

NUEVA SAL DE CISTEAMINA PARA LA PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS ALTAMENTE INHALABLES

Campo de la Invención

5 Nueva sal de cisteamina para la preparación de partículas altamente inhalables

Antecedentes de la Invención

10 La cisteamina es un ingrediente activo conocido por ser útil para el tratamiento de la cistinosis. Hasta la fecha, varios productos farmacéuticos tales como Cystagon® (cápsulas de bitartrato de cisteamina), Procysbi® (cápsulas gastroresistentes de bitartrato de cisteamina) y Cystadrops® (gotas oftálmicas de clorhidrato de cisteamina) han sido autorizados en Europa con esta indicación terapéutica.

15 En tiempos relativamente recientes, se le ha concedido a la cisteamina una designación huérfana para la fibrosis quística. La fibrosis quística (CF) es una enfermedad hereditaria que afecta a las células en los pulmones y a las glándulas en el intestino/páncreas que secretan fluidos tales como moco o jugos digestivos, respectivamente. 20 Como consecuencia, estos fluidos llegan a ser gruesos y viscosos, bloqueando tanto las vías aéreas como el flujo de jugos digestivos. Esto conduce no solo a problemas con la digestión y absorción de los alimentos sino, incluso en el peor de los casos, en la infección a largo plazo e inflamación de los pulmones. Debido a la disminución en la función 25 pulmonar, las exacerbaciones o episodios de empeoramiento agudo de los síntomas del pulmón CF, a menudo como resultado de la infección bacteriana, son la causa principal de morbilidad y mortalidad.

Hasta la fecha, la enfermedad pulmonar en la fibrosis quística se trata principalmente con una combinación de antibióticos, agentes 30 antiinflamatorios, broncodilatadores y mucolíticos.

La cisteamina fue mostrada para tratar favorablemente los síntomas de CF reduciendo el espesor del moco permitiendo que sea eliminado más fácilmente (actividad mucolítica) y, al mismo tiempo, actuando directamente contra las bacterias en los pulmones (actividad 35 antibacteriana).

Por lo tanto, las propiedades multi-activas globales de cisteamina (disminución del moco excesivo en las vías aéreas, matar las bacterias responsables de las infecciones respiratorias recurrentes y romper las biopelículas en las cuales colonizan) pueden ser terapéuticamente

benéficas en pacientes con CF (véase Graham Devereux et al. "Cysteamine as a Future Intervention in Cystic Fibrosis Against Current and Emerging Pathogens: A Patient-based ex vivo Study Confirming its Antimicrobial and Mucoactive Potential in Sputum" EBioMedicine (2015) 1507-1512; y Charrier Et al, 2014: <http://dx.doi.org/10.1188/s13023-014-0189-2>).

Como consecuencia de estos hallazgos, se necesitan formulaciones inhalables de cisteamina para el tratamiento de enfermedades pulmonares. De hecho, para mejorar la efectividad de la cisteamina en los pulmones, el fármaco debe ser suministrado como aerosol directamente las vías aéreas del paciente.

La administración pulmonar de fármacos posee muchas ventajas en términos de administración de fármacos, tales como vía no invasiva de administración, actividad metabólica inferior, evitar el metabolismo del primer paso, absorción sistémica inmediata y, concentración local alta del fármaco que permite el contraste de la infección/inflamación de la mucosa pulmonar, y para mejorar la sanación del tejido. Sin embargo, para enfrentar las partículas extrañas introducidas en el cuerpo, los pulmones presentan múltiples mecanismos de depuración (transporte mucociliar, macrófagos alveolares, degradación absorbente y metabólica) que, desafortunadamente, pueden actuar como barreras a los fármacos inhalados que comprometen la eficacia terapéutica de los mismos. Por lo tanto, con el fin de limitar los mecanismos de aclaramiento pulmonar y proporcionar un efecto terapéutico mejorado y/o liberación controlada de fármaco, los sistemas de suministro de fármacos basados en partículas han surgido como una alternativa innovadora y prometedora a las soluciones de fármacos inhalados convencionales.

La solicitud US 2017/0348254, por ejemplo, describe micropartículas de bitartrato de cisteamina preparadas por secado por pulverización del principio activo junto con agentes estabilizantes tales como trehalosa y leucina. Sin embargo, el desempeño aerodinámico del polvo obtenido fue bajo y las dosis de partículas finas fueron mínimas reportadas, después de la pulverización de una cantidad de polvo secado por aspersión aproximadamente entre 160 y 270 mg, una dosis de partículas finas de bitartrato de cisteamina solamente entre 3 y 6,9 mg.

Por lo tanto, considerando esta cantidad muy baja de fármaco depositado en el pulmón después de la pulverización de más de 100 mg de polvo, todavía es necesaria una formulación inhalable efectiva de cisteamina que tenga una alta respirabilidad.

Otro problema para tomar en cuenta es la inestabilidad de la cisteamina en el estado sólido en vista de la administración vía inhalación. Desafortunadamente, las micropartículas pulmonares inhalables hechas con las sales de cisteamina existentes (tales como las descritas en US 2017/0348254), también en el intervalo de tamaño óptimo para el suministro pulmonar (1-5 μm), revelan muy poca penetración pulmonar, principalmente debido a la alta sensibilidad del principio activo a las condiciones ambientales. Dichas sales, en realidad, son higroscópicas, delicuescentes y propensas a la degradación oxidativa. Además, las sales de cisteamina conocidas a partir de productos comercialmente disponibles, tales como clorhidrato y bitartrato, tienen un tamaño de partícula no favorable que determina malas propiedades aerodinámicas que hacen a las sales inadecuadas para la inhalación como formulación en polvo seco.

CN101 367 884, además, describe un conjugado de ácido hialurónico tiolado covalentemente unido (enlace amida) cisteamina y un método de preparación del mismo. El método comprende añadir 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodiimida (EDAC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) en la solución de ácido hialurónico con el fin de activar el grupo carboxílico; después, añadir clorhidrato de cisteamina y liofilizar la mezcla de reacción proporcionando un conjugado fármaco/polímero útil como material bioadhesivo para preparaciones no inyectables. Sin embargo, el método implica tanto EDAC como NHS, reactivos no reconocidos como seguros para la inhalación. Además, el conjugado es una nueva entidad química que modifica la seguridad reconocida de cisteamina para usos humanos. Finalmente, el conjugado obtenido es un polvo liofilizado, que no es incluso adecuado para la inhalación en inhaladores de polvo seco.

Por lo tanto, el uso de cisteamina como polvo seco para la inhalación en el tratamiento de enfermedades pulmonares, además requiere el descubrimiento de nuevos derivados secos estables y respirables del fármaco.

Breve descripción de las Figuras de la Invención

Figuras 1a y 1b: imágenes SEM de a) partículas cisteamina base y b) micropartículas secadas por pulverización de cisteamina-hialuronato. Las micropartículas secadas por pulverización mostraron estructuras redondas y superficies contraídas, mientras que la base de cisteamina muestra partículas similares a las escamas.

Figuras 2a - 2c: espectros FT-IR de a) una base de cisteamina, b)

hialuronato sódico y c) micropartículas secadas por pulverización de ácido hialurónico.

Figura 3: espectro FT-IR de micropartículas secadas por pulverización de hialuronato de cisteamina.

5 Figura 4: espectros de RMN-¹³C de hialuronato de sodio, micropartículas secas por pulverización de hialuronato de cisteamina, micropartículas secas por pulverización de ácido hialurónico y cisteamina base. Comparando el espectro del hialuronato de cisteamina con los otros, la formación de sales se evidencia claramente por la presencia de picos de ambos contraiones, ácido hialurónico y cisteamina. Sin embargo, el espectro de las micropartículas secadas por pulverización de cisteamina-hialuronato muestra diferencias en comparación con los espectros de los contraiones solos y del hialuronato de sodio.

10 Figuras 5a - 5d: imágenes SEM de micropartículas secadas por pulverización de cisteamina-hialuronato:

a) formulación # 2: 2.2% de cisteamina/87.8% de hialuronato de sodio,

b) formulación # 5: 13.1% de cisteamina/78.2% de hialuronato de sodio/8.7% de L-leucina.

15 c) formulación # 7: 13.4% de cisteamina/69.1% de hialuronato de sodio/17.5% de L-leucina.

20 d) formulación # 8: 12.1% de cisteamina/70.2% de hialuronato de sodio/17.7% De L-leucina.

Descripción detallada de la Invención

Definiciones

25 Para el propósito de la presente invención, el término "respirabilidad" se refiere a la cantidad de fármaco depositado en los pulmones con respecto a la cantidad de polvo a pulverizar.

30 El término "dosis de partículas finas" (FPD) es la cantidad de fármaco en la dosis suministrada, cuyas partículas tienen un diámetro aerodinámico inferior a 5 µm. Estas partículas son capaces de penetrar en el pulmón durante la inhalación. El término "fracción de partículas finas" (FPF) es el FPD expresado como porcentaje de la dosis suministrada que es la cantidad de polvo que sale del inhalador.

35 El término "tamaño medio de partícula" describe el diámetro de partículas en µm en donde la distribución de tamaño de partícula se divide igualmente en dos poblaciones. Para el propósito de la presente invención, el tamaño medio de partículas se calcula en una distribución de volumen (D_{V50}).

El término "capacidad total", cuando se refiere a una resina de intercambio iónico, significa el número total de sitios disponibles por unidad de peso al que puede enlazarse un contraión para el intercambio iónico. Se expresa en miliequivalentes por gramo (meq/g).

5 El término "enfermedad pulmonar" incluye cualquier enfermedad respiratoria que afecta a los pulmones tales como, por ejemplo, fibrosis quística y COPD.

La abreviatura de "NaHA" significa hialuronato de sodio, mientras que "HA" significa ácido hialurónico. El término "aproximadamente",
10 cuando se refiere a un valor, significa el valor indicado más o menos 5% mientras que, cuando se hace referencia a un intervalo, significa los valores más altos más o menos 5%.

Hasta la fecha, nunca se ha empleado una sustancia polimérica tal como ácido hialurónico para la preparación de nuevas sales de cisteamina.

15 El HA es un polisacárido natural que consiste en una cadena lineal de ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina, y es un constituyente abundante de la matriz extracelular del tejido conectivo, fluido sinovial, mesénquima embrionaria y humor vítreo. A pesar de ser conocido por su actividad antiinflamatoria, el ácido hialurónico nunca se ha
20 considerado como contraión para la obtención de una sal de cisteamina. De hecho, debido a su escasa acidez, no se espera que el HA forme una sal estable con la amina de base débil en forma sólida. Además, el HA está comercialmente disponible en forma de sal sódica de ácido hialurónico que evita al HA formar una sal con la amina-cisteamina débil.

25 Después de experimentos extensos, los inventores de la presente invención se han encontrado sorprendentemente que es posible obtener fácilmente una sal de hialuronato de cisteamina que es estable en forma sólida y puede servir favorablemente para hacer micropartículas altamente respirables.

30 Por lo tanto, un primer objetivo de la presente invención es un proceso para la preparación de micropartículas de hialuronato de cisteamina, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- a. Disolver hialuronato de sodio.
- b. Añadir una resina de intercambio iónico.
- 35 c. Filtración la solución obtenida.
- d. Añadir la cisteamina base.
- e. Secar por pulverización la solución obtenida.

En detalle, la etapa "a" proporciona la disolución de hialuronato

de sodio que tiene un peso molecular entre 22 kDa y 2 MDa, preferiblemente entre 30 kDa y 1 MDa, en un disolvente adecuado. Dicho disolvente puede ser un disolvente polar, preferiblemente agua. El valor de pH de la solución hialuronato oscila entre 6.1 y 6.9.

5 La etapa "b" proporciona la adición de una resina de intercambio iónico, preferiblemente una resina de intercambio catiónico, a la solución hialuronato. En una modalidad preferida, se emplea una resina de intercambio catiónico de ácido fuerte (por ejemplo, Dowex Monophere™ 650C (H) matriz de estireno-DVB-gel y ácido sulfónico como grupo
10 funcional). La resina catiónica fuerte se puede utilizar en modo discontinuo o continuo. Preferiblemente, la resina se usa en modo discontinuo, lo que significa que la solución hialuronato se pone en contacto directo con la resina durante el tiempo necesario para completar el intercambio iónico y luego eliminarse. Para aumentar el contacto
15 entre hialuronato sódico y la resina, la solución se puede mantener bajo agitación durante un período de tiempo adecuado tal como, por ejemplo, de 1 a 3 horas. Por lo tanto, el ácido hialurónico libre se obtiene a partir de la solución hialuronato explotando la capacidad de la resina para intercambiar iones H^+ con iones Na^+ . El valor de pH de la solución
20 de HA obtenida oscila entre 2.2 y 2.8.

La resina agotada se retira después de la solución de HA por filtración (etapa c). El término "filtración" abarca cualquier método de filtración conocido por los expertos en la técnica tal como, por ejemplo, filtración por embudo Buchner o por membrana. Después de la
25 recuperación de la solución de HA, se añadió la base libre de cisteamina (etapa d) proporcionando la formación de una solución de sal de cisteamina base/ácido hialurónico. La solución de sal obtenida en la etapa "d" tiene una relación en peso (p/p) de base de cisteamina: ácido hialurónico (como hialuronato) que varía entre 1:3 y 1:10,
30 preferiblemente entre 1:5 y 1:8, con mayor preferencia aproximadamente 1:7. El valor de pH de la solución salina obtenida oscila entre aproximadamente 3.7 y 6.9.

La solución salina se somete finalmente a un proceso de secado por pulverización (etapa e). El secado por pulverización se realiza por
35 medio de un secador de pulverización adecuado tal como, por ejemplo, el secador de Pulverización Büchi mini-spray B-191 o B-290. Para el propósito de la presente invención, los intervalos de condiciones operacionales preferidos, pero no limitativos, pueden ser los

siguientes: temperatura de entrada entre 120 y 160°C, aspiración entre 80 y 100%, velocidad de alimentación entre 2 y 6 mL/min y velocidad de flujo de aire entre 400 y 700 L/h. Además, el intervalo de limpieza de la boquilla se ajustó a nivel 5 (un golpe de presión cada 7 s).

5 Favorablemente, dicha etapa de secado "e" permite obtener fácilmente micropartículas de hialuronato de cisteamina inhalables.

Dichas micropartículas, de hecho, tienen una distribución de tamaño normal logarítmica, con un tamaño medio de partículas (D_{V50}) por debajo de 10 μm , preferiblemente por debajo de 5 μm , y una desviación estándar de la media menor o igual a $\pm 0.5 \mu\text{m}$. La distribución del tamaño de partículas de los polvos secados por pulverización se determinó por dispersión de luz láser (SprayTec, Malvern, UK). Aproximadamente 10 mg del polvo se dispersaron en 20 ml de solución al 0.1% (p/v) de Span 80 en ciclohexano y se sonicaron durante 5 minutos. Entre las formulaciones 10 # 2 y # 8, reportados en la Tabla 1, los valores de D_{V50} y la desviación estándar fueron 2.66 ± 0.03 y 2.57 ± 0.06 , respectivamente.

La caracterización morfológica de las micropartículas secadas por pulverización se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, SUPRA 40, Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, DE). En detalle, la 20 base de cisteamina (Figura 1 (a)) muestra partículas similares a escamas, mientras que las micropartículas secadas por pulverización de hialuronato de cisteamina (b) muestran estructuras redondas con superficie encogida. Esta estructura revela que las partículas de la sal están vacías proporcionando una ventaja importante para la 25 respirabilidad, debido al bajo valor de densidad aparente del polvo hecho por partículas vacías. La densidad aparente de los polvos se determinó de acuerdo con Ph. Eur. última edición. Los valores de densidad aparente obtenidos fueron $0.24 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$ para polvo # 2 y $0.22 \pm 0.01 \text{ g/cm}^3$ para polvo # 8.

30 Adicionalmente, las condiciones de secado por pulverización proporcionan un polvo de micropartículas que es física y químicamente estable. Como se discutió anteriormente, la base libre de cisteamina (pK_a 9.42) es una molécula bastante inestable no solo en solución sino también como polvo en condiciones ambientales. El ácido hialurónico, 35 como contraión salino, estabiliza la amina tiolato. El polvo de micropartículas secado por pulverización resultante para la inhalación, debido a la cisteamina embebida en la estructura polimérica de ácido hialurónico, es más resistente a las condiciones ambientales de

almacenamiento que otras sales de cisteamina.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a micropartículas que comprenden hialuronato de cisteamina y opcionalmente un aditivo farmacéuticamente aceptable. Hasta este punto, la etapa "d" puede comprender además añadir a la solución de ácido hialurónico, aditivo(s) útil para mejorar la conformación de partículas o aumentar la estabilidad de las partículas. El (los) aditivo(s) farmacéuticamente aceptable(s), por ejemplo, se puede seleccionar del grupo que consiste en aminoácidos tales como leucina, azúcares como trehalosa, o ácidos orgánicos como ácido ascórbico o ácido acético.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a micropartículas revestidas de hialuronato de cisteamina. En esta medida, la etapa "e" puede proporcionar la pulverización concurrente de dos soluciones separadas, una del ingrediente activo internamente (orificio interior) y uno de los aditivos (s) externamente (orificio exterior) con respecto a la boquilla. En detalle, el orificio interno se alimenta con la solución cisteamina base/ácido hialurónico, mientras que el orificio exterior se alimenta con una solución que comprende el aditivo (s). Las dos soluciones se pulverizan entonces de manera concurrente pero separada a través de una boquilla, preferiblemente una boquilla coaxial, que tiene un diámetro que varía de 0.5 a 0.9 mm, preferiblemente igual a 0.7 mm, permitiendo obtener micropartículas revestidas secas por pulverización con características uniformes.

En una modalidad preferida, el aditivo seleccionado es L-leucina. La leucina se conoce como lubricante adecuado para la preparación de partículas inhalables. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, la leucina, que se deposita externamente, promueve una acción protectora sobre el hialuronato de cisteamina, incrementando así la estabilidad física/química de las micropartículas de hialuronato de cisteamina. De hecho, los inventores han encontrado sorprendentemente que la leucina tiene la propiedad valiosa para contrarrestar tanto la adhesividad del ácido hialurónico como la higroscopicidad de la cisteamina.

Las micropartículas de acuerdo con una modalidad preferida de la invención comprenden:

10 a 30% p/p de cisteamina,
50 a 80% p/p de ácido hialurónico, y
6 a 20% p/p de leucina.

El proceso según la presente invención permite obtener un polvo

cuyas partículas tienen tamaño, densidad y forma adecuadas para la formación de un aerosol estable con un flujo de aire lento. El aerosol obtenido facilita el transporte de partículas de fármaco en los pulmones por inhalación para alcanzar, de manera predecible y reproducible, la parte bronquial y alveolar del tracto respiratorio.

De acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención, la fracción respirable (FPF) de las micropartículas obtenidas puede alcanzar sorprendentemente valores superiores al 60%. Esto es particularmente evidente en los polvos en los que se añade el aditivo leucina. Los resultados óptimos se pueden obtener cuando la boquilla coaxial se emplea para pulverizar la solución de leucina que tiene un porcentaje de leucina mayor que 10% p/v. Las soluciones con una concentración menor de leucina, en su lugar, son más realizables con la boquilla clásica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende micropartículas de hialuronato de cisteamina de acuerdo con la presente invención. En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de micropartículas de hialuronato de cisteamina o composiciones de las mismas en un inhalador de polvo seco.

Un problema importante dirigido y resuelto por la presente invención es la provisión de un nuevo derivado de sal estable de cisteamina. Favorablemente, el proceso de la presente invención permite obtener una nueva sal de cisteamina, que es hialuronato de cisteamina. Por lo tanto, un objetivo adicional de la presente invención es la sal hialuronato de cisteamina.

La formación de la nueva sal de hialuronato de cisteamina a través del proceso de la presente invención se demostró por espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR).

Las mediciones espectrales FT-IR se tomaron a temperatura ambiente utilizando un modo de transmitancia Jasco FT/IR-460 Plus Jasco en el intervalo de números de onda de 4000-650 cm^{-1} . La muestra analizada se preparó dispersando el polvo con KBr en relación 1:9 (p/p) en un mortero y luego compactando la mezcla con una prensa hidráulica. El espectro FT-IR de micropartículas secadas por pulverización de ácido hialurónico (Figura 2 (c)) difiere del de hialuronato de sodio en polvo (b) por la presencia de una banda de horquilla, hecha de tres picos, atribuido a la vibración de estiramiento del pico C=O del grupo carboxílico (1734 cm^{-1}), la vibración de estiramiento del pico C=O del grupo amida

secundaria (1641 cm^{-1}) y la deformación NH (II amida) (1561 cm^{-1}). Además, se observa una variación en términos de intensidades y desplazamientos de los picos a 1417 , 1378 y 1320 cm^{-1} , con respecto al hialuronato de sodio. Finalmente, es evidente una diferencia en la banda a 1043 cm^{-1} , donde el hombro a 1077 cm^{-1} se convierte en un pico.

En relación al espectro FT-IR del polvo secado por pulverización de hialuronato de cisteamina (Figura 3), la banda a $\sim 1645\text{ cm}^{-1}$ corresponde tanto al estiramiento del grupo- NH_2 de cisteamina y al estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ del grupo carboxílico del ácido hialurónico. En comparación con los espectros FT-IR de la base libre de cisteamina y el ácido hialurónico, una diferencia que indica una interacción de estos grupos funcionales en el polvo secado por pulverización de hialuronato de cisteamina es evidente. Además, a partir del análisis del espectro FT-IR del polvo secado por pulverización de la sal de hialuronato de cisteamina, se observa una reducción de la intensidad del pico a 1370 cm^{-1} (vibración de estiramiento del grupo metilo del hialuronato), volviéndose el hombro de la banda a 1410 cm^{-1} . La intensidad del pico a 1077 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de estiramiento de $\text{C}-\text{O}$ del grupo carboxílico, se reduce como se demuestra por su transformación en un hombro (como en el espectro del hialuronato de sodio). Esto además soporta la interacción entre la base de cisteamina y el ácido hialurónico al nivel del grupo carboxílico del ácido hialurónico y del grupo amino de la cisteamina.

La formación de la nueva sal de hialuronato de cisteamina se investigó adicionalmente mediante análisis de RMN ^{13}C en estado sólido. Se recogieron los espectros de base libre de cisteamina, hialuronato de sodio, polvo secado por pulverización de ácido hialurónico y polvo secado por pulverización de hialuronato de cisteamina con un espectrómetro de RMN JNM-ECZR 400 (Jeol, Peabody, USA) en estado sólido. Comparando el espectro del hialuronato de cisteamina con los otros, la formación de sales se evidencia claramente por la presencia de picos de ambos contraiones (Figure.4), con un pequeño desplazamiento de estos picos debido a la influencia de los diferentes vecinos en comparación con los contraiones solos (ácido hialurónico y cisteamina). Además, se observan diferencias significativas en los espectros de hialuronato de sodio y ácido hialurónico. En particular, en el espectro de ácido hialurónico, aparece un hombro en el pico a aproximadamente 175 ppm y el pico a aproximadamente 69 ppm , que está presente en el espectro de hialuronato

de sodio, desaparece.

El hialuronato de cisteamina es estable en condiciones ambientales, no propenso a la degradación oxidativa, no-higroscópico y no-delicuescente.

5 De hecho, después de un mes a 25 °C/60% de HR se evaluó la estabilidad química por análisis de HPLC y la estabilidad física por ensayo de respirabilidad *in vitro*. No se observó variación, con respecto al polvo
10 secado por pulverización de hialuronato de cisteamina en el tiempo 0, en términos de contenido de impurezas de cisteamina y fracción de partículas finas.

Además, se encontró que el hialuronato de sodio limita los múltiples
mecanismos de aclaramiento pulmonar, permitiendo obtener un efecto
terapéutico más efectivo y prolongado sobre los pulmones de un fármaco
llevado (véase Ibrahim M. El-Sherbiny et al. "Inhaled Nano and
15 microparticles for drug delivery", Glob Cardiol Sci Pract (2015), 2, 1-14). De esta manera, el efecto terapéutico de la sal de hialuronato de cisteamina tiene que ser asignado tanto a las porciones de cisteamina como a las de hialurónico.

Por lo tanto, los inventores han encontrado sorprendentemente una
20 nueva sal de cisteamina que supera los inconvenientes de los conocidos en la técnica no solo debido a las características químicas/físicas ventajosas, sino también a causa del efecto terapéutico más efectivo y prolongado sobre el epitelio pulmonar.

La presente invención proporciona además hialuronato de cisteamina
25 para su uso como un medicamento, en particular en el tratamiento de enfermedades pulmonares, más en particular en el tratamiento de condiciones de infección de fibrosis quística.

En conclusión, el proceso de fabricación de la presente invención
permite obtener un derivado de sal estable de cisteamina, es decir,
30 hialuronato de cisteamina, ya en forma de micropartículas fácilmente inhalables.

Descripción de las modalidades preferidas

Las modalidades descritas en la presente invención tienen propósitos
ilustrativos solamente y no pretenden limitar el alcance de la presente
35 invención. Además, se pretende que las modificaciones y alteraciones de las modalidades a continuación descritas, obvias para un experto en la técnica, sean abarcadas por las reivindicaciones anexas.

Caracterización de micropartículas secadas por pulverización de

hialuronato de cisteamina

Partiendo de hialuronato sódico 0.35 MDa (#2-#6) o 0.9 MDa (#1), se han preparado polvos secados por pulverización de hialuronato de cisteamina, con o sin aditivo(s), de acuerdo con la presente invención (Tabla 1). El uso de hialuronato de sodio a diferente peso molecular no afecta adversamente a las propiedades del producto final, en términos de ensayo de cisteamina, densidad aparente y distribución de tamaño de partícula del polvo secado por pulverización.

Tabla 1 Composiciones de polvos secados por pulverización de cisteamina

Formulación	Composición (%, p/p)	Parámetros de secado por pulverización	Rendimiento (%)	Agua residual (%)	Contenido de cistemaina	FPF (%)
#1	12.9 cisteamina 87.1 NaHA	B290, T _{entrada} 150°C, T _{salida} 75°C, vel. de alimentación 5 ml/min	62.5	7.35	13.4	29.0
#2	12.2 cisteamina 87.8 NaHA	B191, T _{entrada} 120°C, T _{salida} 62°C, vel. de alimentación 5 ml/min	68.1	8.4	10.4	22.8
#3	12.7 cisteamina 87.1 NaHA 0.2 ácido ascórbico	B191, T _{entrada} 120°C, T _{salida} 64°C, vel. de alimentación 5 ml/min	24	7.9	10.8	31.8
#4	15 cisteamina 85 NaHA 0.8 ml ácido acético	B290, T _{entrada} 120°C, T _{salida} 58°C, vel. de alimentación 5 ml/min	64.2	7.5	12.7	27.0
#5	12.8 cisteamina 78.5 NaHA 8.7 L- leucina	B290, T _{entrada} 120°C, T _{salida} 60°C, vel. de alimentación 5 ml/min	66.1	5.9	10.9	65.9
#6	13.1 cisteamina 78.2 NaHA 8.7 L- leucina	B290, T _{entrada} 120°C, T _{salida} 63°C, vel. de alimentación 4 ml/min; boquilla coaxial	44.3	7.3	11.2	33.4
#7	13.4 cisteamina 69.1 NaHA 17.5 L- leucine	B290, T _{entrada} 120°C, T _{salida} 62°C, vel. de alimentación 4 ml/min; boquilla coaxial	61.1	6.0	11.4	62.3
#8	12.1 cisteamina 70.2 NaHA 17.7 L- leucina	B290, T _{entrada} 150°C, T _{salida} 75°C, vel. de alimentación 4 ml/min; boquilla coaxial	60.8	5.8	10.3	69.8

La cantidad de agua residual se valoró por análisis termogravimétrico (TGA) en el intervalo de temperatura de 25°C a 150°C.

El contenido de cisteamina en los polvos secados por pulverización se determinó mediante análisis por HPLC, en modo de gradiente. En detalle, el HPLC se equipó con un cromatógrafo Shimadzu LC -10 AT, provisto de bombas LC -10 AS y espectrómetro UV-VIS SPD-10A. La columna C18 se usó como fase estacionaria, mientras que la fase móvil estaba compuesta por el disolvente A (11.52 g de dodecil sulfato sódico disueltos en 380 ml de agua grado Milli-Q/300 ml de acetonitrilo/320 ml de metanol y 1.4 ml de H₃PO₄ al 85% v/v) y disolvente B (acetonitrilo), se mezcló con un método de gradiente a una velocidad de flujo de 1.4 ml/min. La longitud de onda de detección se fijó a 210 nm.

El valor de la respirabilidad del polvo para la aplicación como polvos inhalables se caracterizaron en términos de determinación del diámetro aerodinámico.

La evaluación aerodinámica *in vitro* de los polvos secados por pulverización obtenidos de acuerdo con la presente invención se realizó utilizando el *Fast Screening Impactor* (FSI) (Copley Scientific, UK). El FSI clasifica el polvo descargado del inhalador en dos fracciones de partículas aerodinámicas, a saber una fracción gruesa y una fracción fina (diámetro aerodinámico mayor y menor de 5 µm, respectivamente). El Colector de Fracción Gruesa (CFC) está equipado con el inserto que permite un tamaño de corte específico a 60 L/min. todas las partículas por encima de 5 µm se recogen, mientras que todas las partículas por debajo de ese tamaño pasan a través. Las partículas no capturadas en el CFC constituyen la fracción respirable del polvo pulverizado y se mantienen siguiendo la corriente de aire. Todos son capturados por el siguiente Colector de Fracción Fina (FFC), por ejemplo, un filtro (tipo A/E glass filter, 76 mm (Pall 183 Corporation, USA).

Con el fin de medir la respirabilidad, se introdujo manualmente una cantidad pesada de polvo seco por pulverización (aproximadamente 20 mg) en una cápsula dura de HPMC de tamaño 3.

La cápsula se insertó en la cámara de soporte del dispositivo de polvo seco (RS01®, Plastiap SpA, Osniago LC, Italia) y se perforó. El dispositivo se conectó a la FSI y se activó por corriente de aire durante 4 segundos a 60 L/min (correspondiente a la caída de presión 4 kPa para este inhalador). Por lo tanto, el porcentaje de cisteamina depositada

en el filtro FFC contra la cantidad cargada en la cápsula, también definido como fracción de partículas finas (FPF), se cuantificó por análisis de HPLC. Cada polvo se ensayó por duplicado.

La caracterización morfológica de las micropartículas secadas por pulverización de cisteamina-hialuronato se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Micropartículas secadas por pulverización muestran tanto estructuras redondas como superficie encogida pequeña. En particular, cuando la solución de L-leucina se pulverizó desde el orificio exterior de la boquilla coaxial, se obtuvieron micropartículas esponjosas (figura 5 b-d). Esta forma de partículas puede reducir el contacto entre las partículas haciendo su rendimiento en términos de pulverización más eficiente.

Ejemplos

Capacidad de la solución de ácido hialurónico para reaccionar con una base

25 ml de la solución de ácido hialurónico, que contiene 63.25 mg de NaHA 0.35 MDa se valoró utilizando como indicador azul de bromotimol. El titulador (solución de NaOH 0.01 N) se añadió lentamente hasta que el indicador cambió de color amarillo a azul (pH alrededor de 7.0). La neutralización de la solución de HA requirió 12.13 ml de NaOH 0.01 N (es decir, 0.1213 meq); de esta manera, 63.25 mg de NaHA 0.35 MDa en promedio contiene 0.1213 miliequivalentes de HA. Por lo tanto, la cantidad de base cisteamina (PM 77.15) que puede reaccionar con el ácido hialurónico obtenido de 63.25 mg de hialuronato de sodio, se calculó como sigue:

$$0.1213 \times 77.15 = 9.358 \text{ mg.}$$

La relación en peso de la base cisteamina: ácido hialurónico (como hialuronato de sodio PM 0.35 MDa) en la solución fue de aproximadamente 1:7 p/p

Las soluciones para el secado por pulverización se prepararon de acuerdo con este cálculo estimado.

Preparación de micropartículas secadas por pulverización de hialuronato de cisteamina

Ejemplo #1

500 mg de hialuronato de sodio (PM 0.9 MDa) se introdujeron en un matraz que contenía 170 ml de agua desionizada a 50°C bajo agitación magnética. Después, considerando que la capacidad de la resina Dowex Monosphere 650C (H) es de 2 meq/ml (densidad 1.22 g/ml), se añadieron 500 mg de resina a la solución de hialuronato y se dejaron en contacto

a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante aproximadamente dos horas hasta que el valor del pH era estable (pH 3.03). La solución obtenida que contenía ácido hialurónico se filtró utilizando un embudo Buchner y se recogió en un matraz volumétrico de 200 ml. La resina permaneció en el filtro y se lavó con 10 ml de agua desionizada para extraer el ácido hialurónico residual sobre la resina y el embudo. Después de eso, se disolvieron 74 mg de base de cisteamina en el matraz de HA bajo mezcla para proporcionar una solución de sal de cisteamina/ácido hialurónico, y el matraz volumétrico se llevó a volumen con agua desionizada.

La relación en peso de la base de cisteamina:ácido hialurónico (como hialuronato de sodio PM 0.35 MDa) en la solución fue de aproximadamente 1:7 p/p

Las soluciones obtenidas como se describe anteriormente se sometieron luego a secado por pulverización. Las condiciones operativas del secador por pulverización (Büchi mini B -290) se sedimentaron como sigue:

T_{entrada} (°C)	150
T_{salida} (°C)	75
Aspiración (%)	100
Velocidad de alimentación (ml/min)	5
Flujo de aire (L/h)	600

El rendimiento del proceso fue 62.5%. El contenido de fármaco en las micropartículas secadas por pulverización se determinó por análisis por HPLC. El polvo obtenido tenía un contenido de cisteamina de $13.4 \pm 1.5\%$. El agua residual del polvo se realizó mediante análisis termogravimétrico (TGA) en el intervalo de temperatura de 25 a 150° C. El polvo tenía un contenido de agua de 7.35%.

Ejemplos #3-#4-#5

Las micropartículas secadas por pulverización de hialuronato de cisteamina que comprenden un aditivo se prepararon de acuerdo con el Ejemplo #1 con la única diferencia de que el aditivo se agrega adicionalmente a la solución de ácido hialurónico, obtenido como se describe anteriormente, antes de la adición de la base de cisteamina.

Ejemplo #6

Se fabricaron micropartículas secadas por pulverización de hialuronato de cisteamina que comprendían el aditivo leucina mediante

secado por pulverización de la solución de cisteamina/ácido hialurónico preparada modificando el método descrito en el Ejemplo #5. En detalle, se introdujo hialuronato de sodio en un matraz que contenía 80 ml de agua desionizada a 50°C bajo agitación magnética. A continuación, la resina se añadió a la solución de hialuronato y se dejó en contacto a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante aproximadamente dos horas hasta que el valor del pH era estable. La solución obtenida que contenía ácido hialurónico se filtró utilizando un embudo Buchner y se recogió en un matraz volumétrico de 100 ml. La resina permaneció en el filtro y se lavó con 10 ml de agua desionizada para extraer el residuo de ácido hialurónico sobre la resina y el embudo. Después de eso, la base de cisteamina se disolvió en el matraz de HA, bajo mezcla para proporcionar una solución de sal de cisteamina/ácido hialurónico, y el matraz volumétrico se llevó a volumen con agua desionizada.

La solución de aditivo se preparó disolviendo leucina en un matraz volumétrico de 100 ml con agua desionizada.

La solución de aditivo se agregó a la solución de cisteamina/ácido hialurónico durante el proceso de secado por pulverización utilizando una boquilla coaxial en la cual las dos soluciones de fármaco y aditivo se mantuvieron separadas y rociadas de tal manera que la corriente de solución que sale de la boquilla se hizo por una corriente interna de solución de cisteamina/ácido hialurónico (concentración 0.46% p/v) y una corriente externa de solución de leucina (concentración 0.04% p/v).