



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 965 017**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 31/145** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 9/16** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2017** PCT/GB2017/051637  
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017** WO17212249  
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2017** E 17735616 (9)  
⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2023** EP 3463325

⑮ Título: **Micropartículas que comprenden un compuesto que contiene azufre**

⑯ Prioridad:

**07.06.2016 US 201662346969 P**  
**07.06.2016 GB 201609940**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.04.2024**

⑯ Titular/es:

**NOVABIOTICS LIMITED (100.0%)**  
**Unit 3 Silverburn Crescent Bridge of Don**  
**Aberdeen AB23 8EW, GB**

⑯ Inventor/es:

**O'NEIL, DEBORAH**

⑯ Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 965 017 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

Micropartículas que comprenden un compuesto que contiene azufre

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a micropartículas que comprenden cisteamina o cistamina o una sal, hidrato o éster farmacéuticamente aceptable de las mismas para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad respiratoria que tiene un elemento mucoso o infeccioso de acuerdo con las reivindicaciones. La invención también 10 se refiere a un dispositivo de inhalación de acuerdo con las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

15 La fibrosis quística (CF) es un trastorno multisistémico causado por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que se localiza en el cromosoma.

15 La enfermedad pulmonar es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes según los documentos de CF: Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154:1229; Goss CH, Rosenfeld M. Update on cystic fibrosis epidemiology; Curr Opin Pulm Med 2004; 10:510; Brennan AL, Geddes DM. Cystic fibrosis. Curr Opin Infect Dis 2002; 15:175; Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and 20 management of pulmonary infections in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2003; 168:918.

Uno de los principales impulsores de la enfermedad pulmonar por CF es la infección (documento Sagel SD, Gibson RL, Emerson J, y otros. Impact of Pseudomonas and Staphylococcus infection on inflammation and clinical status in 25 young children with cystic fibrosis. J Pediatr 2009; 154:183; Cystic Fibrosis Foundation Annual Patient Registry 2013. Disponible en: <http://www.cff.org/research/ClinicalResearch/PatientRegistryReport/> (Consultado el 07 de agosto de 2015).

30 El enfoque para tratar la infección en la CF es multifacético e incluye antibióticos, fisioterapia torácica, medicamentos que se inhalan para promover la eliminación de las secreciones y agentes antiinflamatorios. Indudablemente, el mejor uso de antibióticos es responsable de una porción sustancial del aumento de la supervivencia que se produce en los pacientes con CF (documento Brennan AL, Geddes DM. Cystic fibrosis. Curr Opin Infect Dis 2002; 15:175; Sagel SD, Gibson RL, Emerson J, y otros. Impact of Pseudomonas and Staphylococcus infection on inflammation and clinical status in young children with cystic fibrosis. J Pediatr 2009; 154:183).

35 Es necesario mejores terapias para tratar y prevenir enfermedades/afecciones pulmonares, en particular aquellas asociadas con entornos ricos en mucosas, tal como el pulmón con CF. Además, es necesario limitar la cantidad o las dosis de antibióticos que se usan con la introducción de nuevas terapias de reemplazo o tratamientos complementarios que puedan mejorar la eficacia de los tratamientos actualmente disponibles en el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas, en particular en el pulmón con CF.

40 40 El documento BE Buchan, 1 de agosto de 2011, p1-223 en URL: <https://core.ac.uk/download/pdf/1576> describe estudios de una formulación de cisteamina para el tratamiento de la cistinosis nefropática.

45 45 El documento BE Buchan, 1 de enero de 2010, en URL: <https://www.cystinosis.org.uk/wp-content/uploads> describe la formulación y evaluación de polvo seco para administración pulmonar en cistinosis. Charrier y otros, Orphanet Journal of Rare Diseases, 30 de noviembre de 2014, vol. 9, núm. 1 p189, describe la cisteamina (Lynovex), un nuevo agente antimicrobiano y antibiopelícula mucoactivo para el tratamiento de la fibrosis quística.

50 50 Sorprendentemente, hemos demostrado que las micropartículas proporcionan un modo útil de administración de cisteamina a pacientes con enfermedad pulmonar.

Declaraciones de la Invención

55 55 En un primer aspecto de la invención se proporciona una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

En otro aspecto de la invención se proporciona un dispositivo de inhalación de acuerdo con la reivindicación 13.

60 60 Los compuestos de la invención pueden administrarse en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto precursor que contiene una porción básica o ácida mediante los métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden prepararse al hacer reaccionar las formas ácidas o bases libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren los medios no acuosos como el éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Listas de sales adecuadas se encuentran en el documento Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ma ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., US, 1985, p. 1418, ver también Stahl y otros, Eds, "Handbook of Pharmaceutical

5 Salts Properties Selection and Use", Verlag Helvetica Chimica Acta and Wiley-VCH, 2002. La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente descripción para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos o, en su caso, un animal sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación razonable de beneficio/riesgo.

10 La invención incluye así sales aceptables farmacéuticamente de los compuestos que se reivindican en donde el compuesto precursor se modifica para hacer sales ácidas o básicas del mismo por ejemplo las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario que se forman, por ejemplo, a partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de tales sales de ácidos de adición incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, pícrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales de bases incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de diciclohexilamina, N-metil-D-glutamina, y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, etcétera. Además, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden ser cuaternizados con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruro de metilo, etil, propilo, y butilo, bromuros y yoduros; sulfatos de dialquilo como dimetilo, dietilo, dibutilo; y sulfatos de diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y esteariilo, haluros de aralquilo como bromuros de bencilo y fenetilo y otros.

20 25 Las micropartículas tienen un tamaño de partícula de 1 a 8 micras. El tamaño de partícula puede definirse como "diámetro medio en volumen" y, como tal, las micropartículas pueden tener un diámetro medio en volumen de 4 a 8 micras. Las micropartículas pueden tener un diámetro medio en volumen de 2 a 4 micras/micrómetros (2-4  $\mu\text{m}$ ).

30 35 La media es un valor que se calcula similar al concepto de promedio. Los diversos cálculos de medias se definen en varios documentos estándar (ISO 9276-2:2001: Representation of results of particle size analysis - Part 2: Calculation of average particle sizes/diameters and moments from particle size distributions; ASTM E 799-03 Standard Practice for Determining Data Criteria and Processing for Liquid Drop Size Analysis). Existen múltiples definiciones para la media porque el valor medio está asociado con la base del cálculo de la distribución (número, superficie, volumen), ver (TN154, Particle Size Result Interpretation: Number vs. Volume Distributions, disponible en [www.horiba.com/us/particle](http://www.horiba.com/us/particle)) para obtener una explicación de las distribuciones de números, superficies y volúmenes. La ecuación para definir la media del volumen se muestra a más abajo. La mejor manera de pensar en este cálculo es pensar en una tabla de histograma que muestre los límites superior e inferior de  $n$  canales de tamaño junto con el por ciento dentro de este canal. El valor  $D_i$  para cada canal es la media geométrica, la raíz cuadrada de los diámetros superior x inferior. Para el numerador toma la  $D_i$  geométrica a la cuarta potencia multiplicada por el por ciento en ese canal, sumado el de todos los canales. Para el denominador toma la  $D_i$  geométrica a la tercera potencia multiplicada por el por ciento en ese canal, sumado el de todos los canales.

$$45 D[4,3] = \frac{\sum_{i=1}^n D_{i,v_i}^4 p_i}{\sum_{i=1}^n D_{i,v_i}^3 p_i}$$

40 50 El diámetro medio en volumen tiene varios nombres, que incluye D4,3 o D50/D90.

55 Como se usa en la presente descripción, los términos "diámetro" o "d" en referencia a partículas se refieren al tamaño de partícula promedio en número, a menos que se especifique de cualquier otra manera. Más abajo se muestra un ejemplo de una ecuación que puede usarse para describir el tamaño de partícula promedio en número:

$$d = \frac{\sum_{i=1}^n n_i d_i}{\sum_{i=1}^n n_i}$$

60 65 donde  $n$ =número de partículas de un diámetro determinado (d).

Como se usa en la presente descripción, los términos "tamaño geométrico", "diámetro geométrico", "tamaño promedio del volumen", "diámetro promedio del volumen" o "d<sup>g</sup>" se refiere al diámetro promedio ponderado en volumen. Más abajo se muestra un ejemplo de ecuaciones que pueden usarse para describir el diámetro promedio del volumen:

$$5 \quad d_g = \left[ \frac{\sum_{i=1}^{\rho} n_i d_i^3}{\sum_{i=1}^{\rho} n_i} \right]^{1/3}$$

Donde n=número de partículas de un diámetro determinado (d).

- 10 Como se usa en la presente descripción, el término "mediana del volumen" se refiere al valor de la mediana del diámetro de la distribución "ponderada en volumen". La mediana es el diámetro para el cual 505 del total son menores y el 50 % son mayores y corresponde a una fracción acumulada del 50 %.
- 15 El análisis del tamaño de partícula geométrico se puede realizar en un contador Coulter, mediante dispersión de luz, mediante microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido o microscopía electrónica de transmitancia, como se conoce en la técnica. Se cree generalmente que el escenario ideal para la administración al pulmón es tener un diámetro aerodinámico < 5 micrómetros. Ver, por ejemplo el documento, Edwards y otros, J Appl. Physiol. 85(2):379-85 (1998); Suárez y Hickey, Respir. Care. 45(6):652-66 (2000).
- 20 Como se usa en la presente descripción, el término "diámetro aerodinámico" se refiere al diámetro equivalente de una esfera con una densidad de 1 g/ml si cayera bajo la gravedad con la misma velocidad que la partícula que se analiza. El diámetro aerodinámico ( $d_a$ ) de una micropartícula está relacionada con el diámetro geométrico ( $d_g$ ) y la densidad de la envoltura ( $\rho_e$ ) por lo siguiente:

25 
$$da = dg \sqrt{\rho_e}$$

- 30 La porosidad afecta la densidad de la envoltura, que a su vez afecta el diámetro aerodinámico. Por lo tanto, la porosidad puede usarse para afectar tanto al lugar donde van las micropartículas en el pulmón como a la velocidad a la que las micropartículas liberan el agente farmacéutico en el pulmón. El asentamiento gravitacional (sedimentación), la impactación inercial, la difusión browniana, la interceptación y la electrostática afectan la deposición de partículas en los pulmones.

- 35 Las micropartículas pueden tener un diámetro aerodinámico de 1 a 8 micras, que incluye 4 a 8 micras. Las micropartículas pueden tener un diámetro aerodinámico de 2 a 4 micras/micrómetros (2-4  $\mu\text{m}$ ).

- 40 El agente estabilizante puede ser un azúcar tal como la trehalosa.

- 45 El agente estabilizante puede ser un alcohol de azúcar que se selecciona del grupo que consiste en lactosa, eritritol, ribitol, xilitol, galactitol, glucitol y manitol. Preferentemente el agente estabilizante es manitol.

- 50 En una composición preferida de la invención, la composición comprende hasta un 20 % p/p de un compuesto que contiene azufre, por ejemplo entre un 1 y un 15 % tal como entre aproximadamente un 5 y un 10 % p/p de un compuesto que contiene azufre. Típicamente, la composición comprende aproximadamente un 5 o un 10 % de compuesto que contiene azufre.

- 55 Como se usa en la presente descripción, el término "aproximadamente" pretende variar la cantidad que se especifica para permitir fluctuaciones menores de entre + o - 10 % de la cantidad que se especifica.

- 60 En una composición preferida de la invención, la composición comprende hasta un 85 % de agente estabilizante. La composición puede comprender entre 80 y 95 % p/p de agente estabilizante, por ejemplo entre 85 y 90 % p/p de agente estabilizante. Típicamente, la composición comprende aproximadamente un 90 % de agente estabilizante.

- 65 Se demostró que en las composiciones de acuerdo con la invención que comprenden trehalosa o manitol, la cisteamina tiene una mayor estabilidad en la formulación.

- 70 En otra modalidad de la invención, el compuesto que contiene azufre es bitartrato de cisteamina.

- 75 La composición de la invención puede comprender además leucina. Sorprendentemente se demostró que la leucina mejora la estabilidad de la formulación. En una modalidad de la invención, la composición comprende entre 1 y 10 % de leucina, preferentemente aproximadamente 5 % de leucina.

- 80 La invención proporciona micropartículas de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad respiratoria que tiene un elemento mucoso o infeccioso.

- 85 Esto incluye la fibrosis quística, específicamente las infecciones pulmonares asociadas con la fibrosis quística y la

enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). El COPD es el nombre de un conjunto de enfermedades pulmonares que incluyen bronquitis crónica, bronquiectasia, enfisema y enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, tos crónica, resfriado común, gripe, hantavirus, neumonía y pleuritis.

- 5 Un aspecto adicional de la invención proporciona una composición (o combinación) terapéutica que puede ser útil en el tratamiento o prevención de una enfermedad respiratoria de acuerdo con las reivindicaciones que comprende una composición y al menos un agente farmacéutico adicional. El agente farmacéutico adicional puede seleccionarse del grupo que consiste en agentes antimicrobianos tales como agentes antivirales, antifúngicos o antibacterianos, por ejemplo antibióticos, agentes mucolíticos, vasodilatadores tales como broncodilatadores, agentes antihipertensivos, fármacos cardiovasculares y bloqueadores de los canales de calcio. Preferentemente el agente farmacéutico adicional es un antibiótico.

10 El término "antibiótico" se usa para referirse a agentes antibacterianos que pueden derivarse de fuentes bacterianas. Los agentes antibióticos pueden ser bactericidas y/o bacteriostáticos.

- 15 15 El agente antibiótico puede contener un anillo β-lactámico. El anillo β-lactámico es parte de la estructura núcleo de varias familias de antibióticos, las principales son las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Estos agentes antibióticos se denominan antibióticos β-lactámicos.

- 20 20 Generalmente el agente antibiótico es del grupo que consiste en aminoglucósidos, ansamicinas, carbacefem, β-lactámicos\_carbapenémicos, cefalosporinas (que incluye cefalosporinas de primera, segunda, tercera, cuarta y quinta generación), penicilina, monobactamas), glicilciclinas, lincosamidas, lipopéptidos, macrólidos, nitrofuranos, oxazolidinonas, quinolonas, sulfonamidas, polipéptidos y tetraciclinas.

- 25 25 El agente antibiótico puede ser del grupo que consiste en aminoglucósidos, ansamicinas, carbacefem, carbapenémicos, cefalosporinas (que incluye cefalosporinas de primera, segunda, tercera, cuarta y quinta generación), lincosamidas, macrólidos, monobactamas, nitrofuranos, quinolonas, penicilina, sulfonamidas, polipéptidos y tetraciclinas. Alternativa o adicionalmente, el agente antibiótico puede ser efectivo contra micobacterias.

- 30 30 30 El agente antibiótico puede ser un aminoglucósido tal como amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, tobramicina o paromomicina.

- 35 35 El agente antibiótico puede ser uno tal como geldanamicina y herbimicina. Alternativamente, el agente antibiótico puede ser un carbacefem tal como Loracarbef.

El agente antibiótico es un carbapenémico tal como ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina o meropenem.

- 40 40 Alternativamente, el agente antibiótico puede ser una cefalosporina (primera generación) tal como cefadroxil, cefazolina, cefalexina, cefalotina o cefalotina, o alternativamente una cefalosporina (segunda generación) tal como cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil o cefuroxima. Alternativamente, el agente antibiótico puede ser una cefalosporina (tercera generación) tal como cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftibuten, ceftizoxima y ceftriaxona o una cefalosporina (cuarta generación) tal como cefepima y ceftobiprol.

- 45 45 El agente antibiótico puede ser una lincosamida tal como clindamicina y azitromicina, o un macrólido tal como azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina y espectinomicina.

Alternativamente, el agente antibiótico puede ser un monobactámico tal como aztreonam, o un nitrofurano tal como furazolidona o nitrofurantoína.

- 50 50 El agente antibiótico puede ser una penicilina tal como amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, nafcilina, oxacilina, penicilina G o V, piperacilina, temocilina y ticarcilina.

El agente antibiótico puede ser una oxazolidinona tal como linezolid o tedizolid.

- 55 55 El agente antibiótico puede ser una sulfonamida tal como mafenida, sulfonamidocrisoidina, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfadiazina de plata, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfanilimida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprima y trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol) (TMP-SMX).

- 60 60 El agente antibiótico puede ser una quinolona tal como ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, grepafloxacina, esparfloxacina y temafloxacina.

- 65 65 El agente antibiótico puede ser un polipéptido. Ejemplos de tales polipéptidos incluyen bacitracina, colistina y polimixina B. En una modalidad, el agente antibiótico no es un polipéptido.

- El agente antibiótico puede ser un lipopéptido. Ejemplos de tales lipopéptidos incluyen daptomicina y surfactina.
- Alternativamente, el agente antibiótico puede ser una tetraciclina tal como demeclociclina, doxiciclina, minociclina y oxitetraciclina.
- 5 Alternativamente, el agente antibiótico puede ser una glicilciclina. Ejemplos de tales glicilciclinas incluyen tigeciclina.
- 10 Alternativa o adicionalmente, el agente antibiótico puede ser efectivo contra micobacterias. En particular, el agente antibiótico puede ser clofazimina, lampreno, dapsona, capreomicina, cicloserina, etambutol, etionamida, isoniazida, pirazinamida, rifampicina, rifabutina, rifapentina o estreptomicina.
- 15 En una modalidad, el agente antibiótico es un macrólido y/o un aminoglucósido y/o sulfonamidas.
- En una modalidad, el antibiótico se selecciona de tobramicina, azitromicina, telitromicina, ciproflaxina, ceftazidima.
- 20 15 En una modalidad, el agente antibiótico no es ciproflaxina. En otra modalidad, el antibiótico no es tobramicina.
- El agente antibiótico puede ser activo en el tratamiento o profilaxis de infecciones causadas por Enterobacteriaceae (por ejemplo, *E. coli* o *Klebsiella* spp., tal como *K. pneumoniae*) o bacterias no Enterobacteriaceae tales como *Burkholderia* spp.
- 25 20 Generalmente el agente antibiótico es activo en el tratamiento o profilaxis de infecciones causadas por bacterias gramnegativas o grampositivas, tales como *Pseudomonas* spp.
- En una modalidad de la invención, el antibiótico no es un antibiótico  $\beta$ -lactámico.
- 25 30 Los agentes activos para usar en la invención se pueden proporcionar como composiciones farmacéuticas que contienen adicionalmente uno o más diluyentes, excipientes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, el agente farmacéutico adicional se puede proporcionar como una composición que comprende el agente y un portador tal como lactosa o manitol.
- 35 30 En un aspecto preferido de la invención, la composición para el uso, de acuerdo con la invención, y el agente farmacéutico adicional pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o por separado. Las micropartículas, o composición, y el agente farmacéutico adicional se pueden proporcionar como un empaque combinado. El empaque de la combinación puede incluir instrucciones adicionales para la administración simultánea, separada o secuencial de cada una de las micropartículas o composición y agente farmacéutico adicional. Para la administración secuencial, las micropartículas o composición y el agente farmacéutico adicional se pueden administrar en cualquier orden.
- 40 40 Al menos un agente farmacéutico adicional se puede proporcionar en micropartículas distintas de dichas micropartículas del primer aspecto de la invención. Alternativamente, al menos un agente farmacéutico adicional se puede proporcionar en una forma distinta de micropartículas.
- 45 45 En una modalidad de la invención, las micropartículas del primer aspecto de la invención, o composición de acuerdo con la invención, comprenden al menos un agente farmacéutico adicional. En una modalidad adicional de la invención, al menos un agente farmacéutico adicional se administra en micropartículas distintas de las micropartículas del primer aspecto, o composición, de la invención.
- 50 50 En otra modalidad más de la invención, al menos un agente farmacéutico adicional se administra en una forma distinta de micropartículas.
- 55 55 En una modalidad, las micropartículas o composición de la invención que comprende un compuesto que contiene azufre, tal como cisteamina, y/o un agente farmacéutico adicional a administrar además del compuesto que contiene azufre tienen un diámetro promedio del volumen de entre 1 y 5 micrómetros, entre 2 y 5 micrómetros, etc.). En otra modalidad, las micropartículas o composición de la invención, y/o un agente farmacéutico adicional, tienen un diámetro promedio del volumen para dirigir la administración a los bronquios grandes. El tamaño de partícula (diámetro geométrico y diámetro aerodinámico) se selecciona para proporcionar un polvo fácilmente dispersable que, tras la aerosolización y la inhalación, se deposita fácilmente en un sitio objetivo del tracto respiratorio (por ejemplo, vía aérea superior, pulmón profundo, etc.), preferentemente evitando o minimizando la deposición excesiva de partículas en la orofaringe o en las regiones nasales. En una modalidad preferida, las micropartículas porosas tienen un diámetro promedio del volumen de entre 2 y 5 micrómetros, por ejemplo entre 2 y 4 micrómetros.
- 60 65 Se prestó considerable atención al diseño de inhaladores de aerosoles terapéuticos para mejorar la eficiencia de las terapias de inhalación. Documento Timsina y otros, Int. J. Pharm., 101: 1-13 (1995); y Tansey, I. P., Spray Technol. Market, 4: 26-29 (1994). También se prestó atención al diseño de la textura de la superficie del aerosol de polvo seco, teniendo en cuenta particularmente la necesidad de evitar la agregación de partículas, un fenómeno que disminuye considerablemente la eficiencia de las terapias de inhalación. Documento French, D. L., Edwards, D. A. y

5 Niven, R. W., J. Aerosol ScL, 27: 769-783 (1996). Las formulaciones de polvo seco ("DPF") con partículas de gran tamaño tienen características de fluidez mejoradas, tales como una menor agregación (documento Visser, J., Powder Technology 58: 1-10 (1989)), aerosolización más fácil y potencialmente menos fagocitosis. Documentos Rudt, S. and R. H. Muller, J. Controlled Release, 22: 263-272 (1992); Tabata, Y. y Y. Bcada, J. Biomed. Mater. Res., 22: 837-858 (1988). Los aerosoles de polvo seco para terapia de inhalación se producen generalmente con diámetros geométricos medios principalmente en el intervalo de menos de 5 micrómetros. Documentos Ganderton, D., J. Biopharmaceutical Sciences, 3: 101-105 (1992); and Gonda, I. "Physico-Chemical Principles in Aerosol Delivery," in Topics in Pharmaceutical Sciences 1991, Crommelin, D. J. y K. K. Midha, Eds., Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, pp. 95-115, 1992. Se administraron conjuntamente partículas grandes "portadoras" (que no contienen fármaco) con aerosoles terapéuticos para ayudar a lograr una aerosolización eficiente, entre otros posibles beneficios. Documento French, D. L., Edwards, D. A. y Niven, R. W., J. Aerosol ScL, 27: 769- 783 (1996).

10 Los fármacos que actualmente se administran por inhalación vienen principalmente en forma de formulaciones líquidas en aerosol. Sin embargo, muchos fármacos y excipientes, especialmente proteínas, péptidos (documento Liu, R., y otros, Biotechnol. Bioeng., 37: 177-184 (1991)), y los portadores biodegradables tales como las polí(lactida-co-glicólicos) (PLGA), son inestables en ambientes acuosos durante largos períodos de tiempo. Esto puede hacer que el almacenamiento como formulación líquida sea problemático. Además, puede ocurrir desnaturización de proteínas durante la aerosolización con formulaciones líquidas. Considerando estas y otras limitaciones, las formulaciones de polvo seco (DPF) ganan cada vez más interés como formulaciones en aerosol para la administración pulmonar. Documentos Darmms, B. y W. Bains, Nature Biotechnology (1996); Kobayashi, S., y otros, Pharm. Res., 13(1): 80-83 (1996); y Timsina, M., y otros, hit. J. Pharm., 101: 1-13 (1994). Sin embargo, entre las desventajas de los DPF es que los polvos de partículas ultrafinas generalmente tienen malas propiedades de fluidez y aerosolización, lo que lleva a fracciones respirables de aerosol relativamente bajas, que son las fracciones de aerosol inhalado que escapan a la deposición en la boca y la garganta. Documentos Gonda, I., en Topics in Pharmaceutical Sciences 1991, D. Crommelin y K. Midha, Editors, Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 95-117 (1992). Una preocupación principal con muchos aerosoles es la agregación de partículas causada por interacciones entre partículas, tales como interacciones hidrófobas, electrostáticas y capilares. La presente invención pretende abordar estas cuestiones.

20 30 Así, en otro aspecto, la invención proporciona un dispositivo de inhalación de acuerdo con las reivindicaciones.

25 El dispositivo se puede seleccionar entre un dispositivo de inhalación de polvo seco y un inhalador de dosis medida.

30 35 Se describe la preparación de una solución acuosa de micropartículas, o compuesto de sulfhidrilo (SH), y un agente estabilizante y la evaporación del agua de la solución. Preferentemente la etapa de evaporación es mediante secado por aspersión.

40 45 Las micropartículas pueden estar en forma de polvo seco. Las micropartículas pueden liberar una cantidad efectiva de un compuesto de sulfhidrilo (SH), durante un período de al menos dos horas desde la inhalación de dichas micropartículas por un sujeto humano. En una modalidad preferida, sustancialmente todo el compuesto que contiene azufre de acuerdo con las reivindicaciones se libera a las 24 horas de la inhalación de dichas micropartículas por un sujeto humano.

50 55 Las micropartículas son convenientes de administrar, de esta manera mejora el grado de cumplimiento del paciente. La composición se puede administrar en una sola bocanada. Alternativamente, las micropartículas se formulan para proporcionar una liberación sostenida de cisteamina. Las micropartículas pueden facilitar la administración local de cisteamina a los pulmones o la administración sistémica a través de los pulmones.

55 60 Las composiciones también se pueden administrar por vía intranasal o por inhalación y se pueden administrar en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación en aerosol desde un contenedor presurizado, bomba, aerosol, atomizador, nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado. Preferentemente, las micropartículas o composiciones de la invención se administran al tracto respiratorio.

65 Como se usa en la presente descripción, los términos "comprende", "que comprende", "incluye" e "que incluye" pretenden ser términos abiertos y no limitativos, a menos que se indique expresamente lo contrario.

La invención se describirá ahora a manera de ejemplo solamente, con referencia a las figuras siguientes:

65 70 La Figura 1 es un gráfico que muestra la distribución del tamaño de partículas en el lote 57#08a;

La Figura 2 es un gráfico que muestra la distribución del tamaño de partículas en el lote 57#08b;

La Figura 3 es un gráfico que muestra la distribución del tamaño de partículas en el lote 57#07 (placebo);

65 70 Figura 4. Estudio Lynovex/lactosa que demuestra la reducción de *Pseudomonas* carga pulmonar;

Figura 5. La combinación de Lynovex (cisteamina) y tobramicina da como resultado una reducción en la carga pulmonar;

Figura 6. El peso del ratón no se reduce en presencia de una combinación de Lynovex y tobramicina.

5

### Ejemplos

Ejemplo 1:

10 El secado por aspersión como posible técnica de formulación para la administración de bitartrato de cisteamina por inhalación oral

#### 1 Materiales

15 Bitartrato de cisteamina: Fabricado por Recordati, número de lote 140514-1 se suministró por Nova Biotics.

Ácido oleico: Fluka, 75096-1L, número de lote BCBN9185V

20 Agua: Desionizada, Millipore, sistema RiOs 5, número de serie F8HN7 8491K

20 L-Leucina: Sigma, L-8000, número de lote 91k0906

Trehalosa: Sigma, T9449-1006, número de lote 011M7000N

25 2 Métodos

2.1 Estudios iniciales de secado por aspersión mediante el uso de soluciones de bitartrato de cisteamina formuladas con ácido oleico y trehalosa

30 Se produjeron varios lotes de bitartrato de cisteamina mediante soluciones de secado por aspersión que contenían el ingrediente activo solo y con trehalosa y ácido oleico añadidos (se añadieron como posible agente enmascarador del sabor).

35 Se dejó que el bitartrato de cisteamina alcanzara temperatura ambiente durante 30 minutos antes de abrirlo. Para cada lote que se iba a secar por aspersión, se añadieron 100 mg de polvo de bitartrato de cisteamina a 10 ml de agua desionizada, para dar una concentración de sólidos totales del 1 % p/v. Esto se agitó hasta que se disolvió por completo.

40 Se añadieron excipientes adicionales (ácido oleico y trehalosa) a la solución de bitartrato de cisteamina para evaluar su impacto en las propiedades del polvo después del secado por aspersión. Las soluciones se secaron por aspersión mediante el uso de un secador por aspersión Buchi B290, equipado con un ciclón de alta eficiencia y una tobera Buchi de dos fluidos. Las condiciones completas de secado por aspersión se dan en la Tabla 1 más abajo.

Aspirador	100 %
Velocidad de alimentación de líquido	2 ml/minuto
Presión de atomización	5,5 bar
Temperatura de entrada	Ver tabla 1
Temperatura de salida	Ver tabla 1

45 Tabla 1 Condiciones de secado por aspersión

50

Los resultados de estos estudios iniciales confirmaron que la presencia de ácido oleico en la formulación daba lugar a malas propiedades del polvo y bajas recuperaciones.

55 Un resumen de los lotes que se secaron por aspersión se describe más abajo en la Tabla 2.

Lote	Componente A	Componente B	Componente C	Solvente	Resultado	Temperatura del secador por aspersión
60 052#053	Bitartrato de cisteamina 95 %	Ácido oleico 5 %	N/A	EtOH : Agua, 2 :1	Sólido ceroso y vidrioso que se depositó en las paredes del ciclón	Entrada: 155 °C Salida: 83 °C

65

5	052#055	Bitartrato de cisteamina 95 %	Ácido oleico 5 %	N/A	EtOH : Agua, 2 :1	Sólido ceroso y vidrioso que se depositó en las paredes del ciclón	Entrada: 78 °C Salida: 48 °C
10	052#056	Bitartrato de cisteamina 70 %	Ácido oleico 5 %	Trehalosa 25 %	EtOH : Agua, 2 :1	Sólido ceroso y vidrioso que se depositó en las paredes del ciclón	Entrada: 75 °C Salida: 46 °C
15	052#057	Bitartrato de cisteamina 32,6 %	Ácido oleico 1,7 %	Trehalosa 65,7 %	EtOH : Agua, 2 :1	Sólido ceroso y vidrioso que se depositó en las paredes del ciclón	Entrada: 63 °C Salida: 40 °C
20	052#058	Bitartrato d cisteamina 95 %	Ácido oleico 5 %	N/A	Acetato de etilo: Agua, 5 :1	Sólido ceroso y vidrioso que se depositó en las paredes del ciclón	Entrada: 50 °C Salida: 36 °C
25	052#059	Bitartrato de cisteamina 95 %	Ácido oleico 5 %	N/A	Aqua: Acetato de etilo (se añadió a los cristales de API que se formaron)	Sólido ceroso y vidrioso que se depositó en las paredes del ciclón	Entrada: 50 °C Salida: 38 °C

Tabla 2 Producción de lotes iniciales de viabilidad que contienen ácido oleico

30 2.2 Estudios iniciales de secado por aspersión mediante el uso de soluciones de bitartrato de cisteamina formuladas con trehalosa (sin ácido oleico)

35 Con base en los resultados del secado por aspersión obtenidos en 3.1 (arriba), se decidió eliminar el ácido oleico de la formulación.

40 Se dejó que el bitartrato de cisteamina alcanzara temperatura ambiente durante 30 minutos antes de abrirlo. Para cada lote que se iba a secar por aspersión, se añadieron 100 mg de polvo de bitartrato de cisteamina a 10 ml de agua desionizada, para dar una concentración de sólidos totales del 1 % p/v. Esto se agitó hasta que se disolvió por completo. Se añadió trehalosa a la solución de bitartrato de cisteamina para evaluar su impacto sobre las propiedades del polvo secado por aspersión. Las soluciones se secaron por aspersión mediante el uso de un secador por aspersión Buchi B290, equipado con un ciclón de alta eficiencia y una tobera Buchi de dos fluidos. Las condiciones completas de secado por aspersión se dan en la Tabla 3 más abajo.

Aspirador	100 %
Velocidad de alimentación de líquido	2 ml/minuto
Presión de atomización	5,5 bar
Temperatura de entrada	Ver Tabla 4
Temperatura de salida	Ver Tabla 4

Tabla 3 Condiciones de secado por aspersión

50 Un resumen de los lotes secados por aspersión se describe en la Tabla 4 más abajo.

Lote	Componente A	Componente B	Componente C	Solvente	Resultado	Temperatura del secador por aspersión	
55	052#060*	Bitartrato de cisteamina 10 %	Trehalosa 90 %	N/A	Aqua	Polvo blanco.	Entrada: 81 °C Salida: 42 °C
60	052#062	Bitartrato de cisteamina 50 %	Trehalosa 50 %	N/A	Aqua	Sólido ceroso y vidrioso que se depositó en las paredes del ciclón	Entrada: 82 °C Salida: 44 °C
65	052#063	Bitartrato de cisteamina	Trehalosa 75 %	N/A	Aqua	Polvo blanco seco.	Entrada: 114 °C Salida: 61 °C

		25 %				
5	052#064	Bitartrato de cisteamina 25 %	Trehalosa 75 %	N/A	Agua	Polvo blanco seco. Entrada: 136 °C Salida: 71 °C
	052#65	Bitartrato de cisteamina 25 %	Trehalosa 75 %	N/A	Agua	Polvo blanco seco. Entrada: 162 °C Salida: 79 °C
10	052#66	Bitartrato de cisteamina 35 %	Trehalosa 65 %	N/A	Aqua	Polvo de aspecto húmedo. No fluye libremente. Entrada: 148 °C Salida: 70 °C
	52#67	Bitartrato de cisteamina 30 %	Trehalosa 70 %	N/A	Aqua	Polvo de aspecto húmedo. Entrada: 147 °C Salida: 72 °C
15	052#097*	Bitartrato de cisteamina 25 %	Trehalosa 75 %	N/A	Aqua	Polvo blanco seco. Entrada: 121 °C Salida: 71 °C Presión de aspersión 5,5 bar

Tabla 4 Condiciones de secado por aspersión para formulaciones de trehalosa

\*Se usó para generar datos adicionales.

25 2.3 Secado por aspersión de bitartrato de cisteamina formulado con trehalosa y L-leucina (número de lote secado por aspersión 0528155, 0528140, 052#121 con leucina 052#122 sin leucina)

Para mejorar aún más las propiedades del polvo secado por aspersión, se añadió L-leucina a la formulación.

30 Se dejó que el bitartrato de cisteamina alcanzara temperatura ambiente durante 30 minutos antes de abrirlo. Se añadieron 100 mg de bitartrato de cisteamina en polvo, 50 mg de L-leucina y 850 mg de trehalosa a 10 ml de agua desionizada, para dar una concentración de sólidos totales del 10 % p/v. Esto se agitó hasta que se disolvió por completo. Los lotes 052#140 y 052#155 se escalaron para producir un tamaño de lote de 2 g.

35 La solución se secó por aspersión mediante el uso de un secador por aspersión Buchi B290, equipado con un ciclón de alta eficiencia y una tobera Buchi de dos fluidos. Las condiciones completas de secado por aspersión se dan en la Tabla 5 más abajo.

40	Aspirador	100 %
	Velocidad de alimentación de líquido	2 ml/minuto
	Presión de atomización	5,5 bar
	Temperatura de entrada	184 °C
	Temperatura de salida	78 °C

Tabla 5 Condiciones de secado por aspersión

45 Seguido del secado por aspersión, el contenido de humedad del producto se redujo aún más mediante secado secundario al vacío, a temperatura ambiente, durante la noche. Luego, el producto final se almacenó en un vial de vidrio sellado antes del llenado de la cápsula. Las soluciones de secado por aspersión se resumen en la Tabla 6 más abajo.

Número de solución	Peso del bitartrato de cisteamina	Peso de la trehalosa	Peso de L-Leucina	Volumen de agua desionizada	Referencia de polvo secado por aspersión
1	100 mg	850 mg	50 mg	10 ml	052#121
2	100 mg	900 mg	0 mg	10 ml	052#122
3	200 mg	1700 mg	100 mg	20 ml	052#140
4	200 mg	1700 mg	100 mg	20 ml	052#155*

\* Recogido en dos lotes de aproximadamente 1 g

55 Tabla 6 Secado por aspersión de formulaciones de bitartrato de cisteamina que contienen L-leucina

60 2.4 Análisis del tamaño de partículas

65 El análisis del tamaño de partículas se realizó mediante el uso de un analizador de tamaño de partículas SympaTec HELOS con un dispersor RODOS. Se alimentaron aproximadamente 50 mg de formulación a la tolva. La dispersión se consiguió mediante el uso de aire comprimido a una presión de 2 bar. Todas las configuraciones del instrumento se detallan en los informes de análisis del tamaño de partículas en el apéndice 1 (datos no mostrados).

## 2.5 Análisis del tamaño de partículas aerodinámicas mediante un impactador en cascada Andersen

El tamaño de partícula aerodinámico del polvo secado por aspersión se determinó mediante el uso de un impactador en cascada Andersen (ACI) de 8 etapas Copley Scientific equipado con un preseparador de 60 l/minuto y etapas -1 a 6. El método fue como se describió en el capítulo general <601> de la Farmacopea estadounidense 29 y en la Farmacopea europea 5.1. 2.9.18 (procedimiento para inhaladores de polvo seco).

Se usaron los parámetros siguientes:

10	Dosis:	2 x cápsulas
	Cápsulas:	Qualicaps HPMC estándar tamaño 3
	Dispositivo:	Plastiape, 3444, COQ, 23970000AA
	Recubrimiento de placas:	Ninguno
15	Flujo de aire:	Aproximadamente 60 l/minuto (se determinó como un diferencial de presión de 4 kPa en todo el dispositivo).
	Tiempo de actuación:	Aproximadamente 4 segundos (se determinó mediante el flujo de aire para igualar a un volumen de 4 litros).
	Lavado de placas:	Tampón fosfato de sodio 0,1 M con EDTA, pH 8.
20	Detección:	UV a 412 nm mediante el uso del reactivo de Ellmans para proporcionar un cromóforo adecuado

La concentración de bitartrato de cisteamina en los lavados se midió a 412 nm como se describe en la sección 3.6 más abajo.

25	A continuación se calculó la masa de polvo depositada en cada etapa mediante el uso del coeficiente de extinción que se determinó en la sección 3.6. Mediante el análisis de la cantidad de fármaco depositado en las distintas etapas, fue posible, mediante el uso del software específico Copley Scientific, calcular la dosis de partículas finas (FPD), la fracción de partículas finas (FPF) y la distribución aerodinámica media de masa (MMAD) y desviación estándar geométrica (GSD) de las partículas peptídicas recogidas.
30	La dosis de partículas finas (FPD) se definió como la cantidad de fármaco en la dosis prescrita de un producto inhalado que se considera generalmente de un tamaño capaz de penetrar el pulmón durante la inhalación, es decir, respirable. Este usualmente, se considera que es de aproximadamente 5 micras o menos.
35	La fracción de partículas finas (FPF) fue la FPD expresada como porcentaje de la dosis administrada.

## 2.6 Cuantificación del bitartrato de cisteamina

40	La cuantificación del bitartrato de cisteamina se realizó mediante el uso de un espectrómetro UV Shimadzu UV-1650PC. Como el bitartrato de cisteamina no tiene reactivo de Ellman cromóforo UV, se usó 5,5-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico).
----	---

## 2.6.1 Preparación de reactivos

45	Tampón de reacción: Fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0, que contiene EDTA 0,1 mM.
----	---

Solución de reactivo de Ellman: Disuelva 40 mg de reactivo de Ellman en 10 ml de tampón de reacción

50	Disuelva 34 mg de bitartrato de cisteamina en 100 ml de tampón de reacción para producir una solución de 1,5 mM.
----	--

## 2.6.2 Preparación de la curva estándar

55	Los estándares se prepararon mediante la disolución de bitartrato de cisteamina en tampón de reacción en las siguientes concentraciones:
----	--

Estándar	Volumen de tampón de reacción ml	Cantidad de bitartrato de cisteamina	Concentración final
A	100	34 mg	1,5 mM
B	5	25 ml de Estándar A	1,25 mM
C	10	20 ml de Estándar A	1,0 mM
D	15	15 ml de Estándar A	0,75 mM
E	20	10 ml de Estándar A	0,5 mM
F	25	5 ml de Estándar A	0,25 mM
G (blanco)	30	0 ml de estándar A	0,0 mM

Tabla 2 Estándares de bitartrato de cisteamina

Se preparó un conjunto de viales, cada uno de los cuales contiene 50  $\mu$ l de solución de reactivo de Ellman y 2,5 ml de tampón de reacción.

5 La solución de ensayo o estándar (250  $\mu$ l) se añadió a los viales que se prepararon en la etapa anterior. Los reactivos se mezclaron y analizaron en el espectrofotómetro inmediatamente. Se midió la absorbancia a 412 nm.

Los valores obtenidos de los estándares se usaron para generar una curva estándar. La concentración experimental de la muestra de bitartrato de cisteamina se determinó a partir de esta curva.

10 3 Resultados

3.1 Estudios iniciales sobre el secado por aspersión de bitartrato de cisteamina con ácido oleico y trehalosa

15 Los estudios iniciales que se describen en la sección 3.1 confirmaron que no fue posible producir un polvo seco adecuado mediante el secado por aspersión de soluciones de bitartrato de cisteamina que contienen ácido oleico (con y sin trehalosa). Bajo todas las condiciones que se usaron, el polvo resultante consistió en un material sólido, vidrioso que se pegaba a las paredes del ciclón y al recipiente colector.

20 Se obtuvieron mejores resultados cuando se eliminó el ácido oleico de la formulación (ver sección 3.2). La eliminación del ácido oleico dio como resultado la producción de un polvo blanco fino (en lugar de un sólido ceroso). Sin embargo, el polvo todavía era cohesivo y tenía propiedades de flujo relativamente pobres.

3.2 Secado por aspersión de formulaciones de bitartrato de cisteamina que contienen trehalosa y L-leucina

25 Las propiedades del polvo mejoraron cuando se añadió L-leucina a la solución de alimentación, lo que dio como resultado polvos blancos finos. Las recuperaciones (rendimientos) fueron altas; en el intervalo de 50-83 %. Los polvos secados por aspersión tenían propiedades de manipulación aceptables y podían recuperarse fácilmente del recipiente de recogida con una carga estática mínima. Las formulaciones que contienen L-leucina tuvieron un mayor % de rendimiento y características de flujo mejoradas que las que no las contenían.

30 Los rendimientos obtenidos de soluciones secadas por aspersión que contienen L-leucina se resumen en la Tabla 7 más abajo:

Muestra de referencia	Peso del polvo recuperado	% de rendimiento**
052#122	0,5 g	50
052#121	0,7 g	70
052#140*	1,6 g	80
052#155*	1,7 g	83

40 Tabla 7 Rendimientos del secado por aspersión de formulaciones que contienen L-leucina

\*\* No se tiene en cuenta la humedad residual

\* Tamaño del lote 2 g

45 3.3 Análisis del tamaño de partículas de formulaciones de bitartrato de cisteamina secado por aspersión que contienen trehalosa y L-leucina

En la Tabla 8 se muestra un resumen de los datos del tamaño de partículas para las formulaciones de bitartrato de cisteamina que contienen trehalosa y L-leucina.

Muestra	$X_{10}^*$ ( $\mu$ m)	$X_{50}^{**}$ ( $\mu$ m)	$X_{90}^{***}$ ( $\mu$ m)	VMD**** ( $\mu$ m)
052#122	0,88	2,28	4,61	2,56
052#121	1,46	2,65	4,59	2,89
052#140	0,93	2,75	6,39	3,34
052#155A	0,74	1,92	4,30	2,28
052#155B	1,06	2,84	6,19	3,42

50 Tabla 8 Análisis del tamaño de partículas (resumen)

60 \* 10 % de micropartículas, en volumen, más abajo de esta figura

\*\* 50 % de micropartículas, en volumen, más abajo de esta figura

\*\*\* 90 % de las micropartículas, en volumen, más abajo de esta figura

\*\*\*\* Diámetro medio en volumen

65 3.4 Análisis del tamaño de partículas aerodinámicas mediante el impactador en cascada Anderson

En la Tabla 9 se muestra un resumen de los datos del tamaño de partícula aerodinámico para lotes secados por

aspersión de bitartrato de cisteamina, formulados con trehalosa y L-leucina. Los informes completos de análisis del tamaño de partículas se detallan en el apéndice 2 (datos no mostrados).

5	Lote	Peso de llenado de la cápsula A (mg)	Peso de llenado de la cápsula B (mg)	Cantidad gravimétrica de formulación liberada del dispositivo, cápsula A	Cantidad gravimétrica de formulación liberada del dispositivo, cápsula B	Masa de API recuperada del ACI	FPD (mg)	FPF (%)
10	Corrida 1 052#121	132,8	130,7	120,7	121,7	11,3	N/A*	N/A*
	Corrida 2 052#121	114,8	119,6	105,0	109,5	18,5	6,9	37,7
15	052#122	84,0	75,2	54,8	54,9	11,2	3,0	27,0
	Corrida 1 052#140	105,9	114,1	105,0	109,5	23,1	4,5	19,6
20	Corrida 2 052#140	96,9	100,9	90,2	93,4	25,9	5,6	21,5
	Corrida 1 052#155	82,7	84,9	76,6	41,7	14,0	6,06	43,2
	Corrida 2 052#155	96,2	94,3	89,5	87,8	15,3	3,6	23,7

Tabla 9 Tamaño de partícula aerodinámica

25 \*No se incluye debido a cambios dentro del método analítico del proceso de recuperación.

#### 4 Conclusiones

30 El bitartrato de cisteamina se secó por aspersión con éxito con trehalosa y con o sin L-leucina. En estos estudios, una formulación que contiene bitartrato de cisteamina (10 % p/p), trehalosa (85 % p/p) y L-leucina (5 % p/p) fue superior en términos de recuperación de polvo, propiedades de manipulación y carga de fármaco en las cápsulas.

35 Las características mejoradas de manipulación del polvo de las formulaciones de bitartrato de cisteamina/trehalosa/leucina se tradujeron en un aumento de la fracción de partículas finas (FPF), especialmente con formulaciones que contienen 5 % de leucina.

40 Los estudios de viabilidad iniciales sobre la administración de DPI confirman que los polvos secados por aspersión se pueden administrar mediante el uso de DPI disponibles comercialmente sin un portador de lactosa. Proporcionando un FPF entre 20 % y 40 % y un FPM entre 3 y 6,9 mg dosificados en dos cápsulas.

#### Ejemplo 2:

45 Producción de formulaciones de bitartrato de cisteamina secada por aspersión para pruebas in vivo

#### 5 Materiales

50 El bitartrato de cisteamina se suministró por NovaBiotics (Recordati 140514-1). Todos los demás reactivos eran de grado analítico, suministrados por Sigma.

#### 6 Métodos

##### 6.1 Secado por aspersión de formulaciones de bitartrato de cisteamina

###### 55 6.1.1 Bitartrato de cisteamina 5 % (p/p), L-leucina 5 % (p/p), manitol 90 % (p/p) (Lote 57#08a)

60 El polvo de bitartrato de cisteamina se calentó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de abrirlo. Se preparó una solución que contiene 0,1 g de polvo de bitartrato de cisteamina, 0,1 g de L-leucina y 1,8 g de manitol en 20 ml de agua desionizada, para dar una concentración de sólidos totales del 10 % p/v. Esto se agitó hasta que se disolvió por completo.

65 La solución se secó por aspersión mediante el uso de un secador por aspersión Buchi B290, equipado con un ciclón de alta eficiencia y una tobera Buchi de dos fluidos. Las condiciones completas de secado por aspersión se dan en la Tabla 1 más abajo.

Aspirador	100 %
Velocidad de alimentación de líquido	2 ml/minuto
Presión de atomización	5,5 bar
Temperatura de entrada	104 °C
Temperatura de salida	58 °C

Tabla 3 Condiciones de secado por aspersión Lote 57#08a

5

Seguido del secado por aspersión, el polvo se recogió y almacenó en un vial de vidrio mediante el uso de una película y papel de laboratorio envueltos dentro de un ambiente protector con un % de HR < 10 %.

10

#### 6.1.2 Bitartrato de cisteamina 10 % (p/p), L-leucina 5 % (p/p), manitol 85 % (p/p) (Lote 57#08b)

15

El polvo de bitartrato de cisteamina se calentó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de abrirlo. Se preparó una solución que contiene 0,2 g de polvo de bitartrato de cisteamina, 0,1 g de L-leucina y 1,7 g de manitol en 20 ml de agua desionizada, para dar una concentración de sólidos totales del 10 % p/v. Esto se agitó hasta que se disolvió por completo.

20

La solución se secó por aspersión mediante el uso de un secador por aspersión Buchi B290, equipado con un ciclón de alta eficiencia y una tobera Buchi de dos fluidos. Las condiciones completas de secado por aspersión se dan en la Tabla 2 más abajo.

25

Aspirador	100 %
Velocidad de alimentación de líquido	2 ml/minuto
Presión de atomización	5,5 bar
Temperatura de entrada	106 °C
Temperatura de salida	55 °C

Tabla 2 Condiciones de secado por aspersión Lote 57#08b

30

Seguido del secado por aspersión, el polvo se recogió y almacenó en un vial de vidrio mediante el uso de una película y papel de laboratorio envueltos dentro de un ambiente protector con un % de HR < 10 %.

#### 6.1.3 Lote de placebo que contiene L-leucina al 5 % (p/p), manitol al 95 % (p/p) (Lote 57#07)

35

Se preparó una solución que contiene 0,1 g de L-leucina y 1,9 g de manitol en 20 ml de agua desionizada, para dar una concentración de sólidos totales del 10 % p/v. Esto se agitó hasta que se disolvió por completo.

40

La solución se secó por aspersión mediante el uso de un secador por aspersión Buchi B290, equipado con un ciclón de alta eficiencia y una tobera Buchi de dos fluidos. Las condiciones completas de secado por aspersión se dan en la Tabla 3 más abajo.

45

Aspirador	100 %
Velocidad de alimentación de líquido	2 ml/minuto
Presión de atomización	5,5 bar
Temperatura de entrada	100 °C
Temperatura de salida	64 °C

Tabla 3 Condiciones de secado por aspersión Lote 57#007

50

Seguido del secado por aspersión, el polvo se recogió y almacenó en un vial de vidrio mediante el uso de una película y papel de laboratorio envueltos dentro de un ambiente protector con un % de HR < 10 %.

#### 6.2 Análisis del tamaño de partículas

55

El análisis del tamaño de partículas se realizó mediante el uso de un analizador de tamaño de partículas SympaTec HELOS con un dispersor RODOS. Se colocaron aproximadamente 50 mg de formulación de bitartrato de cisteamina secada por aspersión en el alimentador vibratorio y se alimentaron a la tolva. La dispersión se consiguió mediante el uso de aire comprimido a una presión de 2 bar.

60

#### 6.3 Análisis del contenido de bitartrato de cisteamina en polvos secados por aspersión

La cuantificación del bitartrato de cisteamina se realizó mediante el uso de un espectrómetro UV Shimadzu UV-1650PC. Como el bitartrato de cisteamina no tiene reactivo de Ellman cromóforo UV, se usó 5,5-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) para medir el grupo sulfhidrilo en la cisteamina.

65

## 6.3.1 Preparación de reactivos

Tampón de reacción: Fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0, que contiene EDTA 0,1 mM.

Solución de reactivo de Ellman: Disuelva 40 mg de reactivo de Ellman en 10 ml de tampón de reacción

5 Disuelva 34 mg de bitartrato de cisteamina en 100 ml de tampón de reacción para producir una solución de 1,5 mM.

## 6.3.2 Preparación de la curva estándar

10 Los estándares se prepararon mediante la disolución de bitartrato de cisteamina en tampón de reacción en las concentraciones que se muestran en la Tabla 4:

Estándar	Volumen de tampón de reacción ml	Cantidad de bitartrato de cisteamina	Concentración final
A	100	34 mg	1,5 mM
B	5	25 ml de Estándar A	1,25 mM
C	10	20 ml de Estándar A	1,0 mM
D	15	15 ml de Estándar A	0,75 mM
E	20	10 ml de Estándar A	0,5 mM
F	25	5 ml de Estándar A	0,25 mM
G (blanco)	30	0 ml de estándezar A	0,0 mM

20 Tabla 4 Estándares de bitartrato de cisteamina

Se preparó un conjunto de viales, cada uno de los cuales contiene 50 µl de solución de reactivo de Ellman y 2,5 ml de tampón de reacción.

25 La solución de ensayo o estándar (250 µl) se añadió a los viales que se prepararon en la etapa anterior. Los reactivos se mezclaron y analizaron en el espectrofotómetro inmediatamente. Se midió la absorbancia a 412 nm.

30 Los valores obtenidos de los estándares se usaron para generar una curva estándar. La concentración experimental de la muestra de bitartrato de cisteamina se determinó a partir de esta curva.

## 6.3.3 Análisis del contenido de cisteamina en soluciones de alimentación y polvos secados por aspersión

35 Se midió el contenido de bitartrato de cisteamina en cada una de las soluciones de alimentación que se usaron para producir los dos lotes secados por aspersión. Se diluyó una alícuota de 100 µl de cada solución en 10 ml de agua desionizada para producir una solución que se encontrara dentro de la región lineal de la curva estándar. Las muestras se analizaron como se describió en la sección 3.3.2 y se determinó la concentración de bitartrato de cisteamina.

40 Se midió el contenido de bitartrato de cisteamina en las dos formulaciones secadas por aspersión. Se diluyó una muestra de 50 mg de cada polvo en 0,5 ml de agua desionizada. Se diluyó una alícuota de 100 µl en 10 ml de agua desionizada para producir una solución que se encontrara dentro de la región lineal de la curva estándar. Las muestras se analizaron como se describió en la sección 3.3.2 y se determinó la concentración de bitartrato de cisteamina.

## 45 7 Resultados y discusión

## 7.1 Secado por aspersión de formulaciones de bitartrato de cisteamina

50 Toda la solución de alimentación se secó por aspersión exitosamente, dando como resultado un polvo blanco fino. Las recuperaciones se resumen en la Tabla 4 más abajo:

Núm. de Lote	Cantidad secada por aspersión (g)	Cantidad recuperada (g)	Rendimiento (%)
57#08a	2 g	1,0	50
57#08b	2 g	0,75	38
57#07 (placebo)	2 g	1,1	55

55 Tabla 5 Recuperación de formulaciones de cisteamina secadas por aspersión

60 Las recuperaciones de los lotes fueron inferiores a lo previsto; sin embargo, es probable que esto se deba al pequeño tamaño del lote (2 g). Todos los polvos tuvieron buenas propiedades de manipulación, sin embargo, se observó que la formulación de cisteamina al 10 % fue ligeramente más cohesiva que la formulación al 5 %.

## 7.2 Análisis del tamaño de partículas

65 En la Tabla 5 se muestra un resumen de los datos del tamaño de partículas para todos los puntos de tiempo y en las Figuras 1-3 se muestran distribuciones representativas del tamaño de partículas.

Tabla 6 Análisis del tamaño de partículas (resumen)

Lote	X <sub>10*</sub> (μm)	X <sub>50**</sub> (μm)	X <sub>90***</sub> (μm)	VMD**** (μm)
57#08a	0,85	4,51	8,58	4,73
	0,90	4,34	7,95	4,48
	0,90	4,41	8,27	4,75
57#08b	1,62	6,61	12,69	7,16
	1,83	6,89	13,28	7,49
	1,91	6,99	13,21	7,52
57#07(placebo)	1,29	4,2	7,99	4,66
	1,37	4,27	8,09	4,73
	2,68	4,49	7,38	6,72

\* 10 % de micropartículas, en volumen, más abajo de esta figura

\*\* 50 % de las micropartículas, en volumen, más abajo de esta figura

\*\*\* El 90% de las micropartículas, en volumen, más abajo de esta figura.

\*\*\*\* Diámetro medio en volumen

En las Figuras 1-3 se muestran ejemplos de las distribuciones de tamaño obtenidas para cada lote.

## 20 7.3 Determinación del contenido de cisteamina en la solución de alimentación y en los polvos secados por aspersión

Tanto la solución de alimentación del secador por aspersión como los polvos secados por aspersión que se produjeron se analizaron para determinar el contenido de cisteamina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6 más abajo

Muestra	Concentración objetivo	Concentración medida
Lote 57#08a (solución de alimentación)	5 % (p/v)	5,9 % (p/v)
Lote 57#08a (polvo secado por aspersión)	5 % (p/p)	5,9 % (p/p)
Lote 57#08b (solución de alimentación)	10 % (p/v)	11,5 % (p/v)
Lote 57#08b (polvo secado por aspersión)	10 % (p/p)	11,7 % (p/p)

Tabla 7 Contenido de cisteamina en soluciones de alimentación y polvos secados por aspersión

En todas las muestras, la concentración medida fue mayor que la concentración esperada en base al contenido teórico.

## 35 Ejemplo 3:

Evaluación de la eficacia de la preparación de Lynovex (cisteamina) en un modelo de ratón neutropénico de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (modelo de carga pulmonar)

## 40 Compuestos químicos

Los animales fueron inmunosuprimidos/preacondicionados con 200 mg/kg o 150 mg/kg de ciclofosfamida. Lynovex, nombre químico cisteamina, y el vehículo se prepararon como Lynovex y vehículo de lactosa, o Lynovex y vehículo a base de manitol (ambos se proporcionaron por Upperton (producto de Upperton)). Estos se prepararon para tratamiento y control con vehículo solos, respectivamente, y en combinación. La tobramicina se preparó como una formulación para inhalación en lactosa. Todos los tratamientos se administraron mediante el uso de un dispositivo Penn Century. Solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se requirió agar selectivo para *Pseudomonas* para la carga de tejido bacteriano.

## 50 Animales

En este estudio se usaron ratones CD1 machos (n = 6 para los grupos de tratamiento, más cinco en el grupo de pretratamiento, con un total de 35 ratones). El día -4, los ratones fueron inmunosuprimidos/preacondicionados con 200 mg/kg de ciclofosfamida por vía intraperitoneal; y con 150 mg/kg de ciclofosfamida por vía intraperitoneal el día -1. Se estableció una infección con *P. aeruginosa* ATCC27853, con un inóculo de  $5 \times 10^6$  ufc/ml, se administró por vía intranasal en un volumen de 40  $\mu$ l seguido anestesia con un cóctel anestésico de ketamina/xilazina durante 15 minutos, para el Lynovex que se preparó en estudio de lactosa, y un inóculo de  $4 \times 10^6$  para el producto Upperton Lynovex.

## 60 Tratamiento

Todos los tratamientos se administraron por vía intratraqueal mediante el uso de un dispositivo Penn Century.

65 Lynovex (cisteamina) se administró a 1,5 mg solo y en combinación con lactosa en las siguientes concentraciones: Lynovex 0,75 mg + 2,25 mg de lactosa en polvo, Lynovex 1,5 mg + 1,5 mg de lactosa en polvo, Lynovex 2,25 mg +

0,75 mg, junto con un control solo de vehículo de 3 mg de lactosa. Además, se administró tobramicina a 188 µg/dosis, como una formulación inhalada que se mezcló con lactosa para ayudar en la medición. Los tratamientos se administraron aproximadamente 5 minutos después de la infección.

5 En un estudio diferente, se administró Lynovex en las siguientes dosis: 3 mg de Lynovex al 5 % y 3 mg de Lynovex al 10 %. Lynovex en combinación con tobramicina de la siguiente manera: 3 mg de Lynovex al 5 % + tobramicina 0,188 mg en 1,5 mg de vehículo, 3 mg de Lynovex al 10 % + tobramicina 0,188 mg en 1,5 mg de vehículo (a base de manitol, se proporcionó por Upperton) y un control solo de tobramicina (0,188 mg/dosis en vehículo de lactosa). Los tratamientos se administraron una vez aproximadamente 10 minutos después de la infección.

10 Carga bacteriana en el tejido.

Se determinó la carga de tejido pulmonar de cada animal, en el punto final clínico de 24 h después de la infección. Los pulmones se homogeneizaron en 2 ml de PBS, se diluyeron en serie en PBS y se sembraron en placas de agar 15 selectivo para *Pseudomonas* antes de la cuantificación después de 24-48 h a 37 °C.

20 Con el estudio de Lynovex/Lactosa se alcanzó una infección variable en los pulmones de los ratones infectados con *P. aeruginosa* ATCC27853. La dosificación intratraqueal de 0,188 mg de la formulación para inhalación de tobramicina dio como resultado una reducción estadísticamente significativa de la carga pulmonar en comparación con los ratones tratados con vehículo ( $P = 0,0097$  prueba de Kruskal Wallis) y 5/6 animales aclararon la infección más abajo del límite de detección. La administración intratraqueal de 1,5 mg y 2,25 mg de Lynovex también redujo la carga pulmonar en comparación con el vehículo ( $P = 0,0072$  y  $P = 0,0349$  respectivamente), con 5/6 y 4/6 ratones respectivamente aclararon la infección más abajo del límite de detección (Figura 4).

25 En el estudio de Lynovex con el producto Upperton, se alcanzó una infección fuerte en los pulmones de los ratones infectados con *P. aeruginosa* ATCC27853. La dosificación intratraqueal con 0,188 mg de la formulación para inhalación de tobramicina dio como resultado cargas muy variables con una reducción promedio de 1,61 log10 ufc/g en la carga pulmonar en comparación con ratones tratados con vehículo (prueba de Kruskal Wallis). La administración intratraqueal de 3 mg de Lynovex al 5 % o al 10 % como monoterapia no redujo la carga pulmonar en 30 comparación con el vehículo. Sin embargo, la combinación de Lynovex al 5 % o al 10 % con 0,188 mg de tobramicina dio como resultado una disminución de la carga en comparación con los ratones vehículo ( $P < 0,0001$  y  $P < 0,0001$ , respectivamente). Esta reducción se comparó con el tratamiento con tobramicina sola ( $P < 0,0001$  para Lynovex al 5 %+Tobramicina y  $P < 0,0015$  para Lynovex al 10 %+Tobramicina, prueba de Kruskal-Wallis) (Figura 5).

35 Adicionalmente, se registraron los pesos de los ratones antes y después de la infección. Los ratones tratados con vehículo, monoterapia con Lynovex o monoterapia con tobramicina perdieron peso seguido de la infección. Por el contrario, los ratones tratados con las combinaciones Lynovex + Tobramicina mantuvieron el peso después de la infección, lo que indica que permanecieron relativamente sanos después de la infección (Figura 6).

40 Se debe señalar que la tobramicina para polvo seco de inhalación se suspendió en lactosa en lugar de manitol. La suspensión en lactosa provocó la aglomeración del polvo, lo que resultó en algunas dificultades en la administración, ya que muchos de los dispositivos de Penn Century se bloquearon durante la dosificación. Las suspensiones de Lynovex fueron mucho más fáciles de administrar y todas se administraron sin problemas debido al bloqueo del dispositivo de administración. Si bien las reducciones de la carga en los grupos de terapia combinada son impresionantes y significativamente superiores a la monoterapia con tobramicina, los datos de algunos ratones tratados con monoterapia con tobramicina podrían ser sospechosos debido a la dificultad en la administración del DPI. Incluso cuando se censuran animales con un tratamiento incierto con tobramicina, aún se mantiene la eficacia enormemente mejorada de los grupos combinados.

45

50

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende micropartículas, las micropartículas comprenden: cisteamina, cistamina o una sal, hidrato o éster farmacéuticamente aceptable de las mismas y un agente estabilizante en donde el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en: monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y los correspondientes alcoholes de azúcar y polisacáridos, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad respiratoria que tiene un elemento mucoso o infeccioso, en donde las micropartículas tienen un tamaño de partícula de 1 a 8 micras.
2. La composición para el uso como se reivindicó en la reivindicación 1, en donde las micropartículas tienen un tamaño de partícula de: a) 1 a 4 micras o b) 4 a 8 micras; o c) 2 a 4 micras.
3. La composición para el uso como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es bitartrato de cisteamina.
4. La composición para el uso como se reivindicó en cualquier reivindicación anterior, en donde agente estabilizante es un azúcar tal como trehalosa.
5. La composición para el uso como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente estabilizante es un alcohol de azúcar tal como manitol.
6. La composición para el uso como se reivindicó en cualquier reivindicación anterior, que comprende hasta un 20 % p/p de cisteamina, cistamina o una sal, hidrato o éster farmacéuticamente aceptable de las mismas, preferentemente entre aproximadamente 5 y 10 % p/p.
7. La composición para el uso como se reivindicó en cualquier reivindicación anterior, que comprende hasta un 85 % de agente estabilizante, o entre un 80 y un 95 % p/p, de agente estabilizante.
8. La composición para el uso como se reivindicó en cualquier reivindicación anterior que comprende además leucina, preferentemente que comprende entre 1 y 10 % de leucina.
9. La composición para el uso como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la enfermedad respiratoria es fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, bronquiectasia, enfisema, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, tos crónica, resfriado común, gripe, hantavirus, neumonía o pleuritis.
10. La composición para el uso como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y al menos un agente farmacéutico adicional, opcionalmente en donde el agente farmacéutico adicional es un agente antibacteriano.
11. La composición para el uso como se reivindicó en la reivindicación 10, en donde el agente farmacéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en antibióticos, agentes mucolíticos, vasodilatadores tales como broncodilatadores, agentes antihipertensivos, fármacos cardiovasculares y bloqueadores de los canales de calcio.
12. La composición para el uso como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición se administra por inhalación o por vía intranasal.
13. Un dispositivo de inhalación que comprende una composición que comprende micropartículas, las micropartículas comprenden: cisteamina, cistamina o una sal, hidrato o éster farmacéuticamente aceptable de las mismas y un agente estabilizante en donde el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en: monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y correspondientes alcoholes de azúcar y polisacáridos, en donde las micropartículas tienen un tamaño de partícula de 1 a 8 micras.
14. La composición para el uso de las reivindicaciones 1 a 12 o el dispositivo de inhalación de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el tamaño de partícula es el diámetro medio en volumen (VMD) o el diámetro aerodinámico.

Figura 1

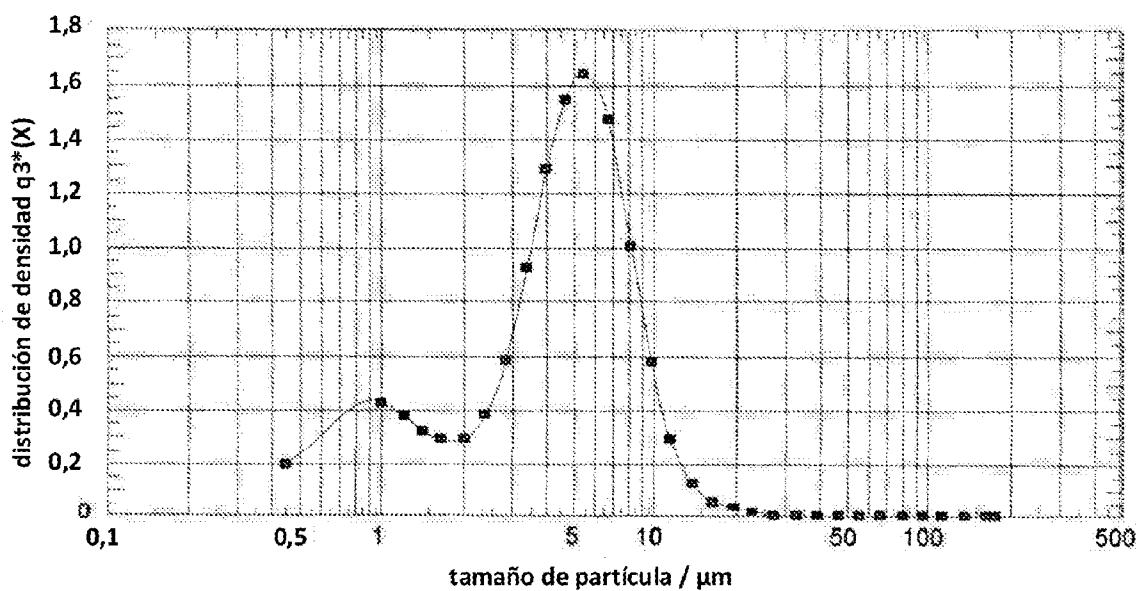


Figura 2

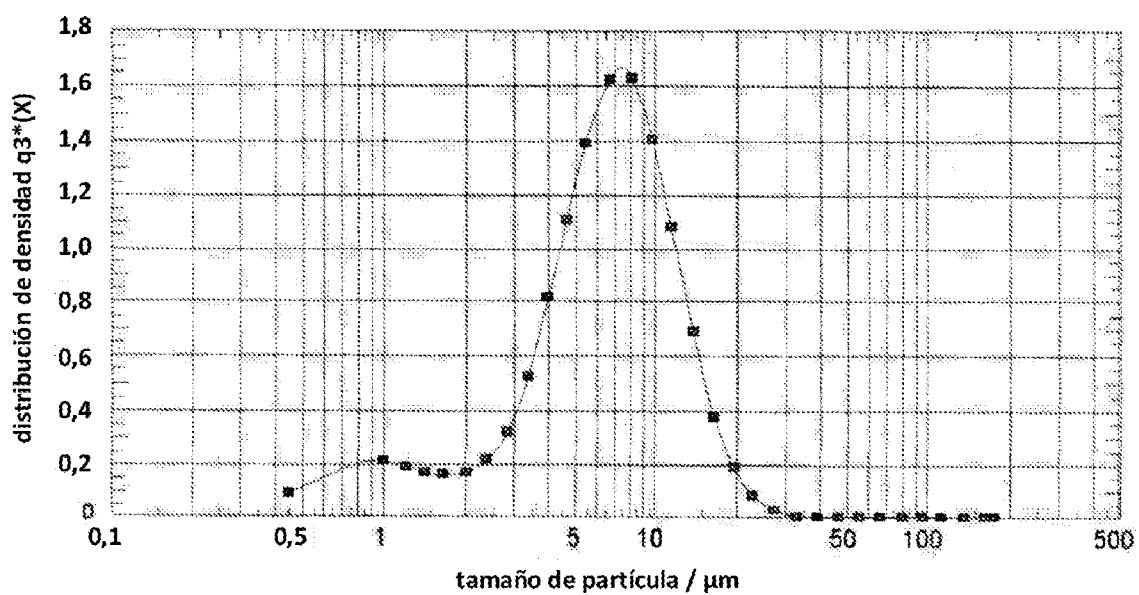


Figura 3

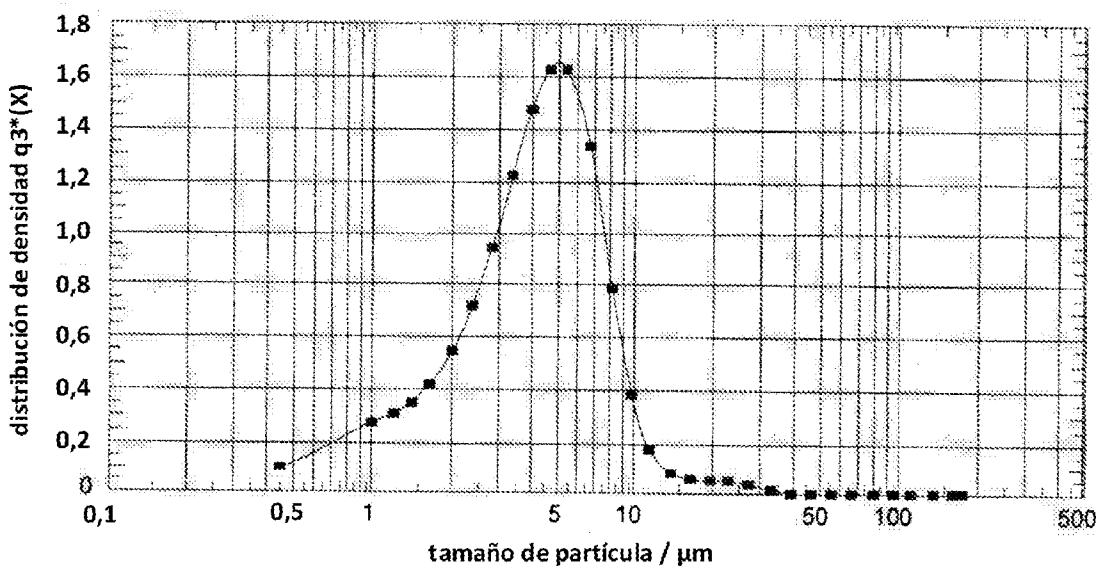


Figura 4

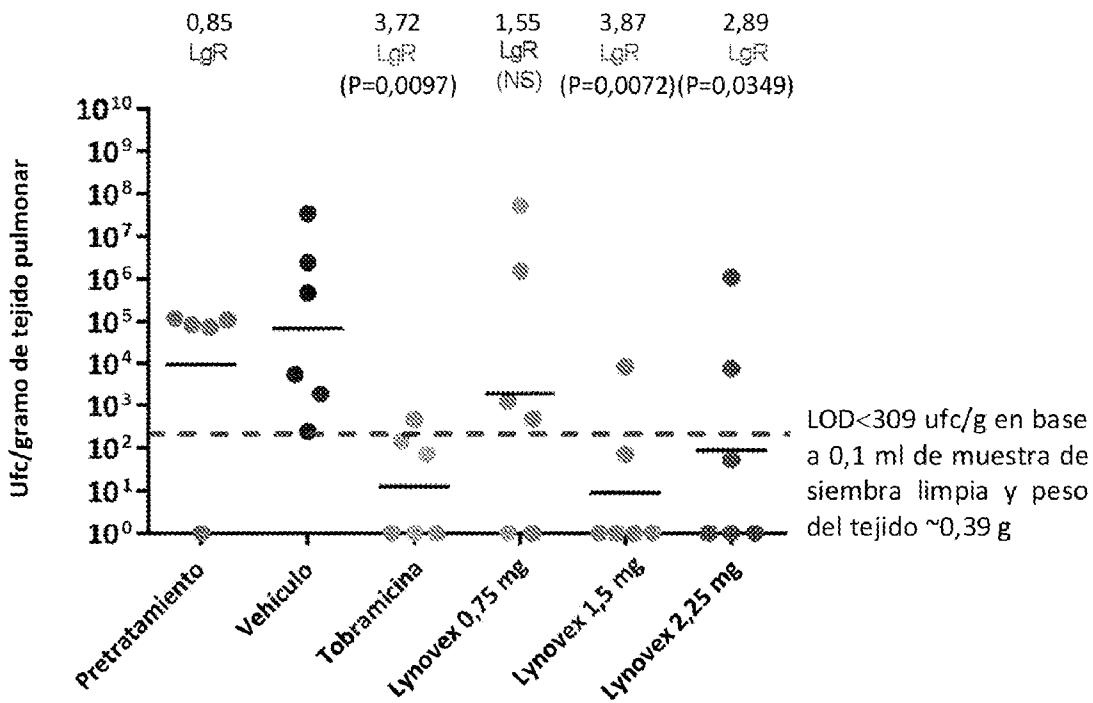


Figura 5

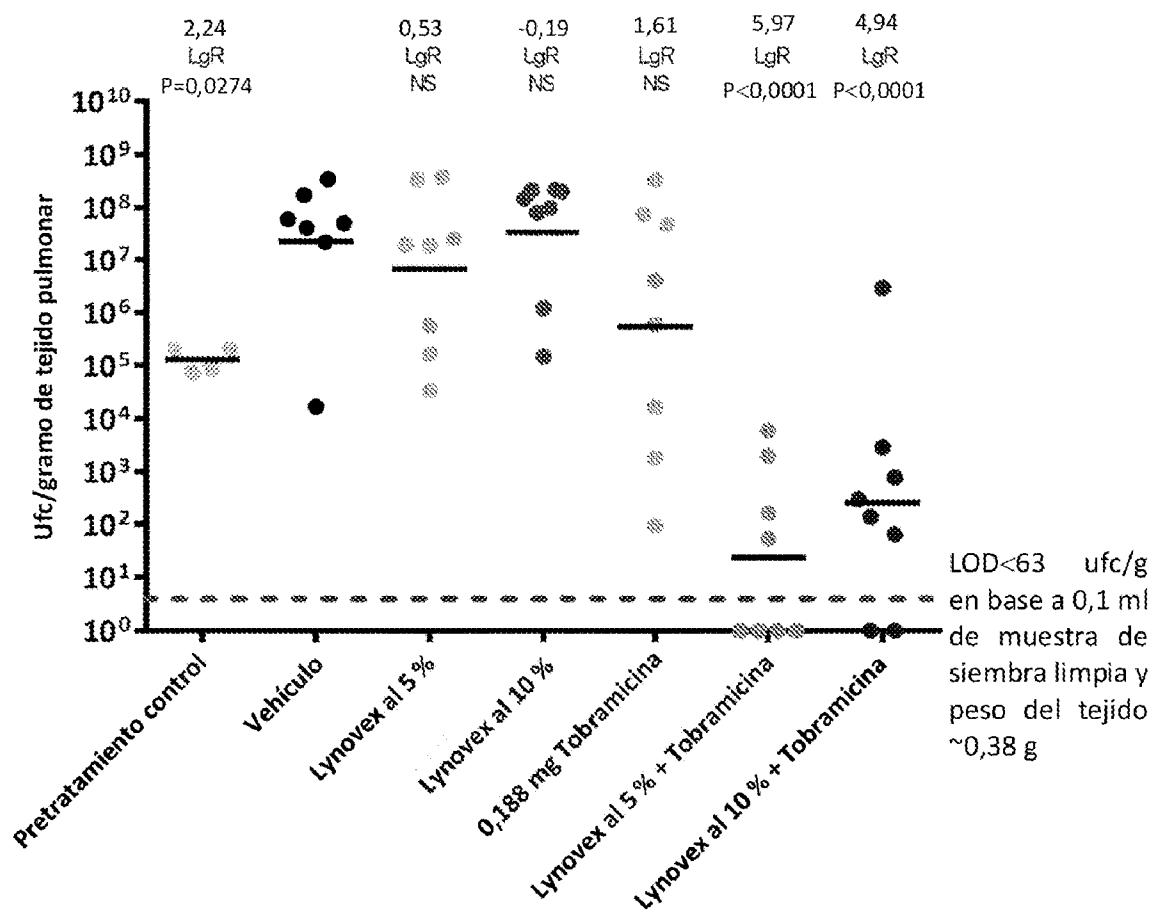


Figura 6

