

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 875 584**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/12** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61K 31/495** (2006.01)  
**A61P 11/02** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 11/06** (2006.01)  
**A61P 17/06** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2015** **E 19152629 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.05.2021** **EP 3494962**

54 Título: **Formulación para inhalación líquida que comprende RPL554**

30 Prioridad:

**15.09.2014 GB 201416274**  
**19.03.2015 GB 201504662**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.11.2021**

73 Titular/es:

**VERONA PHARMA PLC (100.0%)**  
**One Central Square**  
**Cardiff CF10 1FS, GB**

72 Inventor/es:

**SPARGO, PETER LIONEL;**  
**FRENCH, EDWARD JAMES y**  
**HAYWOOD, PHILLIP A**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 875 584 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Formulación para inhalación líquida que comprende RPL554

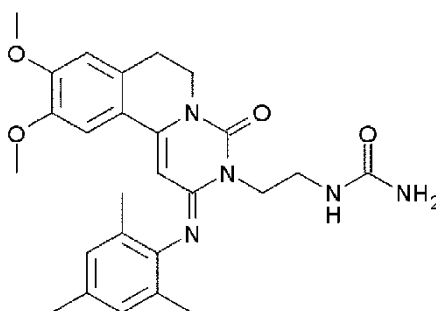
5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que comprende un fármaco respiratorio.

10 **Antecedentes de la invención**

Las propiedades toxicocinéticas de las composiciones farmacéuticas líquidas son impredecibles. Es importante que un principio activo (PA) sea correctamente formulado de manera que se proporcione una dosificación segura, eficaz y controlada cuando la composición se administra a un paciente. Esto es particularmente el caso para composiciones inhaladas. Además, las composiciones farmacéuticas líquidas deben tener estabilidad fiable a largo plazo para garantizar que el perfil de dosificación de la composición se mantenga después del almacenamiento. Esto evita la administración de dosificaciones incorrectas. Las composiciones farmacéuticas también deben formularse de tal forma que la administración no sea desagradable para un paciente, por ejemplo en lo que respecta al sabor y acidez.

RPL554 (9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoyl-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirrido[6,1-a]isoquinolin-4-ona) es un inhibidor dual PDE3/PDE4 y se describe en el documento WO 00/58308 (y también se denomina algunas veces RPL554). Como inhibidor PDE3/PDE4 combinado, RPL554 tiene tanto actividad antiinflamatoria y broncodilatadora y es útil en el tratamiento de trastornos respiratorios tales como asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La estructura de RPL554 se muestra a continuación.



Es frecuentemente preferible administrar RPL554 por inhalación debido a su eficacia en el tratamiento de trastornos respiratorios. Un método de administración eficaz es la nebulización. Franciosi et al. desvelan una solución de RPL554 en un tampón citrato-fosfato (Efficacy and safety of RPL554, a dual PDE3 and PDE4 inhibitor, in healthy volunteers and in patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease: findings from four clinical trials, The Lancet: Respiratory Medicine 11/2013; 1(9):714-27. DOI: 10.1016/S2213-2600(13)70187-5).

Calzetta et al., J Pharmacol Exp Ther 346: 414-423, 2013 describen el efecto del inhibidor mixto de PDE 3/4 RPL554 sobre el tono del músculo liso bronquial humano aislado. Compton et al., Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 26 (2013) 562-573, describe los tratamientos para EPOC.

35 **Sumario de la invención**

Es un hallazgo sorprendente de la presente invención que la composición óptima para inhalación que comprende RPL554 es una composición farmacéutica líquida que comprende una suspensión de partículas de RPL554. Se ha encontrado que las suspensiones de RPL554 tienen propiedades altamente deseables para un ámbito clínico. Se han encontrado varios beneficios que se asocian a una composición farmacéutica líquida que comprende un diluyente y una suspensión de partículas de RPL554 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

La composición farmacéutica líquida de la invención tiene propiedades enormemente mejoradas con respecto a las formulaciones previas, por ejemplo, cuando se compara con una formulación en solución de RPL554. Con respecto a las propiedades toxicocinéticas, se ha encontrado que la formulación en suspensión tiene características de liberación retardada en comparación con las de una solución. Esto puede reducir el número de tratamientos que deben administrarse a un paciente. También se ha encontrado que la suspensión permite administrar una dosificación mucho mayor de RPL554, como puede apreciarse de los valores de  $C_{máx}$  y ABC en plasma. Esto también puede reducir la frecuencia de administraciones requerida.

La composición farmacéutica líquida de la invención también muestra excelente estabilidad, no mostrando las composiciones degradación después de 12 meses a condiciones ambientales (25 °C), no después de 6 meses en condiciones aceleradas (40 °C). Se observa degradación en una composición en solución comparable en las mismas condiciones. Las composiciones pueden no mostrar degradación después de 12 meses en condiciones ambientales

(25 °C/60 % de HR), ni después de 6 meses en condiciones aceleradas (40 °C/75 % de HR).

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica líquida que comprende un diluyente y una suspensión de partículas de 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoyl-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirrido[6,1-a]isoquinolin-4-ona (RPL554) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que las partículas de RPL554 tienen una distribución del tamaño de partícula con un valor de  $Dv_{50}$  (mediana del tamaño de partícula en volumen) de 0,2  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ ; y la composición comprende un tampón fosfato a una concentración de 0 mg/ml a 5 mg/ml.

La invención también proporciona una composición farmacéutica líquida según la invención para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal. Una composición farmacéutica líquida según la invención puede usarse en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección seleccionada de asma, asma alérgica, fiebre del heno, rinitis alérgica, bronquitis, enfisema, bronquiectasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome disneico del adulto (SDA), asma resistente a esteroides, asma grave, asma pediátrico, fibrosis quística, fibrosis de pulmón, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial, trastornos de la piel, dermatitis atópica, psoriasis, inflamación ocular, isquemia cerebral, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias.

Normalmente, dicha enfermedad o afección es asma o EPOC, más normalmente EPOC.

Relacionado con la invención está un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección como se define en el presente documento en un sujeto, método que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una composición farmacéutica líquida de acuerdo con la invención.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1 - La concentración de provocación (PC) de acetilcolina que produjo de forma acumulada un aumento del 50 % en la resistencia total de las vías respiratorias (Acetilcolina RL PC50) en animales tratados con solución salina o formulación en solución de RPL554: momento de tiempo de 2 y 5 h: La acetilcolina RL PC50 se transformó logarítmicamente para los fines del análisis estadístico. La prueba de la t a posteriori de los datos sin transformar mostró diferencias entre grupos frente a solución salina. \*El análisis no paramétrico mostró una diferencia significativa entre 2 h (1 mg/ml de solución de RPL554,  $P = 0,0190$  sin ajustar) y 5 h (2,5 mg/ml de solución,  $P = 0,0095$  sin ajustar) frente al grupo de solución salina. Valores de  $N = 6, 4, 4, 4$  izquierda a derecha. (Nota control de 5 h no representado).

Figura 2 - Acetilcolina RL PC50 en animales tratados con vehículo o la formulación en suspensión de RPL554: momento de tiempo de 2 y 5 h: La acetilcolina RL PC50 se transformó logarítmicamente para los fines del análisis estadístico (panel superior). El análisis no paramétrico mostró una diferencia significativa entre 2 h (10 mg/ml de suspensión de RPL554,  $P = 0,0268$  sin ajustar) frente al grupo de control de vehículo. El reanálisis de los datos combinando los datos del vehículo (2 + 5 h) reveló una broncoprotección significativa global ( $P = 0,0016$ ) que se reflejó por un grado significativo de broncoprotección con 2,5 mg/ml de suspensión de RPL554 (2,52 veces (1-5,72),  $P < 0,05$  y 10 mg/ml de suspensión de RPL554 (4,67 veces (2-11),  $*P < 0,05$ ) frente al vehículo. En el momento de tiempo de 5 h, RPL554 a 10 mg/ml de suspensión causó un grado significativo de broncoprotección (2,77 veces (1,3-6,0),  $*P < 0,05$ ). ( $N = 8, 4, 4, 3, 6$ , izquierda a derecha) (panel inferior).

La Figura 3 muestra las concentraciones medias de RPL554 en plasma de voluntarios humanos sanos tras la administración de o bien (i) la formulación en suspensión o (ii) la formulación en solución por nebulizador a un nivel de dosis nominal de aproximadamente 1,5 mg.

#### Descripción detallada de la invención

Normalmente, las partículas de RPL554 son partículas micronizadas.

Las partículas tienen una distribución del tamaño de partícula con un valor de  $Dv_{50}$  de 0,2  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ . Normalmente, las partículas de RPL554 tienen una distribución del tamaño de partícula con un valor de  $Dv_{50}$  de aproximadamente 0,7  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 3,0  $\mu\text{m}$ . Por ejemplo, las partículas de RPL554 pueden tener una distribución del tamaño de partícula con un valor de  $Dv_{50}$  de 0,9  $\mu\text{m}$  a 1,7  $\mu\text{m}$ , o alternativamente de 1,7  $\mu\text{m}$  a 2,7  $\mu\text{m}$ . Frecuentemente, las partículas de RPL554 tienen una distribución del tamaño de partícula con un valor de  $Dv_{50}$  de aproximadamente 1,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2,6  $\mu\text{m}$ .

El valor de  $Dv_{50}$  es la mediana del tamaño de partícula para una distribución de volumen. Así, la mitad del volumen de las partículas está comprendido en partículas que tienen diámetros inferiores al valor de  $Dv_{50}$  y la mitad del volumen de las partículas está comprendido en partículas que tienen diámetros superiores al valor de  $Dv_{50}$ . Esto es un modo muy conocido en el que describir distribuciones del tamaño de partícula.

Las partículas normalmente tienen una distribución del tamaño de partícula con un valor de  $Dv_{10}$  de aproximadamente 0,4  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$ . Las partículas normalmente tienen una distribución del tamaño de partícula con

un valor de  $Dv_{90}$  de aproximadamente 2,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 4,0  $\mu\text{m}$ . El valor de  $Dv_{10}$  refleja el diámetro de partícula donde el 10 % del volumen de la muestra está en partículas que tienen un diámetro de partícula inferior al valor de  $Dv_{10}$ . El valor de  $Dv_{90}$  refleja el diámetro de partícula donde el 90 % del volumen de la muestra está en partículas que tienen un diámetro de partícula inferior al valor de  $Dv_{90}$ .

La técnica usada para medir el valor de  $Dv_{50}$  normalmente es la difracción láser. Por ejemplo, las partículas de RPL554 normalmente tienen una distribución del tamaño de partícula con un valor de  $Dv_{50}$  de 0,2  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$  como se mide por difracción láser. El análisis de la distribución del tamaño de partícula puede realizarse por difracción láser usando Malvern Spraytec conjuntamente con una celda de dispersión en húmedo. Normalmente, los parámetros del instrumento para Malvern Spraytec son del siguiente modo:

- partícula - partícula opaca estándar;
- Partícula de índice de refracción - 1,50;
- índice de refracción (imaginario) - 0,50;
- densidad de partícula - 1,00;
- índice de refracción del dispersante - 1,33;
- unida de control - 1000 rpm;
- tipo de medición - cronometrada;
- tiempo de muestreo inicial - 30 s;
- ocultamiento - 20 % - 30 %;
- dispersante - 1 % de polisorbato 20 en agua desionizada.

Las partículas de RPL554 pueden producirse por cualquier proceso de reducción de tamaño farmacéuticamente aceptable o proceso de producción controlada del tamaño de partícula. Por ejemplo, las partículas pueden producirse por secado por pulverización de una solución de RPL554, o por cristalización controlada, o por reducción de tamaño de una forma sólida de RPL554, por ejemplo por molienda con chorro de aire, micronización mecánica o molienda con materiales.

La concentración de partículas de RPL554 en la composición farmacéutica líquida normalmente es de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml. Más normalmente, la concentración de partículas de RPL554 en la composición farmacéutica líquida es de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Por ejemplo, la concentración de partículas de RPL554 en la composición farmacéutica líquida puede ser de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, o de 0,11 mg/ml a 5 mg/ml. La concentración de partículas de RPL554 en la composición farmacéutica líquida puede ser, por ejemplo, de 0,1 mg/ml a 6 mg/ml.

El pH de la suspensión puede ser de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7.

La composición farmacéutica líquida puede comprender además uno o más tensioactivos. Los tensioactivos son tensioactivos farmacéuticamente aceptables. Los tensioactivos pueden ser tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos o tensioactivos de ion bipolar. Preferentemente, el uno o más tensioactivos están seleccionados de uno o más tensioactivos no iónicos.

El uno o más tensioactivos normalmente están seleccionados de alquil éteres de polioxietilenglicol, alquil éteres de polioxipropilenglicol, alquil éteres de glucósido, octilfenol éteres de polioxietilenglicol, alquilfenol éteres de polioxietilenglicol, ésteres alquílicos de glicerol, ésteres alquílicos de sorbitano de polioxietilenglicol (polisorbatos), ésteres alquílicos de sorbitano, cocamida MEA, cocamida DEA, óxido de dodecildimetilamina, copolímeros de bloque de polietilenglicol y polipropilenglicol (poloxámeros) y amina de sebo polietoxilada (POEA).

Preferentemente, el uno o más tensioactivos están seleccionados de ésteres alquílicos de sorbitano de polioxietilenglicol, por ejemplo polisorbato 20 (monolaurato de sorbitano de polioxietileno (20)), polisorbato 40 (monopalmitato de sorbitano de polioxietileno (20)), polisorbato 60 (monoestearato de sorbitano de polioxietileno (20)) y polisorbato 80 (monooleato de sorbitano de polioxietileno (20)) y ésteres alquílicos de sorbitano, por ejemplo, monolaurato de sorbitano, monopalmitato de sorbitano, monoestearato de sorbitano, triestearato de sorbitano y monooleato de sorbitano.

La concentración total del uno o más tensioactivos normalmente es de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml. La composición frecuentemente comprende dos o más tensioactivos, por ejemplo un polisorbato y un tensioactivo Span.

La composición farmacéutica líquida puede comprender además uno o más tampones. Los tampones son tampones farmacéuticamente aceptables. Los tampones pueden ser cualquier tampón adecuado para su uso en una composición farmacéutica líquida adecuada para inhalación. El uno o más tampones normalmente están seleccionados de tampones citrato o fosfato. Los tampones citrato incluyen ácido cítrico, citrato de sodio y mezclas de

los mismos. Los tampones fosfato incluyen ácido fosfórico, monofosfato de sodio, fosfato de sodio dibásico y mezclas de los mismos.

5 La composición comprende un tapón fosfato a una concentración de 0,5 mg/ml. Normalmente, la composición no comprende un tampón fosfato. Por ejemplo, la composición no incluye tampón.

10 La composición farmacéutica líquida normalmente comprende además un agente de ajuste de la tonicidad. El agente de ajuste de la tonicidad puede ser cualquier agente de ajuste de la tonicidad farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de agentes de ajuste de la tonicidad incluyen sales no tóxicas simples tales como haluros de metal alcalino, por ejemplo cloruro sódico y yoduro de potasio. Normalmente, el agente de ajuste de la tonicidad es cloruro sódico. La concentración del agente de ajuste de la tonicidad dependerá de la cantidad requerida para alcanzar la tonicidad deseada, por ejemplo isotonicidad con el cuerpo o los pulmones.

15 La concentración del agente de ajuste de la tonicidad normalmente es de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 8 mg/ml, y más normalmente de aproximadamente 3,5 mg/ml a 6 mg/ml.

20 La composición farmacéutica líquida puede comprender otros componentes. Alternativamente, pueden excluirse otros componentes. En algunos casos, la composición farmacéutica líquida no comprende un agonista de receptor  $\beta_2$ -adrenérgico o un antagonista de receptor muscarínico (o no comprende más del 0,1 % en peso total de un agonista del receptor adrenérgico  $\beta_2$  y un antagonista del receptor muscarínico).

25 El diluyente puede ser cualquier diluyente farmacéuticamente aceptable. El diluyente es adecuado para administración por inhalación. Ejemplos de diluyentes adecuados incluyen agua, etanol y glicerol. El diluyente es preferentemente agua. El diluyente es preferentemente estéril.

Normalmente, la composición farmacéutica líquida es adecuada para administración por nebulizador.

30 La invención también proporciona un nebulizador que comprende una composición farmacéutica líquida de acuerdo con la invención. El nebulizador normalmente se carga con la composición farmacéutica líquida. El nebulizador normalmente comprende de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 200 ml, más normalmente de 1 ml a 20 ml de la composición farmacéutica líquida.

35 Los nebulizadores usan aire comprimido para aerosolizar una composición farmacéutica líquida en un aerosol que es inhalada en las vías respiratorias de un sujeto. Ejemplos de nebulizadores incluyen un nebulizador de niebla suave, un nebulizador de malla vibrante, un nebulizador de chorro y un nebulizador de ondas ultrasónicas. Dispositivos nebulizadores adecuados incluyen Philips I-neb™ (Philips), Pari LC Sprint (Pari GmbH), AERx<sup>RTM</sup> Pulmonary Delivery System (Aradigm Corp.) y Pari LC Plus Reusable Nebulizer (Pari GmbH).

40 La invención también proporciona una composición farmacéutica líquida para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal. La composición es como se define en el presente documento. La composición farmacéutica líquida normalmente es para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal, en el que el tratamiento comprende administración por inhalación.

45 Las composiciones de la invención permiten la liberación retardada de RPL554 en la circulación sanguínea. La concentración plasmática de RPL554 después de un cierto tiempo es, por tanto, elevada con respecto al uso de composiciones de RPL554 conocidas. Normalmente, la concentración en plasma sanguíneo de RPL554 es mayor o igual a 1 ng/ml en un tiempo superior o igual a cuatro horas después de administrar una dosis nebulizada de la composición. La dosis nebulizada normalmente es de 0,02 mg/kg a 0,6 mg/kg. Por ejemplo, la dosis nebulizada puede ser de 0,2 mg/kg a 0,6 mg/kg. Por ejemplo, la invención proporciona una composición farmacéutica líquida como se define en el presente documento para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal, en la que la concentración en plasma sanguíneo de RPL554 es mayor o igual a 1 ng/ml en un tiempo superior o igual a cuatro horas después de administrar una dosis nebulizada de 0,2 mg/kg a 0,6 mg/kg mediante inhalación de la composición nebulizada de la invención. La concentración en plasma sanguíneo de RPL554 normalmente es mayor o igual a 1 ng/ml en un tiempo superior o igual a tres, cuatro o cinco horas después de administrar una dosis nebulizada de la composición.

55 Relacionado con la invención hay un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección como se define en el presente documento en un sujeto, método que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una composición farmacéutica líquida como se define en el presente documento. Normalmente, el método es para tratar una enfermedad o afección. La enfermedad o afección normalmente está seleccionada de asma, asma alérgica, fiebre del heno, rinitis alérgica, bronquitis, enfisema, bronquiectasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome disneico del adulto (SDA), asma resistente a esteroides, asma grave, asma pediátrico, fibrosis quística, fibrosis de pulmón, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial, trastornos de la piel, dermatitis atópica, psoriasis, inflamación ocular, isquemia cerebral y enfermedades autoinmunitarias. Preferentemente, el método comprende el tratamiento de asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), más preferentemente EPOC.

Una cantidad eficaz de RPL554 normalmente es de aproximadamente 0,01 mg/kg a 50 mg/kg para una dosis única. Una cantidad eficaz de RPL554 es frecuentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a 1 mg/kg para una dosis única. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede ser una dosis de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg, o de aproximadamente 0,1 mg a 100 mg, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 6 mg. Una cantidad eficaz puede ser de 0,1 mg a 12 mg. Una dosis única de RPL554 puede ser de 0,5 mg a 3 mg, por ejemplo aproximadamente 1,5 mg. La dosis puede administrarse diariamente. Por ejemplo, la dosis de RPL554 puede ser de 0,01 mg/kg/día a 50 mg/kg/día, normalmente de 0,01 mg/kg/día a 10 mg/kg/día o de 0,01 mg/kg/día a 1 mg/kg/día. Estas dosis normalmente son la dosis nominal emitida del inhalador. La composición farmacéutica líquida puede administrarse una vez, dos veces o tres veces al día, o puede administrarse dos veces, tres veces, cuatro veces o cinco veces a la semana. La composición puede administrarse tan frecuentemente como sea requerido por el paciente.

Una cantidad eficaz puede ser una dosis de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg, o de aproximadamente 0,1 mg a 100 mg, preferentemente de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 6 mg. Una cantidad eficaz puede ser de 0,1 mg a 12 mg. Una dosis única de RPL554 puede ser de 0,5 mg a 24 mg, que puede administrarse por nebulizador. Una dosis única de RPL554 puede ser de 0,5 mg a 6 mg, por ejemplo aproximadamente 1,5 mg. La dosis puede administrarse una vez, dos veces o tres veces al día. Por ejemplo, la dosis de RPL554 puede ser de 0,1 mg/día a 50 mg/día, normalmente de 1,5 mg/día a 18 mg/día. Estas dosis normalmente son la dosis nominal emitida del inhalador. La composición farmacéutica líquida puede administrarse una vez, dos veces o tres veces al día, o puede administrarse dos veces, tres veces, cuatro veces o cinco veces a la semana. La composición puede administrarse tan frecuentemente como sea requerido por el paciente.

Es un hallazgo sorprendente de la presente invención que una formulación en suspensión de RPL554 permita administrar altas dosis de RPL554 a un paciente sin un aumento simultáneo en la sensibilidad cardiovascular. La composición farmacéutica líquida es, por tanto, adecuada para su uso en el tratamiento de pacientes que padecen trastornos cardiovasculares o en riesgo de sufrir trastornos cardiovasculares.

Por ejemplo, la composición puede usarse para tratar una enfermedad o afección como se ha definido anteriormente en un paciente que padece vulnerabilidad cardiovascular. Los pacientes que padecen vulnerabilidad cardiovascular normalmente son aquellos en riesgo elevado de acontecimientos adversos que surgen de taquicardia o hipertensión. Más normalmente, los pacientes que padecen vulnerabilidad cardiovascular son aquellos que padecen una afección cardíaca preexistente, o una afección que sería agravada por taquicardia o hipertensión. Tales pacientes incluyen aquellos que padecen enfermedad de las arterias coronarias, cardiomiopatía, hipertensión, enfermedad cardíaca hipertensiva, insuficiencia cardíaca, arritmia, disritmias cardíacas, endocarditis, miocarditis, enfermedad cardíaca valvular y accidente cerebrovascular. También están incluidos pacientes que han sufrido un infarto de miocardio.

La invención se describe en más detalle por los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### Ejemplo de referencia 1 - formulación y estabilidad de la formulación en suspensión de RPL554

Se produjeron composiciones farmacéuticas líquidas con las formulaciones expuestas en las Tablas 1 y 2 a continuación.

Tabla 1 - formulación de variante 1a (0,4 mg/ml)

Constituyente	Función	Concentración (mg/ml)
RPL554 (micronizada)	Compuesto activo	0,4
Polisorbato 20 (Tween 20)	Tensioactivo	0,50
Monolaurato de sorbitano (Span 20)	Tensioactivo	0,05
Monofosfato de sodio monohidratado	Tampón	6,58
Fosfato de sodio dibásico anhidro	Tampón	6,80
Cloruro sódico	Agente de ajuste de la tonicidad	4,80
Agua	Diluyente	c.s.p.

Tabla 2 - formulación de variante 1b (20,0 mg/ml)

Constituyente	Función	Concentración (mg/ml)
RPL554 (micronizada)	Compuesto activo	20,0
Polisorbato 20 (Tween 20)	Tensioactivo	0,50
Monolaurato de sorbitano (Span 20)	Tensioactivo	0,05
Monofosfato de sodio monohidratado	Tampón	6,58
Fosfato de sodio dibásico anhidro	Tampón	6,80
Cloruro sódico	Agente de ajuste de la tonicidad	4,80
Agua	Diluyente	c.s.p.

La prueba del ensayo se realizó por duplicado. Los parámetros del método clave son del siguiente modo:

- fase móvil: acetonitrilo:agua:TFA (45:55:0,1);
- columna: Waters X-Bridge phenyl, 3,5 µm, 150 x 4,6 mm;
- caudal: 1,5 ml/min;
- volumen de inyección: 10 µl;
- detección: UV a 254 nm;
- tiempo de ejecución: 6 minutos; y
- muestra y concentración de patrón: 0,1 mg/ml.

La variante 1a se almacenó en condiciones de o bien (i) una temperatura de 25 °C y una humedad relativa (HR) del 60 % o bien (ii) una temperatura de 40 °C y una HR del 75 %. El aspecto, pH, ensayo, impurezas y distribución del tamaño de partícula (PSD) se midieron inicialmente, a 1 mes, a 2 meses y a 6 meses (6 meses solo para las condiciones de 25 °C y HR del 60 %). La cantidad de impurezas se midió por HPLC con el tiempo de retención relativo (TRR) de la impureza indicada.

Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4 a continuación.

*Tabla 3 - Estabilidad de la variante 1a en condiciones: 25 °C/60 % de HR*

Prueba	Inicial	1 mes	2 meses	6 meses
Aspecto	Suspensión amarilla clara libre de aglomerados	Suspensión amarilla clara libre de aglomerados	Suspensión amarilla clara libre de aglomerados	Suspensión amarilla clara libre de aglomerados
pH	6,55	6,59	6,68	6,51
Ensayo (mg/g)	0,372	0,374	0,373	0,372
Impurezas (% del área)				
Total	1,8	1,8	1,6	1,9
Mayor	0,490 (TRR 0,28)	0,533 (TRR 0,26)	0,429 (TRR 0,26)	0,463 (TRR 0,26)
Segundo mayor	0,401 (TRR 1,13)	0,408 (TRR 1,12)	0,389 (TRR 1,12)	0,432 (TRR 1,12)
PSD (Dv50, µm)	2,282	2,069	2,089	2,133

*Tabla 4 - Estabilidad de la variante 1a en condiciones: 40 °C/75 % de HR*

Prueba	Inicial	1 mes	2 meses
Aspecto	Suspensión amarilla clara libre de aglomerados	Suspensión amarilla clara libre de aglomerados	Suspensión amarilla clara libre de aglomerados
pH	6,55	6,91	6,67
Ensayo (mg/g)	0,372	0,374	0,377
Impurezas (% del área)			
Total	1,8	1,7	1,6
Mayor	0,490 (TRR 0,28)	0,445 (TRR 0,26)	0,428 (TRR 0,26)
Segundo mayor	0,401 (TRR 1,13)	0,409 (TRR 1,12)	0,380 (TRR 1,12)
PSD (Dv50, µm)	2,28	2,10	2,14

La variante 1b se almacenó en condiciones de o bien (i) una temperatura de 25 °C y una humedad relativa (HR) del 60 % o bien (ii) una temperatura de 40 °C y una HR del 75 %. El aspecto, pH, impurezas y distribución del tamaño de partícula (PSD) se midieron inicialmente, a 1 mes, y a 2 meses. La cantidad de impurezas se midió por HPLC con el tiempo de retención relativo (TRR) de la impureza indicada.

Los resultados se muestran en las Tablas 5 y 6 a continuación.

*Tabla 5 - Estabilidad de la variante 1b en condiciones: 25 °C/60 % de HR*

Prueba	Inicial	1 mes	2 meses
Aspecto	Suspensión amarilla libre de aglomerados	Suspensión amarilla libre de aglomerados	Suspensión amarilla libre de aglomerados
pH	6,55	6,67	6,68
Ensayo (mg/g)	18,72	18,86	18,54
Impurezas (% del área)			
Total	1,2	1,2	1,2
Mayor	0,399 (TRR 1,13)	0,401 (TRR 1,12)	0,401 (TRR 1,12)
Segundo mayor	0,306 (TRR 1,11)	0,328 (TRR 1,11)	0,329 (TRR 1,11)
PSD (Dv50, µm)	2,11	2,37	2,05

Tabla 6 - Estabilidad de la variante 1b en condiciones: 40 °C/75 % de HR

Prueba	Inicial	1 mes	2 meses
Aspecto	Suspensión amarilla libre de aglomerados	Suspensión amarilla libre de aglomerados	Suspensión amarilla libre de aglomerados
pH	6,55	6,76	6,3
Ensayo (mg/g)	18,72	18,99	19,01
Impurezas (% del área)			
Total	1,2	1,2	1,2
Mayor	0,399 (TRR 1,13)	0,394 (TRR 1,12)	0,388 (TRR 1,13)
Segundo mayor	0,306 (TRR 1,11)	0,308 (TRR 1,11)	0,322 (TRR 1,11)
PSD (Dv50, µm)	2,11	2,09	2,13

Como puede apreciarse de las Tablas 3 a 6, la composición de suspensión farmacéutica líquida muestra excelente estabilidad a largo plazo sin variación significativa en el pH o la cantidad de impurezas presentes. Esta estabilidad se observa incluso después de 2 meses a 40 °C.

#### Ejemplo comparativo 1 - formulación y estabilidad de formulación en solución de RPL554

Se realizó una prueba de estabilidad similar para la formulación en solución de RPL554. Se mantuvo una solución de 1,0 mg/ml de RPL554 en una solución acuosa de tampón citrato/fosfato a un pH de aproximadamente 3,2 en condiciones de una temperatura de 25 °C y una humedad relativa (HR) del 60 % durante seis meses. Se midieron el aspecto, pH, ensayo e impurezas presentes inicialmente y a los 6 meses. Los resultados se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7 - Estabilidad de la solución de RPL554 en condiciones: 25 °C/60 % de HR

Prueba	Inicial	6 meses
Aspecto	Una solución clara ligeramente coloreada. Libre de contaminación visible.	Una solución clara ligeramente coloreada. Libre de contaminación visible.
pH	3,04	3,00
Ensayo	0,98 mg/ml	0,98 mg/ml
Impurezas por HPLC		
TRR 0,85	0,19 %	0,19 %
TRR 0,87	0,15 %	<b>0,42 %</b>
TRR 1,03	< 0,10 %	< 0,10 %
TRR 1,09	0,20 %	0,16 %
TRR 1,12	0,54 %	0,57 %
TRR 1,14	0,14 %	< 0,10 %
TRR 1,15	0,11 %	< 0,10 %

Aunque no hay cambio en el aspecto de la solución, hay un aumento significativo en la cantidad de la impureza con el valor de TRR de 0,87. Esta impureza se ha identificado como un producto de hidrólisis de RPL554. La solución de RPL554 es menos estable que la formulación en suspensión.

#### Ejemplo de referencia 2 - distribución del tamaño de partícula

Se evaluó la distribución del tamaño de partícula de una muestra de RPL554 micronizada adecuada para su uso en formulaciones nebulizadas usando difracción láser. El análisis de la distribución del tamaño de partícula se realizó por difracción láser usando Malvern Spraytec conjuntamente con una celda de dispersión en húmedo.

Los resultados son del siguiente modo: Dv10 = 0,69 µm; Dv50 = 1,35 µm; Dv90 = 2,5 µm.

#### Ejemplo de referencia 3 - formulaciones

Se prepararon formulaciones en suspensión y en solución de RPL554 del siguiente modo. Estas formulaciones se usaron en los Ejemplos 4 a 6.



Constituyentes de formulación (suspensión)	<b>20 mg/ml de suspensión de RPL554</b>		
	<b>Constituyente</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración (mg/ml)</b>
	RPL554 - Micronizada	2,12 g <sup>a</sup>	20 mg/ml
	Solución de humectación	10,0 ml	N/A
	Solución de tampón	Hasta 100 ml	N/A
<sup>a</sup> Incluye un 6 % superior para pérdidas de fabricación esperadas			
<b>Vehículo = como antes, omitiendo RPL554</b>			
<hr/>			
<b>Solución de tampón de RPL554</b>			
	<b>Constituyente</b>	<b>Cantidad (g)</b>	<b>Concentración (mg/ml)</b>
	Monofosfato de sodio monohidratado	32,9	6,58
	Fosfato de sodio dibásico anhidro	34,0	6,80
	Cloruro sódico	24,0	4,80
	Agua para inyección	Hasta 5000 ml	N/A
<hr/>			
<b>Solución de humectación de RPL554</b>			
	<b>Constituyente</b>	<b>Cantidad (g)</b>	<b>Concentración (mg/ml)</b>
	Polisorbato 20 (Tween 20)	10,0	5,00
	Monolaurato de sorbitano (Span 20)	1,0	0,50
	RPL554 Disolución de tampón	Hasta 2000 ml	N/A
<hr/>			
Método de preparación (suspensión)	<b>Solución de humectación de RPL554:</b> Se pesó la cantidad requerida de polisorbato 20 en un recipiente adecuado y se añadió la cantidad requerida de monolaurato de sorbitano. La solución de humectación se agitó magnéticamente durante 10 minutos, luego se transfirió a un recipiente más grande con solución de tampón y se enrasó al volumen final con la solución de tampón. La solución se agitó magnéticamente durante 10 minutos y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. <b>Vehículo:</b> Se midió el volumen requerido de Solución de humectación de RPL554 en un recipiente adecuado y se enrasó al volumen final con Solución de tampón de RPL554, se mezcló con un agitador magnético durante 10 minutos. Se midió el pH, se registró y se ajustó, si fuera necesario, a pH 7,0 ± 0,3 usando HCl/NaOH. <b>20 mg/ml de suspensión de RPL554:</b> Se pesó la cantidad requerida de RPL554 en un vaso de precipitados pequeño y se añadió la cantidad requerida de Solución de humectación. La suspensión se mezcló usando una mezcladora Silverson provista de un tamiz de cizallamiento de 5/8" durante aproximadamente 1 minuto a 8000 rpm. La mezcla se transfirió a un nuevo vaso de precipitados seco limpio enjuagando con Solución de tampón. Se enrasó el peso requerido con Solución de tampón y se mezcló usando una mezcladora Silverson provista de un tamiz de cizallamiento de 1" de altura aproximadamente 1 minuto a 8000 rpm. Se midió el pH, se registró y se ajustó, si fuera necesario, a pH 7,0 ± 0,3 usando HCl/NaOH. La solución se transfirió al recipiente final. Para las concentraciones más bajas de suspensiones de RPL554, se pesó la cantidad requerida de 20 mg/ml de formulación y se diluyó al volumen requerido con vehículo usando una jeringa provista de un filtro de 0,22 µm. La formulación se mezcló suavemente en un agitador magnético durante 5 minutos.		
Constituyentes de formulación (solución)	<b>1 mg/ml (pH 3,5) de solución de RPL554</b>		
	<b>Constituyente</b>	<b>Cantidad</b>	
	RPL554	100 mg	
	Solución 0,1 M de ácido cítrico	22,5 ml	
	Solución 0,2 M de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado	9,7 ml	
	0,9 % (p/p) de solución salina	67,8 ml	
	<b>1,5 mg/ml (pH 2,5) de solución de RPL554</b>		
	<b>Constituyente</b>	<b>Cantidad</b>	
	RPL554	150 mg	
	Solución 0,1 M de ácido cítrico	45 ml	
	Solución 0,2 M de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado	5 ml	
		0,9 % (p/p) de solución salina	50 ml
<b>Vehículo:</b> Como antes, omitiendo RPL554			
<hr/>			
Método de preparación (solución)	<b>Solución de RPL554 ácido cítrico 0,1 M:</b> Se pesó la cantidad requerida de ácido cítrico en un recipiente adecuado, se enrasó al volumen requerido con 0,9 % de solución salina y se agitó magnéticamente hasta que se disolvió completamente. <b>Solución de RPL554 fosfato de sodio dibásico 0,2 M:</b> Se pesó la cantidad requerida de fosfato de sodio dibásico anhidro en un recipiente adecuado, se enrasó al volumen		

requerido con 0,9 % de solución salina y se agitó magnéticamente hasta que se disolvió completamente.

**Vehículo:** Se midieron el volumen requerido de solución de ácido cítrico, solución de fosfato de sodio dibásico y 0,9 % de solución salina en un recipiente adecuado y se mezclaron minuciosamente. Se midió el pH y se ajustó si fuera necesario (pH 3,5 ( $\pm 0,3$ ) o pH 2,5 ( $\pm 0,2$ )) por la adición gota a gota de solución de ácido cítrico o fosfato de sodio adicional según se requiriera.

**Solución de RPL554:** Se pesó la cantidad requerida del material de prueba en un recipiente adecuado, se enrasó al volumen final con vehículo y se agitó magnéticamente hasta que se disolvió completamente. Se midió el pH y se ajustó si fuera necesario.

<sup>a</sup> incluye un excedente del 6% para las pérdidas de fabricación esperadas

#### Ejemplo de referencia 4 - perfil toxicocinético en ratas

##### Resumen

- 5 Se administraron ratas Han Wistar (5/sexo/grupo) por inhalación solo nasal de una vez al día a la dosis objetivo de 2,4, 8,4 o 21,6 mg/kg/día de una suspensión de RPL554 según la invención durante 7 días consecutivos (grupos 2, 3 y 4). 5 ratas/sexo/grupo adicionales recibieron la suspensión de vehículo y actuaron de controles (grupo 1). La duración de la administración de dosis fue 240 minutos cada día. Al final del periodo de tratamiento, todos los animales supervivientes se sacrificaron y se les practicó la autopsia. Se administraron similarmente animales satélite (3/sexo/grupo) y se sangraron en el día 7 para el análisis toxicocinético. Se administró un grupo adicional de animales satélite (3/sexo) por inhalación solo nasal una vez al día a la dosis objetivo de 2,4 mg/kg/día de solución de RPL554 para comparación con la suspensión de RPL554 y se sangraron en el día 7 para el análisis toxicocinético (grupo 5). Las concentraciones de aerosol medias y dosis logradas se presentan en la Tabla 8 continuación.

15 *Tabla 8 - Concentraciones de aerosol medias y dosis logradas*

Grupo	Tipo de formulación	Nivel de exposición objetivo ( $\mu\text{g/l}$ )	Nivel de exposición lograda ( $\mu\text{g/l}$ )	Dosis objetivo (mg/kg/día)	Dosis lograda (mg/kg/día)	Concentración de formulación (mg/ml)
1	Suspensión de vehículo	0	0,00	0	0	0
2	Suspensión	13	18,10	2,4	3,27	1,5
3	Suspensión	47	55,18	8,4	9,96	4,5
4	Suspensión	121	141,51	21,6	25,49	12
5	Solución	13	14,47	2,4	2,62	1,6

##### Resultados toxicocinéticos

- 20 Se midió el perfil toxicocinético de la suspensión de RPL554 a diferentes dosis (grupos 2, 3 y 4). Éste se comparó con el perfil toxicocinético de la solución de RPL554 conocida (grupo 5). Las dosificaciones administradas al grupo 2 y grupo 5 son similares. El grupo 1 es el grupo de control.

- 25 Se evaluaron los parámetros toxicocinéticos de RPL554 en forma de suspensión (invención) o solución (comparativa) en el día 7 de 1 semana de exposición a inhalación diaria de las composiciones de RPL554 a ratas. Los resultados se muestran en las Tablas 10 y 11 a continuación. Los parámetros medidos son concentración máxima de RPL554 en el plasma sanguíneo de las ratas ( $C_{\text{máx}}$ ), el tiempo necesario para alcanzar la  $C_{\text{máx}}$  ( $T_{\text{máx}}$ ) y el área bajo la curva de dosis después de 8 horas ( $ABC_{8h}$ ).

*Tabla 10 - resultados toxicocinéticos para ratas macho*

Grupo	Dosis lograda (mg/kg/día)	$C_{\text{máx}}$ (ng/ml)	$T_{\text{máx}}$ (horas, mediana)	$ABC_{8h}$ (ng.h/ml)
1 (vehículo)	0	0	0	0
2 (suspensión)	3,27	10,5	4,25	41,9
3 (suspensión)	9,96	44,1	4,25	172
4 (suspensión)	25,49	94,1	4,083	372
5 (solución)	2,62	53,4	4,083	139

30

*Tabla 11 - resultados toxicocinéticos para ratas hembra*

Grupo	Dosis lograda (mg/kg/día)	$C_{\text{máx}}$ (ng/ml)	$T_{\text{máx}}$ (horas, mediana)	$ABC_{8h}$ (ng.h/ml)
1 (vehículo)	0	0	0	0
2 (suspensión)	3,27	19,9	4,25	79,1
3 (suspensión)	9,96	133	4,25	478
4 (suspensión)	25,49	573	4,25	2030
5 (solución)	2,62	52,0	4,083	153

Estos resultados demuestran que es posible alcanzar valores de  $C_{\text{máx}}$  sustancialmente más altos usando la composición farmacéutica líquida (por ejemplo, los grupos 3 y 4) en comparación con una composición en solución (grupo 5). La dosis limitada por la solubilidad factible de una solución de RPL554 previene que tales valores de  $C_{\text{máx}}$  sean alcanzados con una composición en solución. También se muestra que las composiciones en suspensión tienen una liberación retardada, con valores de  $T_{\text{máx}}$  mayores observados para los grupos 2 a 4.

#### Ejemplo de referencia 5 - perfil toxicocinético en perros

Se evaluó el perfil toxicocinético de suspensiones de RPL554 para perros beagle. El diseño del estudio fue como se expone en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 12 - diseño del estudio, dosis y concentraciones nominales

Fase	Dosis	Tratamiento	Formulación	Dosis objetivo de RPL554 (mg/kg/día)	Concentración de aerosol objetivo* $\mu\text{g/l}$	Concentración nominal (mg/ml)
1	1	RPL554	Suspensión	1	19,8	1,5
1	2	RPL554	Suspensión	3	59,4	4,5
1	3	RPL554	Suspensión	9	178	16
2		RPL554	Suspensión	9	178	16
3		RPL554	Suspensión y solución	0,5	10	1,5 (suspensión) 1,0 (solución)
* Concentración de aerosol calculada suponiendo una duración de la exposición de 120 minutos y un peso corporal de 12 kg						

Los animales recibieron la sustancia de prueba, RPL554, por administración por inhalación durante 3 días a cada dosis en la fase de dosis variable (Fase 1), con al menos 2 días de periodo de lavado entre dosis. En la fase de dosis constante (Fase 2), los animales recibieron la sustancia de prueba durante 7 días consecutivos. En la fase de grupos cruzados (Fase 3), los animales recibieron la sustancia de prueba como una única exposición a la formulación en suspensión, seguido de 2 días sin dosis, seguido de una única exposición a la formulación en solución comparativa.

#### Resultados toxicocinéticos

Tras 7 días de dosis a 9,82 mg/kg/día con la suspensión de RPL554 (grupo 2), los valores de  $C_{\text{máx}}$  para machos y hembras fueron 116 ng/ml y 95,9 ng/ml, respectivamente, y los valores de  $\text{ABC}_{6\text{h}}$  para los machos y hembras fueron 389 ng.h/ml y 289 ng.h/ml, respectivamente.

Después de una única exposición de suspensión de RPL554 a 0,395 mg/kg, los valores de  $C_{\text{máx}}$  para el macho y las hembras fueron 13,4 ng/ml y 12,7 ng/ml, respectivamente, y los valores de  $\text{ABC}_{6\text{h}}$  para el macho y las hembras fueron 33,9 ng.h/ml y 31,5 ng.h/ml, respectivamente.

Después de una única exposición de solución de RPL554 a 0,543 mg/kg, los valores de  $C_{\text{máx}}$  para el macho y las hembras fueron 40,9 ng/ml y 34,2 ng/ml, respectivamente, y los valores de  $\text{ABC}_{6\text{h}}$  para el macho y las hembras fueron 74,6 ng.h/ml y 62,8 ng.h/ml, respectivamente.

Aquí se observa que es posible lograr altos valores de  $C_{\text{máx}}$  y ABC usando la suspensión de RPL554 (por ejemplo 116 ng/ml y 95,9 ng/ml).

Los resultados toxicocinéticos también confirman que la formulación en suspensión da una liberación retardada en comparación con la formulación en solución. Esto puede observarse de los datos del experimento de fase 3 (dosis únicas separadas de la formulación en suspensión). Estos datos se presentan en la Tabla 13 a continuación, donde la formulación en solución (dosis objetivo 0,5 mg/kg/día, real 0,543 mg/kg/día) se compara con la formulación en suspensión (dosis objetivo 0,5 mg/kg/día, real 0,395 mg/kg/día). La Tabla 13 muestra concentraciones plasmáticas (ng/ml) con el tiempo tras el tratamiento con una dosis única de la suspensión o una dosis única de la solución. Los dos tratamientos se realizaron separados dos días. Se presentan datos para los tres perros: un perro macho (61) y dos perros hembra (62 y 64). BLQ se refiere a concentraciones plasmáticas inferiores a 1,00 ng/ml.

Tabla 13 - Valores de concentración plasmática de RPL554 (ng/ml) para 3 perros tras una dosis con una suspensión de RPL554 y una solución de RPL554

Perro	61 (M)		62 (H)		64 (H)	
Tiempo (horas)	Suspensión	Solución	Suspensión	Solución	Suspensión	Solución
0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
0,017	11	39,7	9,83	35,2	13,5	33,1
0,25	13,4	40,9	11,6	26,5	13,7	26,5
0,667	10,4	13	7,26	15,7	10,8	13

(continuación)

Perro	61 (M)		62 (H)		64 (H)	
Tiempo (horas)	Suspensión	Solución	Suspensión	Solución	Suspensión	Solución
1,667	4,57	4,84	2,51	3,31	4,99	3,15
3	2,88	1,23	1,87	1,99	2,42	1,21
4	1,81	BLQ	1,4	BLQ	1,74	BLQ

Los datos en la Tabla 13 demuestran que la formulación en suspensión de RPL554 conduce a un perfil de liberación más retardada que la formulación en solución de RPL554. Por ejemplo, la concentración plasmática de RPL554 está por debajo del límite detectable 4 horas después de la inhalación de la formulación en solución para todos los perros, mientras que al menos 1,4 ng/ml de RPL554 están presentes después de 4 horas en el plasma sanguíneo para todos los perros tras la inhalación de la suspensión.

#### Ejemplo de referencia 6 - función pulmonar en cobayas

#### Introducción

RPL554 produce broncoprotección contra agentes espasmogénicos administrados por vía intravenosa cuando se administran como polvo seco o cuando se preparan como una solución en solución salina acidificada (pH 2,5).

Este antagonismo funcional (dilución de duplicación de 1,5, es decir, 2,8 veces) contra metacolina también ha sido verificado en sujetos asmáticos humanos (Franciosi *et al.*, 2013). Este ejemplo evaluó la broncoprotección proporcionada por RPL554 cuando se presenta como la nueva formulación en suspensión para nebulización.

#### Metodología

##### Exposición a fármaco

Se dispusieron cobayas Dunkin Hartley macho (300-400 g) en un cámara de aerosol construida de forma personalizada y se expusieron a o bien vehículo (0,9 % de solución salina a pH 2,5), RPL554 (2,5 mg/ml de solución) o RPL554 (1 mg/ml de solución) durante un periodo de 15 min. Se generaron aerosoles usando un nebulizador ultrasónico (Ultraneb 99) y se usó un caudal de 1 l/min para dirigir la solución nebulizada a una cámara de aerosol que contenía 4 brazos que permitía que los animales estuvieran inmovilizados con sus vías respiratorias superiores (es decir, la nariz) sobresaliendo en la cámara del aerosol.

Después de este periodo de exposición de 15 min, se dejó que los animales se recuperaran y luego antes de la exposición de 2 h y 5 h después del fármaco, los animales se anestesiaron con uretano (1,5 g/kg) y se hizo una incisión en la línea media para exponer la tráquea. Se realizó una traqueotomía, y se colocó en su lugar una cánula traqueal y se unió a un neumotacógrafo que a su vez se conectó a un transductor de presión Validyne (+ 2 cmH<sub>2</sub>O) para la detección de flujo. Se midieron los cambios respiración a respiración en el flujo de aire usando un sistema de registro de la función pulmonar (LFR, Versión 9, Mumed UK) y se presentó en tiempo real en un PC. La señal de flujo se integró para dar una medida del volumen corriente.

Se insertó una cánula en la cavidad torácica entre el 3º y 5º espacio intercostal y se conectó al lado negativo de un transductor de presión Validyne (+ 20 cmH<sub>2</sub>O). El lado positivo del transductor de presión se conectó al lado del neumotacógrafo proximal al animal, con el fin de obtener una medida de la presión transpulmonar (TPP: diferencia entre la presión de la boca y torácica). Se derivaron los parámetros de la función pulmonar, resistencia total de las vías respiratorias (RL; cmH<sub>2</sub>O.s/l) y la distensibilidad pulmonar dinámica (ml/cmH<sub>2</sub>O) de cada medida de flujo, volumen corriente y TPP por el método de integración. Se canuló la arteria carótida para la medición de la tensión arterial, respectivamente. Se establecieron curvas de concentración acumulada-efecto y la concentración de provocación (PC) de acetilcolina que produjo de forma acumulada un aumento del 50 % en RL (PC50).

##### Exposición a acetilcolina

Se monitorizó la broncoconstricción a acetilcolina (0,25 a 16 mg/ml, exposición de 4 s) 2 h y 5 después de la administración de una solución de RPL554 (1 y 2,5 mg/ml) o vehículo (solución salina acidificada a pH 3,5 o pH 2,5). Se generaron aerosoles de acetilcolina con un nebulizador Aeroneb® Lab (Aerogen Inc). El flujo de entrada se dirigió o bien a través del neumotacógrafo para la medición de la mecánica respiratoria del pulmón, o se derivó a través del nebulizador para los fines de administración de fármaco directamente al pulmón (mecánica respiratoria no medida durante el periodo de exposición de 4 s).

En una serie separada de experimentos, se realizó la función pulmonar 2 y 5 h después de la inhalación de la nueva formulación en suspensión de RPL554 (2,5 mg/ml y 10 mg/ml) y el vehículo.

## Resultados

### Parámetros iniciales

Se midieron la resistencia pulmonar total inicial (RL), distensibilidad pulmonar dinámica (Cdyn), tensión arterial media (BP) y salida de nebulizador en animales previamente expuestos al control de vehículo (solución salina a pH 2,5), y formulaciones en solución de RPL554 (1 mg/ml o 2,5 mg/ml, Figura 1) y a nuevas formulaciones en suspensión de RPL554 (2,5 mg/ml y 10 mg/ml, Figura 2). Se tomaron los parámetros respiratorios y cardiovasculares iniciales antes de la exposición a acetilcolina y se monitorizaron 2 y 5 h después de la exposición a solución salina o RPL554 en cobayas anestesiadas.

### Parámetros de la función pulmonar

En general, RL representa los cambios en el diámetro de las vías respiratorias en las vías respiratorias centrales tras la activación de receptores muscarínicos en los músculos lisos de las vías respiratorias en esta región del pulmón. Se eligió la acetilcolina por su corta duración de acción.

#### 1. Formulación en solución de RPL554

La acetilcolina administrada a cobayas anestesiadas por vía inhalada causó una respuesta broncoconstrictora dependiente de la dosis como se ha determinado por cambios en RL medidos 2 h y 5 h después de la exposición a solución salina y RPL554 (1 mg/ml, 2,5 mg/ml de solución).

##### 1.1 - Análisis de acetilcolina RL PC50

Análisis a posteriori de la media aritmética demostraron una broncoprotección significativa en el momento de 2 h para RPL554 a 1 mg/ml de solución (dif. media = 3,5 (0,11 - 8,83) mg/ml,  $P = 0,0445$ ) y 2,5 mg/ml a las 2 h (4,7 (0,4 - 9) mg/ml,  $P = 0,0357$ ) y el momento de tiempo de 5 h (3,4 (0,9 - 6) mg/ml,  $P = 0,0133$ ). El grado de broncoprotección fue menos evidente a las 5 h para 1 mg/ml de solución de RPL554 (2,5 (-0,17-5,2) mg/ml,  $P = 0,0628$ ).

Se observó una diferencia significativa entre 2 h (1 mg/ml de RPL554,  $P = 0,0190$  sin ajustar) y 5 h (2,5 mg/ml,  $P = 0,0095$  sin ajustar) de solución de RPL554 frente al grupo de solución salina (Figura 1).

#### 2. Nueva formulación en suspensión de RPL554

La acetilcolina administrada a cobayas anestesiadas por vía inhalada causó una broncoconstricción dependiente de la dosis como se ha determinado por cambios en RL medidos 2 h y 5 h después de la exposición a solución salina y suspensión de RPL554 (2,5 mg/ml y 10 mg/ml). La reducción dependiente de la dosis en la distensibilidad pulmonar inicial (Cdyn) también se registró simultáneamente tras las concentraciones crecientes de acetilcolina 2 h y 5 h después de la exposición a solución salina o suspensión de RPL554 (2,5 mg/ml y 10 mg/ml).

##### 2.1 - Análisis de acetilcolina RL PC50

El análisis de la varianza de los datos transformados por log2 para acetilcolina RL PC50 revelaron un efecto de fármaco global a las 2 h ( $P = 0,0238$ ). Para el grupo de tiempo de 2 h, esto se reflejó por una diferencia significativa entre los 10 mg/ml de suspensión de RPL554 y el grupo de vehículo (veces de diferencia media = 2,67 (1,12 - 6,36),  $P < 0,05$ ). A pesar de la mayor diferencia media, entre RPL554 (10 mg/ml de suspensión) frente al vehículo en el momento de tiempo de 5 h desplazamiento de 14 veces (0,5-400), el amplio intervalo de confianza es el motivo por el que no se logró diferencia estadística (Figura 2, panel superior).

Se combinaron los datos de vehículo para los momentos de tiempo de 2 y 5 h y se re-analizaron (Figura 2, panel inferior). Hubo un efecto del tratamiento significativo global ( $P=0,0016$ ) que estuvo afectado por un grado significativo de broncoprotección con 2,5 mg/ml de suspensión de RPL554 (2,52 veces (1-5,72),  $P < 0,05$ ) y 10 mg/ml de RPL554 (4,67 veces (2-11),  $P < 0,05$ ). En el momento de tiempo de 5 h, RPL554 a 10 mg/ml de suspensión causó un grado significativo de broncoprotección (2,77 veces (1,3-6,0) (Figura 2, panel inferior).

### Resumen

RPL554 inhibió la broncoconstricción inducida por la acetilcolina administrada aerosolizada cuando se midió 2 y 5 h después de la exposición al fármaco. Tanto las formulaciones en solución de RPL554 (1 mg/ml, 2,5 mg/ml) como las nuevas formulaciones en suspensión de RPL554 (2,5 mg/ml, 10 mg/ml) produjeron una broncoprotección estadísticamente significativa.

### Ejemplo de referencia 7 - estudio farmacocinético en seres humanos

Se realizó un estudio de fase I, aleatorizado, de doble ciego, controlado por placebo, para evaluar la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética de dosis inhaladas únicas de la formulación en suspensión de RPL554, administrada por nebulizador a sujetos macho sanos de edades de 18 a 55, ambos incluidos.

La dosis nominal de la formulación en suspensión fue aproximadamente 1,5 mg, que es esencialmente equivalente a la dosis de 0,018 mg/kg previamente mostrada que fue bien tolerada en estudios clínicos con la formulación en solución.

La formulación en suspensión usada fue una suspensión estéril para nebulización que contenía 1,5 mg de principio activo RPL554 micronizado en 5 ml de solución salina tamponada con solución de fosfato a pH 7, con tensioactivos (Tween 20 y Span 20) (como se describe en el Ejemplo 1 anteriormente, pero con una concentración diferente de RPL554). La dosificación de la suspensión se realizó usando un nebulizador de chorro estándar (PARI LC Sprint).

Se recogieron muestras de sangre (4 ml en cada momento de tiempo) a intervalos de tiempo apropiados después de la administración. Las muestras se recogieron por venopunción o mediante cánula permanente en el antebrazo en tubos de heparina de litio y se enfriaron inmediatamente (baño de hielo). La sangre se centrifugó en el plazo de 15 minutos desde la recogida. El plasma se separó en una centrifugadora refrigerada (aproximadamente 4 °C) a 1100 g durante 15 minutos y se transfirió a tubos de polipropileno. Entonces se midió la concentración del activo.

Los resultados medios se presentan en la Figura 3, que muestra las curvas de concentración media para los sujetos después de la administración de las formulaciones en solución o en suspensión. Los resultados para la formulación en solución derivaron de un estudio clínico previo (The Lancet Respiratory Medicine Volumen 1, No. 9, p. 714-727, noviembre de 2013) que usó una solución estéril para nebulización que contenía RPL554 disuelta en solución salina tamponada con citrato-fosfato a pH 3,2. La cantidad administrada mediante el nebulizador fue tal que la dosis nominal de RPL554 fue 0,018 mg/kg (-1,26 mg para una persona de 70 kg).

Los parámetros farmacocinéticos medios durante el estudio se presentan en la Tabla 14 a continuación.

*Tabla 14*

Formulación	C <sub>máx</sub> (pg/ml)	ABC <sub>inf</sub> (pg.h/ml)	Semivida (h)
Solución	870	1833	3
Suspensión	393	3795	10

Los valores en la Tabla 14 demuestran que la formulación en suspensión tiene un perfil farmacocinético sustancialmente mejorado en comparación con la formulación en solución comparativa. En particular, el área bajo la curva (ABC) y la semivida son ambos significativamente elevados. Esto demuestra que la formulación en suspensión proporciona una forma inesperadamente mejorada por la que puede administrarse RPL554 por inhalación.

#### **Ejemplo de referencia 8 - estudio de estabilidad de doce meses**

Se prepararon tres lotes de la formulación en suspensión de la invención con las composiciones expuestas en la Tabla 15 a continuación.

*Tabla 15*

Constituyente	Concentración (mg/ml)
RPL554 (PA tratado con calor)	0,5,2,5 y 10
Polisorbato 20 (Tween 20)	0,5
Monolaurato de sorbitano (Span 20)	0,05
Monofosfato de sodio monohidratado	6,58
Fosfato de sodio dibásico anhidro	6,80
Cloruro sódico	4,80
Agua para inyección	Hasta el peso

#### *Pruebas analíticas*

Se realizaron pruebas analíticas después de 1, 3, 6 y 12 meses de almacenamiento de las formulaciones a 25 °C y 60 % de HR. Los resultados de 12 meses se describen a continuación.

#### *Aspecto*

Se realizó la prueba de aspecto visualmente en una única muestra. Se encontró que la muestra de placebo era una solución incolora clara. Las muestras de 0,5 mg/ml de concentración fueron una suspensión amarilla clara libre de aglomerados visibles mientras que las muestras de 2,5 mg/ml y 10 mg/ml de concentración parecieron ser suspensiones amarillas libres de aglomerados visibles.

#### *pH*

La determinación del pH se realizó en una única muestra. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16

Número de lote	Concentración	pH
BN011/14	0,5 mg/ml	6,656
BN010/14	2,5 mg/ml	6,652
BN009/14	10 mg/ml	6,655
BN008/14	Placebo	6,661

Se encontró que las tres formulaciones activas y el placebo tenían un pH de 6,7 en el momento de tiempo de doce meses. No se observó cambio desde el momento de tiempo inicial.

#### Ensayo

La prueba del ensayo se realizó por duplicado. Los parámetros del método clave se resumen del siguiente modo:

<b>Fase móvil</b>	Acetonitrilo: agua: TFA 45:55:0,1
<b>Columna</b>	Waters X-Bridge phenyl, 3,5 µm, 150 × 4,6 mm (Número de pieza 186003335)
<b>Temperatura de la columna</b>	40 °C
<b>Caudal</b>	1,5 ml/min
<b>Volumen de inyección</b>	10 µl
<b>Detección</b>	UV, 254 nm
<b>Tiempo de ejecución</b>	6 minutos
<b>Temperatura del inyector automático</b>	Ambiente
<b>Concentración de patrón</b>	0,1 mg/ml

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17				
Número de lote	Concentración	Prep 1	Prep 2	Media
BN011/14	0,5 mg/ml	0,5180	0,5178	<b>0,52</b>
BN010/14	2,5 mg/ml	2,6541	2,6407	<b>2,65</b>
BN009/14	10 mg/ml	10,4219	10,4926	<b>10,46</b>

Los resultados del ensayo para las suspensiones activas de cada concentración en el momento de tiempo de doce meses no mostraron ningún cambio desde el momento de tiempo inicial.

#### Sustancias relacionadas

La determinación de sustancias relacionadas se realizó por duplicado. Los parámetros del método clave se resumen del siguiente modo.

<b>Fase móvil</b>	A - Agua purificada/Acetonitrilo/TFA (95/5/0,1). B - Acetonitrilo/Agua/TFA (95/5/0,1).		
<b>Columna</b>	X-Bridge Phenyl 4,6 x 150 mm 3,5 µm tamaño de partícula (antiguamente - Waters; N.º186003335)		
<b>Temperatura de la columna</b>	30 °C		
<b>Temperatura del inyector automático</b>	Ambiente		
<b>Caudal</b>	1,0 ml/min		
<b>Volumen de inyección</b>	10 µl		
<b>Detección</b>	UV, 254 nm		
<b>Gradiente</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>% de A</b>	<b>% de B</b>
	0	100	0
	2	100	0
	15	0	100
	25	0	100
	27	100	0
	37	100	0
<b>Diluyente</b>	Acetonitrilo : Agua (50 : 50)		
<b>Concentración de muestra</b>	0,2 mg/ml		
<b>Concentración de patrón</b>	2 µg/ml		

Los resultados de la determinación de sustancias relacionadas de las suspensiones se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18 - Resultados del análisis de sustancias relacionadas de suspensiones de RPL554 (como % de LC)  
Lote BN011/14 - (0,5 mg/ml) - 25 °C/60 % de HR

TRR	% de LC		Media
	T1	T2	
0,78	0,0776	0,0764	0,08
0,86	0,1028	0,1046	0,10
0,92	0,2084	0,2101	0,21
0,93	0,1875	0,1846	0,19
1,09	0,0548	0,0562	0,06
1,11	0,4130	0,4142	0,41
Total			1,05

Lote BN010/14- (2,5 mg/ml) - 25 °C/60 % de HR

TRR	% de LC		Media
	T1	T2	
0,77	0,0779	0,0792	0,08
0,85	0,1041	0,1051	0,10
0,92	0,2184	0,2227	0,22
0,93	0,1768	0,1746	0,18
1,11	0,4226	0,4270	0,42
Total			1,00

Lote BN009/14 - (10 mg/ml) - 25 °C/60 % de HR

TRR	% de LC		Media
	T1	T2	
0,78	0,0769	0,0789	0,08
0,86	0,1016	0,1031	0,10
0,92	0,2056	0,2194	0,21
0,93	0,1819	0,1684	0,18
1,11	0,4137	0,4250	0,42
Total			0,99

Los resultados de sustancias relacionadas para las suspensiones activas de cada concentración en el momento de tiempo de doce meses fueron similares al momento de tiempo inicial.

#### 10 Distribución del tamaño de partícula (PSD)

Se realizó el método de distribución del tamaño de partícula usando un Spraytec con los parámetros detallados a continuación.

15 Propiedades ópticas: Partícula: RI (real): 1,50 (partícula opaca estándar); RI (imaginaria): 0,50; Densidad: 1,00; Dispersante (agua); Dispersante RI: 1,33

Dispersante usados para el análisis de muestras: 1 % de polisorbato 20 en agua desionizada

20 Parámetros de la unidad de control: Velocidad del agitador 1000 rpm

Tiempo de medición: Tiempo de muestreo: 30 s; tiempo de fondo: 10 s

Los resultados se muestran en la Tabla 19.

25 Tabla 19 - Resultados de la determinación del tamaño de partícula por difracción láser de suspensiones de RPL554 (en  $\mu\text{m}$ )

Número de lote	Concentración	Dv10	Dv50	Dv90
BN011/14	0,5 mg/ml	0,7946	1,577	3,168
BN010/14	2,5 mg/ml	0,7872	1,589	3,119
BN009/14	10 mg/ml	0,8012	1,566	2,976

30 Los perfiles de distribución del tamaño de partícula fueron similares para las 3 concentraciones en el momento de tiempo de doce meses y no mostraron ningún cambio en comparación con el momento de tiempo inicial.

#### Evaluación microscópica

35 Se realizó evaluación microscópica evaluando visualmente las formulaciones usando un microscopio G3. No se observaron agregados en ninguno de los lotes probados, aunque se observaron ocasionalmente algunos aglomerados



sueltos grandes para las suspensiones de 2,5 mg/ml y 10 mg/ml. La evaluación determinó que no hubo cambio en comparación con el momento de tiempo inicial.

#### *Tasa de administración y dosis administrada total*

- 5 Se realizó la tasa de administración y dosis administrada total en 3 viales por lote. Se dispensaron las suspensiones y se administraron usando una combinación de nebulizador PARI LC PLUS® / compresor cPARI TurboBOY S®. Los resultados de la tasa de administración y la dosis administrada total se presentan en la Tabla 20.

10 *Tabla 20 - Resultados de la determinación de la tasa de administración y dosis total administrada usando el nebulizador PARI LC PLUS*

Lote BN011/14 0,5 mg/ml			
Número de duplicados	T1	T2	T3
Peso inicial (g)	36,8175	36,7852	36,8030
Peso final (g)	32,6399	32,7369	32,6272
Masa administrada (g)	4,1776	4,0483	4,1758
Tiempo de administración total (s)	900	1020	960
Tasa de administración (mg/min) (durante los primeros min)	0,136	0,130	0,137
Tasa de administración media (mg/min)	0,1		
Ensayo* (mg)	1,179	1,144	1,198
Medio de ensayo* (mg)	1,2		
% de eficiencia	54,50	54,56	55,39
% de eficiencia media	54,8		
Lote BN010/14 2,5 mg/ml			
Número de duplicados	T1	T2	T3
Peso inicial (g)	37,0977	38,7543	37,2942
Peso final (g)	32,8590	34,9311	32,9187
Masa administrada (g)	4,2387	4,3632	4,3755
Tiempo de administración total (s)	1020	1020	1020
Tasa de administración (mg/min) (durante los primeros min)	0,303	0,229	0,335
Tasa de administración media (mg/min)	0,3		
Ensayo* (mg)	6,212	6,684	6,565
Medio de ensayo* (mg)	6,5		
% de eficiencia	55,36	57,86	56,68
% de eficiencia media	56,6		
Lote BN009/14 10 mg/ml			
Número de duplicados	T1	T2	T3
Peso inicial (g)	36,9365	38,4396	37,0922
Peso final (g)	32,6608	34,2031	32,7858
Masa administrada (g)	4,2757	4,2365	4,3064
Tiempo de administración total (s)	1080	1140	1080
Tasa de administración (mg/min) (durante los primeros min)	1,326	1,095	1,221
Tasa de administración media (mg/min)	1,2		
Ensayo* (mg)	24,279	24,168	24,705
Medio de ensayo* (mg)	24,4		
% de eficiencia	54,30	54,55	54,86
% de eficiencia media	54,6		
* ensayo es total administrado			
El % de eficiencia es la dosis real total administrada/dosis teórica administrada (calculada usando la masa administrada y la concentración de formulación del ensayo)			

- 15 La dosis administrada total y la tasa de administración para todas las concentraciones fueron similares al momento de tiempo inicial. La eficiencia de administración de todas las suspensiones estuvo de acuerdo con momentos de tiempo previos.

#### *Distribución del tamaño de partícula aerodinámica (APSD)*

- 20 Se realizó la determinación de la distribución del tamaño de partícula aerodinámica (APSD) en 3 viales por lote por condición usando Next Generation Impactor (NGI). Las suspensiones se dispensaron y administraron usando una combinación de nebulizador PARI LC PLUS® / compresor PARI TurboBOY S®. Los resultados de la determinación de APSD se presentan en la Tabla 21. Los resultados se entraron en el programa CITDAS (versión 3.10) para calcular

la dosis de partícula finas usando un valor de corte de 5 µm y los resultados obtenidos de los cálculos también se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21 - Resultados de la distribución del tamaño de partícula aerodinámica por NGI (como mg de RPL554) usando el nebulizador PARI LC PLUS

<b>Lote BN011/14 - (0,5 mg/ml) 25 °C/60 % de HR</b>				
<b>Etapas</b>	<b>NGI1</b>	<b>NGI 2</b>	<b>NGI 3</b>	<b>Media</b>
Garganta	0,05495	0,09324	0,08583	<b>0,08</b>
Etapas 1	0,13433	0,12798	0,12692	<b>0,13</b>
Etapas 2	0,26114	0,18827	0,22637	<b>0,23</b>
Etapas 3	0,40347	0,29208	0,39028	<b>0,36</b>
Etapas 4	0,49538	0,41178	0,46929	<b>0,46</b>
Etapas 5	0,23507	0,24668	0,29097	<b>0,26</b>
Etapas 6	0,07792	0,06313	0,08504	<b>0,08</b>
Etapas 7	0,01105	0,01100	0,01525	<b>0,01</b>
MOC	0,00034	0,00169	0,00151	<b>0,00</b>
Suma	1,67365	1,43585	1,69147	1,60
Masa administrada (g)	4,2864	4,1465	4,2623	4,23
FPD ≤ 5µm*	0,735	0,667	0,785	0,7
FPD/masa administrada (mg/g)	0,171	0,161	0,184	0,2
FPF (FPD como % de dosis total) < 5 µm*	43,9	46,4	46,4	45,6
GSD*	2,0	2,2	2,0	2,1
MMAD*	5,3	5,0	5,1	5,2
<b>Lote BN010/14 - (2,5 mg/ml) 25 °C/60 % de HR</b>				
<b>Etapas</b>	<b>NGI1</b>	<b>NGI 2</b>	<b>NGI 3</b>	<b>Media</b>
Garganta	0,35731	0,43867	0,47848	<b>0,42</b>
Etapas 1	0,71616	1,04125	0,93292	<b>0,90</b>
Etapas 2	1,28121	1,58441	1,43900	<b>1,43</b>
Etapas 3	1,98259	2,21051	1,95403	<b>2,05</b>
Etapas 4	2,41709	2,37565	2,23993	<b>2,34</b>
Etapas 5	1,69766	1,45824	1,39429	<b>1,52</b>
Etapas 6	0,54927	0,43922	0,37542	<b>0,45</b>
Etapas 7	0,07994	0,07293	0,06443	<b>0,07</b>
MOC	0,00163	0,00151	0,00540	<b>0,00</b>
Suma	9,08286	9,62239	8,88390	9,20
Masa administrada (g)	4,3881	4,5659	4,3137	4,42
FPD ≤ 5 µm*	4,356	3,945	3,702	4,0
FPD/masa administrada (mg/g)	0,993	0,864	0,858	0,9
FPF (FPD como % de dosis total) ≤ 5 µm*	48,0	41,0	41,7	43,5
GSD*	2,1	2,1	2,1	2,1
MMAD*	5,0	5,7	5,5	5,4
<b>Lote BN009/14 - (10 mg/ml) 25 °C/60 % de HR</b>				
<b>Etapas</b>	<b>NGI 1</b>	<b>NGI 2</b>	<b>NGI 3</b>	<b>Media</b>
Garganta	1,82141	1,46478	1,70097	<b>1,66</b>
Etapas 1	2,99033	3,28692	3,75069	<b>3,34</b>
Etapas 2	5,51909	6,88069	7,01532	<b>6,47</b>
Etapas 3	8,46593	10,48679	10,09839	<b>9,68</b>
Etapas 4	9,42726	10,16201	9,36013	<b>9,65</b>
Etapas 5	6,30967	4,85282	4,67990	<b>5,28</b>
Etapas 6	1,84396	0,98008	1,00599	<b>1,28</b>
Etapas 7	0,28335	0,13666	0,12275	<b>0,18</b>
MOC	0,00383	0,00710	0,00108	<b>0,00</b>
Suma	36,66483	38,25785	37,73522	37,55
Masa administrada (g)	4,3787	4,6309	4,4044	4,47
FPD ≤ 5 µm*	16,313	14,318	13,490	14,7
FPD/masa administrada (mg/g)	3,726	3,092	3,063	3,3
FPF (FPD como % de dosis total) ≤ 5 µm*	44,5	37,4	35,7	39,2
GSD*	2,0	1,9	1,9	2,0
MMAD*	5,3	5,9	6,1	5,8

(continuación)

\* calculada usando CITDAS en datos sin redondear. Abreviaturas: FPD: dosis de partículas finas; FPF: fracción de partículas finas; GSD: distribución de tamaño geométrico; MMAD: mediana del diámetro aerodinámico de la masa; MOC: colector de micro-orificio.

*Estabilidad a los 12 meses*

- 5 Las Tablas 22 (para 0,5 mg/ml), 23 (para 2,5 mg/ml) y 24 (para 10 mg/ml) a continuación combinan los datos de 12 meses descritos anteriormente con los datos correspondientes para los momentos de tiempo de 1, 3 y 6 meses para las formulaciones en suspensión de RPL554 de la invención.

- 10 (Nota: Picos de impureza marcados con \* en las Tablas 22, 23 y 24 se observaron como un doblete, pero habían sido observados como un pico único en el momento de tiempo inicial. Esto es probablemente debido a que se usó una nueva columna que dio mejor separación y no se cree que sea un signo de degradación.)

**Resumen**

- 15 Se fabricaron suspensiones de RPL554 para nebulización a 0,5 mg/ml (BN011/14), 2,5 mg/ml (BN010/14) y 10 mg/ml (BN009/14) y placebo asociado (BN008/14) y se pusieron en estabilidad a 25 °C/60 % de HR y se probaron en el momento de tiempo de 12 meses.

- 20 Los resultados mostraron que esencialmente no hubo cambio en ninguno de los lotes probados en el momento de tiempo de 12 meses y confirmaron que las suspensiones de RPL554 para nebulización fueron estables durante 12 meses a 25 °C/60 % de HR.

<b>Tabla 22 (0,5 mg/ml) Prueba</b>	<b>Inicial</b>	<b>1 mes</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>12 meses</b>
<b>Condición de almacenamiento</b>	<b>N/A</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>
Aspecto	Suspensiones amarillas pálidas libres de aglomerados visibles	Suspensiones amarillas pálidas libres de aglomerados visibles	Suspensiones amarillas pálidas libres de aglomerados visibles	Suspensiones amarillas pálidas libres de aglomerados visibles	Suspensiones amarillas pálidas libres de aglomerados visibles
pH	6,7	6,7	6,6	6,6	6,7
Medio de ensayo (n=2) (mg/ml)	0,51	0,51	0,52	0,52	0,52
Impurezas medias (n=2) (% de LC)					
Total	0,98	1	0,89	0,95	1,05
Mayor	0,39 (TRR 1,11)	0,23 (TRR 0,92)	0,38 (TRR 1,10)	0,38 (TRR 1,10)	0,41 (TRR 1,11)
Segundo mayor	0,23 (TRR 0,92)	0,20 (TRR 1,11)* 0,18 (TRR 1,10)*	0,22 (TRR 0,92)	0,22 (TRR 0,93)	0,21 (TRR 0,92)
PSD (µm)	Dv10= 0,7646	Dv10= 0,7721	Dv10= 0,7823	Dv10= 0,8036	Dv10= 0,7946
	Dv50= 1,534	Dv50= 1,542	Dv50= 1,56	Dv50= 1,585	Dv50= 1,577
	Dv90= 2,999	Dv90= 2,991	Dv90= 3,084	Dv90= 3,158	Dv90= 3,168
FPD media (mg)	0,4	0,6	0,6	0,6	0,7
FPD media/masa administrada (n=3) (mg/g)	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2
MMAD media (n=3)	5,4	5,7	5,4	5,6	5,2
GSD media (n=3)	2	2	2,1	2	2,1
Peso medio de llenado del vial (n=5) (g)	5,0 (n=10)	5,1	5,1	5,1	5,1
Dosis administrada total media (n=3) (mg)	1,1	1,1	1,2 (n=5)	1	1,2

(continuación)

<b>Tabla 22 (0,5 mg/ml) Prueba</b>	<b>Inicial</b>	<b>1 mes</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>12 meses</b>
<b>Condición de almacenamiento</b>	<b>N/A</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>
Tasa de administración media (n=3) (mg/min) (durante los primeros dos min)	0,1	0,1	0,1 (n=5)	0,1	0,1
% de eficiencia media (n=3)	53,8	55,5	56,0 (n=5)	51,4	54,8

<b>Tabla 23 (2,5 mg/ml) Prueba</b>	<b>Inicial</b>	<b>1 mes</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>12 meses</b>
<b>Condición de almacenamiento</b>	<b>N/A</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>
Aspecto	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles
pH	6,7	6,7	6,7	6,6	6,7
Medio de ensayo (n=2) (mg/g)	2,6	2,57	2,64	2,63	2,65
Impurezas medias (n=2) (% de LC)					
Total	1,02	0,92	0,89	0,98	1
Mayor	0,41 (TRR 1,10)	0,23 (TRR 0,92)	0,39 (TRR 1,10)	0,41 (TRR 1,10)	0,42 (TRR 1,11)
Segundo mayor	0,23 (TRR 0,92)	0,20 (TRR 1,11)* 0,18 (TRR 1,10)*	0,22 (TRR 0,93)	0,23 (TRR 0,93)	0,22 (TRR 0,92)
PSD (µm)	Dv10= 0,7964	Dv10= 0,7981	Dv10=0,7943	Dv10=0,7851	Dv10=0,7872
	Dv50= 1,586	Dv50= 1,569	Dv50= 1,561	Dv50= 1,583	Dv50= 1,589
	Dv90= 3,075	Dv90= 3	Dv90=2,98	Dv90=3,099	Dv90=3,119
FPD media (mg)	3	3,1	3,4	3,5	4
FPD media/masa administrada (n=3) (mg/g)	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9
MMAD media (n=3)	6,0	6,1	5,8	6	5,4
GSD media (n=3)	1,9	1,9	1,9	2	2,1
Uniformidad media del contenido del vial (n=10)	Pasan EP 2.9.6 y 2.9.40	N/A	N/A	N/A	N/A
Peso medio de llenado del vial (n=5) (g)	5,1 (n=10)	5,2	5,2	5,3	5,3
Dosis administrada total media (n=3) (mg)	6	6,2	4,5	5,7	6,5
Tasa de administración media (n=3) (mg/min) (durante los primeros min)	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3
% de eficiencia media (n=3)	56,3	55,5	41,2	55	56,6

<b>Tabla 24 (10 mg/ml) Prueba</b>	<b>Inicial</b>	<b>1 mes</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>12 meses</b>
<b>Condición de almacenamiento</b>	<b>N/A</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>	<b>25 °C/60 % de HR</b>
Aspecto	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles
pH	6,7	6,7	6,7	6,6	6,7
Medio de ensayo (n=2) (mg/ml)	10,24	10,16	10,28	10,23	10,46
Impurezas medias (n=2) (% de LC)					
Total	0,98	0,92	0,89	0,97	0,99
Mayor	0,40 (TRR 1,11)	0,23 (TRR 0,92)	0,39 (TRR 1,10)	0,41 (TRR 1,10)	0,42 (TRR 1,11)
Segundo mayor	0,23 (TRR 0,92)	0,21 (TRR 1,11)* 0,18 (TRR 1,10)*	0,22 (TRR 0,93)	0,22 (TRR 0,93)	0,21 (TRR 0,92)
PSD (µm)	Dv10= 0,7884	Dv10= 0,7877	Dv10= 0,7954	Dv10= 0,7756	Dv10= 0,8012
	Dv50= 1,564	Dv50= 1,55	Dv50= 1,545	Dv50= 1,558	Dv50= 1,566
	Dv90= 3,02	Dv90= 2,965	Dv90= 2,909	Dv90= 3,059	Dv90= 2,976
FPD media (mg)	12,2	12,7	14,2	13,3	14,7
FPD media/masa administrada (n=3) (mg/g)	2,9	3	3,1	2,2 (n=2)	3,3
MMAD media (n=3)	6,1	5,9	6	5,7 (n=2)	5,8
GSD media (n=3)	1,9	1,9	1,9	2,0 (n=2)	2
Uniformidad media del contenido del vial (n=10)	Pasan EP 2.9.6 y 2.9.40	N/A	N/A	N/A	N/A
Peso medio de llenado del vial (n=5) (g)	5,2 (n= 10)	5,1	5,1	5,1	5,1
Dosis administrada total media (n=3) (mg)	25,5	23,4	26,4	22,7	24,4
Tasa de administración media (n=3) (mg/min) (durante los primeros min)	1,3	1,4	1,4	1,2	1,2
% de eficiencia media (n=3)	57,3	52,8	56,7	53,5	54,6

**Ejemplo de referencia 9** - análisis a los seis meses en condiciones aceleradas (40 °C/75 % de HR)

Los estudios de estabilidad acelerada a 40 °C/75 % de HR también continuaron hasta el sexto mes. Los resultados de éstos se muestran en la Tabla 25 (para 0,5 mg/ml), Tabla 26 (para 2,5 mg/ml) y Tabla 27 (para 10 mg/ml).

(Como se indicó en el Ejemplo 8, los picos de impureza marcados con \* se observaron como un doblete, pero habían sido observados como un pico único en el momento de tiempo inicial. Esto es probablemente debido a que se usó una nueva columna que dio mejor separación y no se cree que sea un signo de degradación.)

Los resultados mostraron que esencialmente no hubo cambio en ninguno de los lotes probados en el momento de tiempo de 6 meses y confirmaron que las suspensiones de RPL554 para nebulización tienen excelente estabilidad, siendo estables durante 6 meses a 40 °C/75 % de HR.

<b>Tabla 25 (0,5 mg/ml) Prueba</b>	<b>Inicial</b>	<b>1 mes</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>
<b>Condición de almacenamiento</b>	<b>N/A</b>	<b>40 °C/75 % de HR</b>	<b>40 °C/75 % de HR</b>	<b>40 °C/75 % de HR</b>
Aspecto	Suspensiones amarillas pálidas libres de aglomerados visibles	Suspensiones amarillas pálidas libres de aglomerados visibles	Suspensiones amarillas pálidas libres de aglomerados visibles	Suspensiones amarillas pálidas libres de aglomerados visibles
pH	6,7	6,7	6,6	6,6
Medio de ensayo (n=2) (mg/ml)	0,51	0,51	0,52	0,52
Impurezas medias (n=2) (% de LC)				
Total	0,98	0,9	0,9	0,98
Mayor	0,39 (TRR 1,11)	0,23 (TRR 0,92)	0,37 (TRR 1,10)	0,37 (TRR 1,10)
Segundo mayor	0,23 (TRR 0,92)	0,20 (TRR 1,11)* 0,18 (TRR 1,10)*	0,22 (TRR 0,92)	0,22 (TRR 0,93)
PSD (µm)	Dv10= 0,7646	Dv10= 0,7902	Dv10= 0,7749	Dv10= 0,8324
	Dv50= 1,534	Dv50= 1,56	Dv50= 1,586	Dv50= 1,573
	Dv90= 2,999	Dv90= 3,026	Dv90= 3,335	Dv90= 2,899
FPD media (mg)	0,4	0,6	0,7	0,6
FPD media/masa administrada (n=3) (mg/g)	0,1	0,2	0,2	0,1
MMAD media (n=3)	5,4	5,8	5,3	5,5
GSD media (n=3)	2	1,9	2	2,1
Uniformidad media del contenido del vial (n=10)	Pasan EP 2.9.6 y 2.9.40	N/A	N/A	N/A
Peso medio de llenado del vial (n=5) (g)	5,0 (n=10)	5,1	5,1	5,1
Dosis administrada total media (n=3) (mg)	1,1	1,1	1,2	1,1
Tasa de administración media (n=3) (mg/min) (durante los primeros dos min)	0,1	0,1	0,1	0,1
% de eficiencia media (n=3)	53,8	55,1	54,3	53,4

<b>Tabla 26 (2,5 mg/ml) Prueba</b>	<b>Inicial</b>	<b>1 mes</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>
<b>Condición de almacenamiento</b>	<b>N/A</b>	<b>40 °C/75 % de HR</b>	<b>40 °C/75 % de HR</b>	<b>40 °C/75 % de HR</b>
Aspecto	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerado visible	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles
pH	6,7	6,7	6,6	6,6
Medio de ensayo (n=2) (mg/ml)	2,6	2,58	2,64	2,63
Impurezas medias (n=2) (% de LC)				
Total	1,02	0,92	0,9	0,99
Mayor	0,41 (TRR 1,10)	0,23 (TRR 0,92)	0,38 (TRR 1,10)	0,40 (TRR 1,10)
Segundo mayor	0,23 (TRR 0,92)	0,20 (TRR 1,11)* 0,18 (TRR 1,10)*	0,22 (TRR 0,93)	0,23 (TRR 0,93)
PSD (µm)	Dv10= 0,7964	Dv10= 0,7861	Dv10= 0,7994	Dv10= 0,7997
	Dv50= 1,586	Dv50= 1,563	Dv50= 1,577	Dv50= 1,614
	Dv90= 3,075	Dv90= 3,023	Dv90= 3,058	Dv90= 3,183
FPD media (mg)	3	3,2	3,6	3,6
FPD media/masa administrada (n=3) (mg/g)	0,7	0,8	0,8	0,8
MMAD media (n=3)	6	6	5,7	5,9

(continuación)

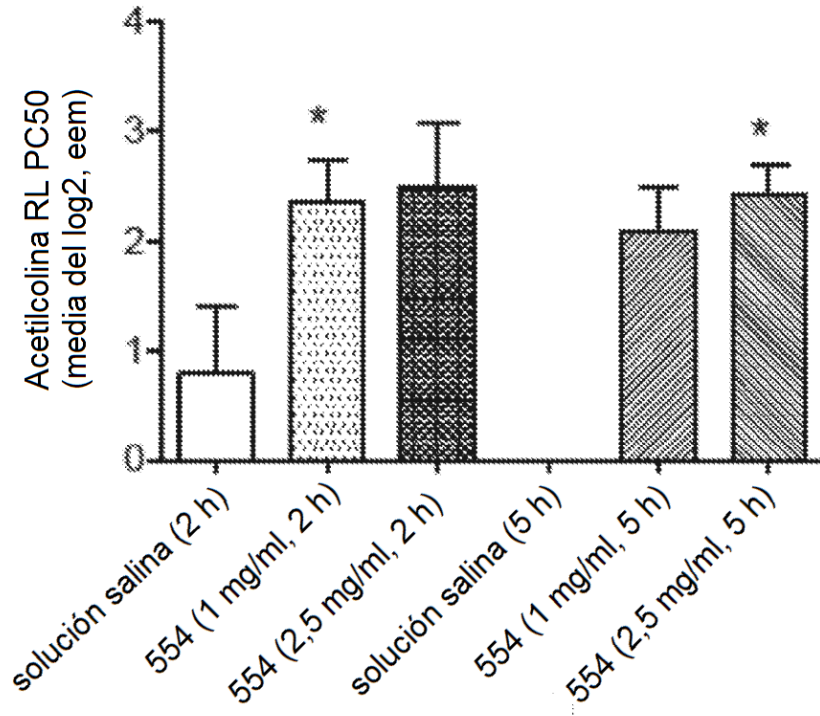
<b>Tabla 26 (2,5 mg/ml) Prueba</b>	<b>Inicial</b>	<b>1 mes</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>
<b>Condición de almacenamiento</b>	<b>N/A</b>	<b>40 °C/75 % de HR</b>	<b>40 °C/75 % de HR</b>	<b>40 °C/75 % de HR</b>
GSD media (n=3)	1,9	1,9	2	2
Uniformidad media del contenido del vial (n=10)	Pasan EP 2.9.6 y 2.9.40	N/A	N/A	N/A
Peso medio de llenado del vial (n=5) (g)	5,1 (n=10)	5,3	5,3	5,3
Dosis administrada total media (n=3) (mg)	6	6,1	5,6	6,4
Tasa de administración media (n=3) (mg/min) (durante los primeros min)	0,3	0,3	0,3	0,4
% de eficiencia media (n=3)	56,3	56,1	50,5	56,3
<b>Tabla 27 (10 mg/ml) Prueba</b>	<b>Inicial</b>	<b>1 mes</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>
<b>Condición de almacenamiento</b>	<b>N/A</b>	<b>40 °C/75 % de HR</b>	<b>40 °C/75 % de HR</b>	<b>40 °C/75 % de HR</b>
Aspecto	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles	Suspensión amarilla libre de aglomerados visibles
pH	6,7	6,7	6,6	6,6
Medio de ensayo (n=2) (mg/ml)	10,24	10,1	10,41	10,37
Impurezas medias (n=2) (% de LC)				
Total	0,98	0,97	0,89	0,98
Mayor	0,40 (TRR 1,11)	0,23 (TRR 0,92)	0,38 (TRR 1,10)	0,40 (TRR 1,10)
Segundo mayor	0,23 (TRR 0,92)	0,21 (TRR 1,11)* 0,18 (TRR 1,10)*	0,23 (TRR 0,93)	0,23 (TRR 0,93)
PSD (µm)	Dv10= 0,7884	Dv10= 0,7906	Dv10= 0,7882	Dv10= 0,7757
	Dv50= 1,564	Dv50= 1,554	Dv50= 1,565	Dv50= 1,553
	Dv90= 3,02	Dv90= 2,971	Dv90= 3,024	Dv90= 3,015
FPD media (mg)	12,2	13,1	14,5	13,4
FPD media/masa administrada (n=3) (mg/g)	2,9	3,1	3,4	3,1
MMAD media (n=3)	6,1	5,8	5,8	5,7
GSD media (n=3)	1,9	1,9	2	2
Uniformidad media del contenido del vial (n=10)	Pasan EP 2.9.6 y 2.9.40	N/A	N/A	N/A
Peso medio de llenado del vial (n=5) (g)	5,2 (n=10)	5,2	5,1	5,1
Dosis administrada total media (n=3) (mg)	25,5	24,1	26,9	22,8
Tasa de administración media (n=3) (mg/min) (durante los primeros min)	1,3	1,3	1,2	1,3
% de eficiencia media (n=3)	57,3	54,3	56,2	51,6

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica líquida adecuada para la administración por inhalación que comprende un diluyente y una suspensión de partículas de 9,10-dimetoxi-2- (2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,l-a]isoquinolin-4-ona (RPL554) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:  
 las partículas de RPL554 tienen una distribución de tamaño de partícula con un valor Dv50 (tamaño medio de partícula en volumen) de 0,2 mm a 5 mm; y  
 la composición comprende un tampón fosfato a una concentración de 0 mg/ml a 5 mg/ml.
- 10 2. Una composición farmacéutica líquida según la reivindicación 1, en donde la composición no comprende un tampón fosfato.
- 15 3. Una composición farmacéutica líquida según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la composición no comprende un tampón.
- 20 4. Una composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las partículas de RPL554 tienen una distribución de tamaño de partícula con un valor de Dv50 de 0,7 mm a 2,5 mm.
- 25 5. Una composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de partículas de RPL554 en la composición farmacéutica líquida es de 0,01 mg/ml a 40 mg/ml.
6. Una composición farmacéutica líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende uno o más tensioactivos.
- 30 7. Una composición farmacéutica líquida de acuerdo con la reivindicación 6, en donde uno o más tensioactivos se seleccionan entre uno o más tensioactivos no iónicos.
8. Una composición farmacéutica líquida de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde uno o más tensioactivos se seleccionan entre ésteres de alquilo de sorbitán y polioxietilenglicol y ésteres de alquilo de sorbitán.
- 35 9. Una composición farmacéutica líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende además un ajustador de tonicidad, en el que opcionalmente el ajustador de tonicidad es cloruro de sodio.
- 40 10. Una composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el diluyente es agua.
11. Una composición farmacéutica líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es adecuada para la administración mediante nebulizador.
- 45 12. Un nebulizador que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
13. Una composición farmacéutica líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal.
- 50 14. Una composición farmacéutica líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección seleccionada entre asma, asma alérgica, fiebre del heno, rinitis alérgica, bronquitis, enfisema, bronquiectasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), asma resistente a los esteroides, asma grave, asma pediátrica, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial, trastornos de la piel, dermatitis atópica, psoriasis, inflamación ocular, isquemia cerebral, enfermedades inflamatorias y Enfermedades autoinmunes.
- 55 15. Una composición farmacéutica líquida para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la enfermedad o afección es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

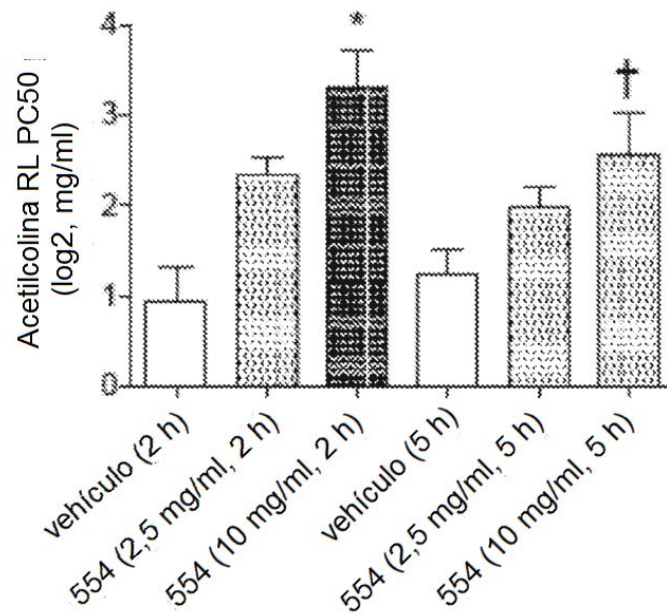


### Transformación de RL PC50 en 2 h y 5 h

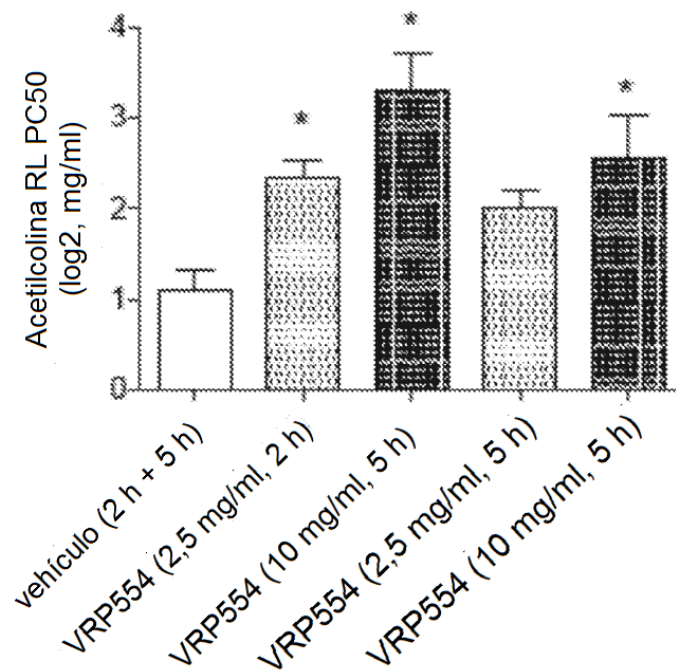


**Figura 1**

**Transformación de RL PC50 por grupo**



**Datos de control combinados de log RL PC50**



**Figura 2**

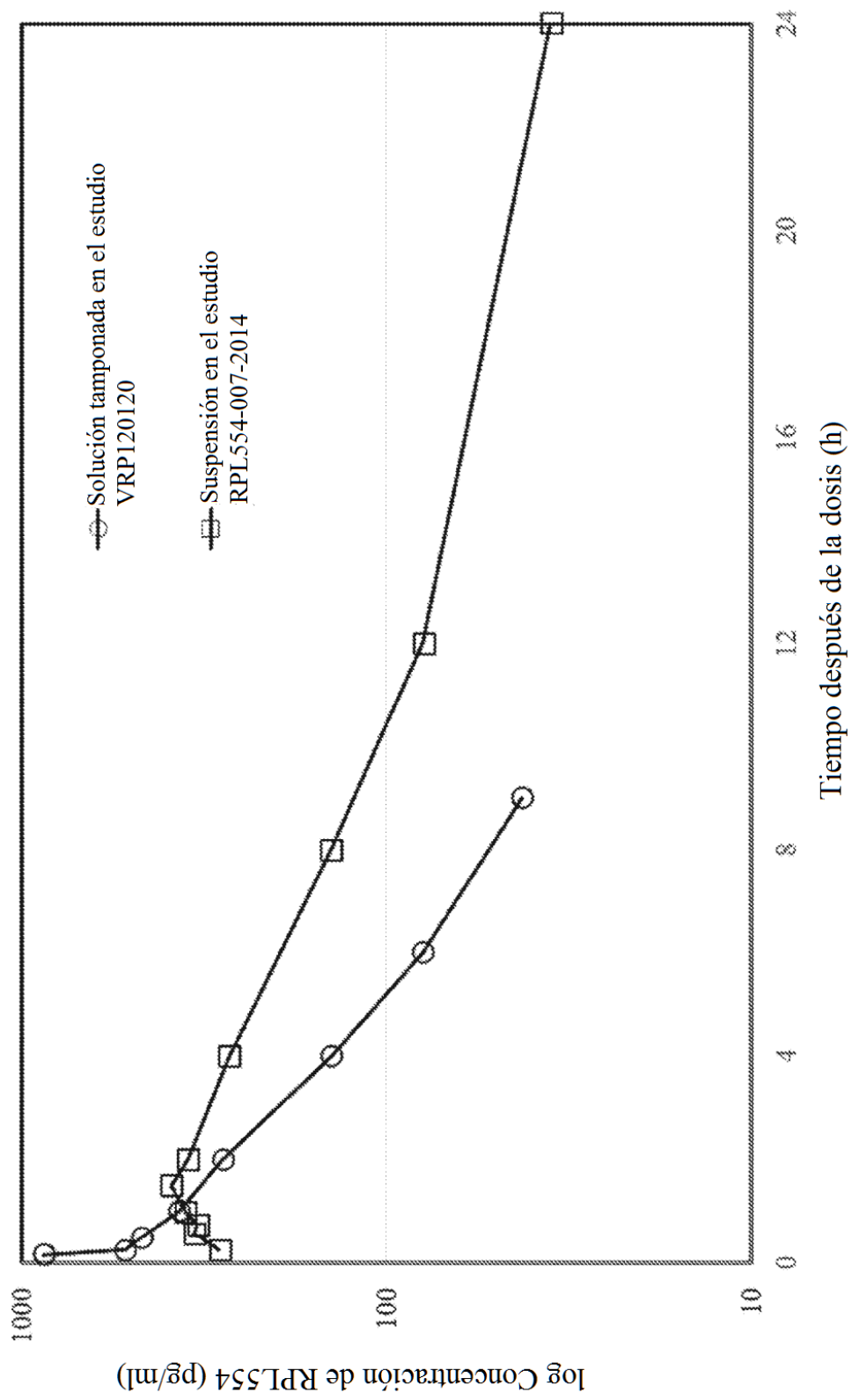


Figura 3