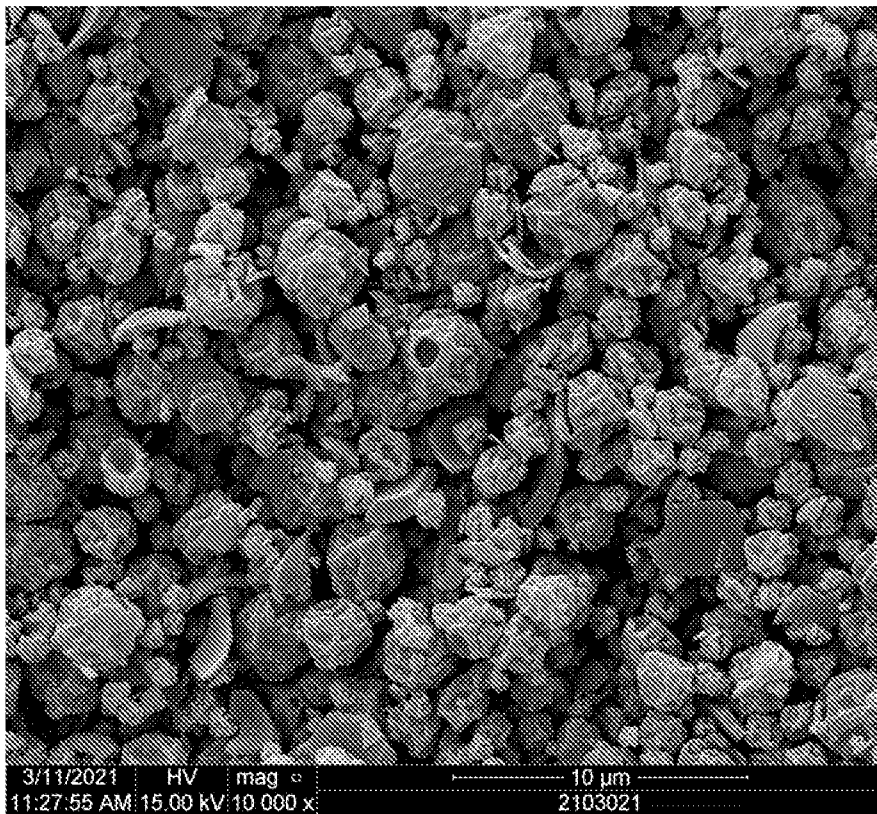


Fig. 3



(A)



(B)