

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE TIGECICLINA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica en forma
5 de polvo seco para administración por inhalación provista de alta transpirabilidad
y estabilidad.

En concreto, la presente invención se refiere a un polvo para inhalación
indicado para el tratamiento de infecciones pulmonares causadas por
micobacterias, en particular, micobacterias no tuberculosas, que contienen
10 fármacos pertenecientes a la clase de las glicilciclinas, en particular, tigeciclina.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Las micobacterias pertenecen al género *Mycobacterium* identificado por
primera vez en 1896. El género *Mycobacterium* comprende alrededor de 190
especies bacterianas caracterizadas por una pared celular cerosa y rica en ácido
15 micólico que confiere resistencia a la presión osmótica, a factores ambientales y
a antibióticos.

En cuanto a las infecciones pulmonares por micobacterias, se pueden
distinguir dos agentes etiológicos principales, la *Mycobacterium tuberculosis* y
las micobacterias no tuberculosas (NTM, *Non Tuberculous Mycobacteria*).

20 La *Mycobacterium tuberculosis*, el agente etiológico de la tuberculosis
(TB), difiere claramente en hábitat, patogenicidad, contagiosidad y sensibilidad
a los agentes quimioterapéuticos de todas las demás especies de micobacterias
y sigue siendo una de las causas más comunes de infección y mortalidad en el
mundo.

25 De manera diferente, las infecciones pulmonares por NTM (enfermedad

pulmonar por NTM, NTM-PD) son menos conocidas, aunque poco a poco se están convirtiendo en una de las principales preocupaciones para la salud general debido a su constante crecimiento en todo el mundo.

La clasificación de las micobacterias no tuberculosas ha seguido dos etapas. La primera etapa ha llevado a la clasificación utilizando la velocidad de crecimiento como criterio distintivo, subdividiendo las micobacterias en dos grupos. Las colonias observables a simple vista después de 7 días desde la siembra se consideraron pertenecientes a NTM (micobacterias de crecimiento lento, SGM) de crecimiento lento, mientras que las colonias visibles en menos de 7 días se atribuyeron a NTM (micobacterias de crecimiento rápido, RGM) de crecimiento rápido.

La segunda etapa en la clasificación de las micobacterias no tuberculosas se inició en los años 90 con los estudios de la secuencia del gen que codifica para el ADN ribosómico 16S, que han supuesto un aumento significativo del número de especies, hoy en día casi 150.

Las NTM son patógenos oportunistas, que causan principalmente enfermedades pulmonares similares a la tuberculosis principalmente en pacientes inmunocomprometidos o pacientes con enfermedades pulmonares preexistentes, tal como la fibrosis quística (FQ), bronquiectasia o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Aunque la incidencia de tuberculosis comenzó a disminuir durante los últimos años (reducción del 2,3 % desde 2016), la prevalencia global de infecciones pulmonares por MNT ha aumentado rápidamente. La anual varía en las distintas zonas, y generalmente oscila entre 0,2/100.000 y 9,8/100.000 con una tasa de crecimiento global alarmante. La situación es peor entre las

poblaciones vulnerables y la creciente conciencia de que la prevalencia de MNT en todo el mundo podría ser también mayor de lo estimado debido a diagnósticos erróneos es motivo de mayor preocupación.

En los países en desarrollo, el diagnóstico erróneo de MNT confundido con TB es común, debido a su aspecto similar en el examen microscópico de frotis de esputo. Esto es problemático de muchas maneras: la incidencia de MNT está ampliamente subestimada, drena innecesariamente los recursos dedicados a la lucha global contra la tuberculosis y conduce a tratamientos equivocados de los pacientes porque las infecciones por MNT no responden a los regímenes farmacológicos clásicos para la tuberculosis.

Las infecciones pulmonares por micobacterias generalmente son causadas por la inhalación de aerosoles. La fuente de estos aerosoles puede ser ambiental, como suele ocurrir con las MNT, o de otros individuos infectados, como se puede observar para la tuberculosis. Una vez en los pulmones, se considera que la fisiopatología de estas infecciones es relativamente similar, aunque la gravedad clínica parece variar. En ambos casos, el invasor patógeno es rápidamente reconocido y fagocitado por los macrófagos alveolares, donde las micobacterias sobreviven y proliferan a nivel intracelular. En respuesta, el organismo humano recluta su sistema inmunológico en forma de monocitos circulantes, neutrófilos, linfocitos T y células dendríticas para formar un granuloma, una de las marcas distintivas de las infecciones pulmonares por micobacterias. Esta estrategia a menudo permite la supervivencia de patógenos dentro del área en cuarentena, lo que conduce a la cavitación del tejido, diseminación y deterioro de la función respiratoria. Por lo tanto, cualquier terapia con micobacterias debe ser capaz de penetrar en este entorno inflamatorio para

combatir eficazmente los invasores patógenos que invaden.

Entre las MNT que causan infecciones pulmonares, el complejo *Mycobacterium abscessus* (MABc) es uno de los más importantes asociados con infecciones pulmonares, en particular en pacientes con fibrosis quística. El
5 complejo *Mycobacterium abscessus*, aislado por primera vez en 1992, se ha dividido en 3 subespecies filogenéticamente muy similares: *M. abscessus sensu stricto* (*M. abscessus* s.s.), *M. massiliense* y *M. bolletii*.

La MABc se considera la más patógena de las micobacterias de crecimiento rápido (RGM). En concreto, la MABc se asocia con resistencia
10 intrínseca y adquirida a la mayoría de los agentes antimicobacterianos, incluyendo macrólidos.

Durante los últimos años, los casos de infección humana por MABc han aumentado progresivamente, despertando una preocupación considerable en el campo clínico. El número de obras literarias sobre el aislamiento clínico de MABc
15 de pacientes con fibrosis quística, pacientes con enfermedades respiratorias crónicas y pacientes con bronquiectasia ha aumentado constantemente, cubriendo una importancia clínica cada vez mayor. Hoy en día, se considera que MABc es la causa de aproximadamente el 80 % de las infecciones pulmonares por RGM.

20 Los tratamientos conocidos para las infecciones por micobacterias suelen ser largos y requieren un cumplimiento estricto, principalmente debido a la naturaleza tenaz de las micobacterias y al desarrollo de estructuras granulomatosas. Las terapias actuales para la tuberculosis implican la administración de isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida durante 6-30
25 meses. El tratamiento de las infecciones pulmonares por NTM es en gran medida

empírico, basado en el uso de tres o cuatro antibióticos, durante al menos 12 meses.

Generalmente se prescriben pautas multimedicamentosas basadas en macrólidos (claritromicina o azitromicina) en combinación con antibióticos parenterales, tales como, por ejemplo, un aminoglucósido (estreptomicina, neomicina, kanamicina, amikacina y tobramicina), cefoxitina, imipenem o tigeciclina, para tratamientos de al menos 12 meses, que suelen prolongarse durante 18-24 meses.

El tratamiento de las infecciones pulmonares por NTM implica a menudo una importante carga económica y psicológica para los pacientes que tiene como consecuencia una alta tasa de interrupción del tratamiento. Las principales causas de interrupción del tratamiento son la larga duración del mismo, la falta de mejoras observadas y los graves efectos secundarios asociados con la administración oral y parenteral.

Por las razones antes mencionadas, existe una necesidad médica urgente de desarrollar regímenes más eficaces y seguros constituidos por fármacos más biodisponibles para el tratamiento de las infecciones pulmonares por MNT, lo que llevó al desarrollo de tratamientos con antibióticos por inhalación.

Hoy en día, la administración de fármacos por inhalación se obtiene mediante la administración con dispositivos inhaladores tales como:

- nebulizadores, para los cuales el fármaco se disuelve o dispersa en forma de suspensión, y se transporta al pulmón en forma de finas gotículas nebulizadas;
- inhaladores a presión, a través de los cuales el fármaco, todavía en forma de gotículas de solución o de suspensión, es transportado al pulmón

mediante un gas inerte que se expande rápidamente en el aire desde una lata presurizada;

- inhaladores de polvo, capaz de administrar el fármaco en el inhalador y transportarlo al pulmón como partículas secas micronizadas.

5 En la solicitud de patente internacional publicada con número WO2020/239696 se ha sugerido el uso de una glicilciclina, en particular tigeciclina, en el tratamiento de infecciones por micobacterias por inhalación. El documento WO2020/239696 describe el uso de soluciones para nebulizadores y polvos para inhaladores, este último realizado de acuerdo con el proceso
10 descrito en el documento WO2011/073002 y que comprende del 98-99,9 % de glicilciclina y del 0,1-2 % de un lubricante (en particular, estearato de magnesio).

También se conocen soluciones de una glicilciclina, en particular tigeciclina, en el tratamiento de infecciones por micobacterias por vía parenteral, como se describe en el documento WO2006/099258, obtenida por reconstitución
15 en solución acuosa de un polvo que comprende tigeciclina, un carbohidrato seleccionado de la lactosa, manosa, sacarosa y glucosa, y un ácido y/o un tampón en una cantidad para proporcionar a la solución un pH entre 4 y 5. El documento WO2014/032956 describe un ejemplo de preparación de un polvo de tigeciclina-lactosa mediante la técnica de liofilización en vial de una solución de
20 tigeciclina y lactosa con un pH entre 7,2 y 7,7.

No obstante, las glicilciclinas, y en particular tigeciclina, son principios activos que presentan dificultades técnicas de formulación de modo que, hoy en día, a pesar de que estos principios activos se conocen desde hace más de cuarenta años, solo existen formulaciones en solución para infusión intravenosa
25 en un entorno hospitalario, y no existen formulaciones, ya sea bajo aprobación o

aprobadas por las autoridades reguladoras, adecuadas para su administración por inhalación.

Las técnicas de liofilización en viales utilizadas para preparar polvos de tigeciclina para su reconstitución en solución acuosa para administración parenteral, tales como las descritas en los documentos WO2006/099258 y WO2014/032956, no permiten obtener el tamaño y las propiedades aerodinámicas necesarias para la administración por inhalación en forma de polvo. Un polvo obtenido por liofilización no es adecuado para una administración directa por inhalación.

Las formulaciones para inhalación en forma de polvo se han obtenido convencionalmente mediante trituración/micronización de principios activos en forma cristalina para obtener partículas generalmente inferiores a 5,0 μm de diámetro, más preferentemente inferiores a 2,0 μm . En general, el uso de excipientes se ha limitado a solucionar problemas de fluidez del polvo de principios activos micronizados.

Es evidente que la técnica de formulación basada en molienda/micronización tiene varias limitaciones desde el punto de vista de poder procesar principios activos, incluidos aquellos que difieren ampliamente en características químicas y fisicoquímicas, al tiempo que se garantiza que la formulación final posea propiedades aerodinámicas adecuadas para la administración por inhalación a las regiones profundas del sistema respiratorio.

A este respecto, un enfoque eficaz para obtener polvos inhalables con buenas propiedades aerodinámicas está representado por la ingeniería de partículas, alcanzable mediante la técnica de producción de secado por pulverización. De acuerdo con esta técnica, el principio activo y los excipientes

adecuados se pueden combinar para formar partículas cuyas propiedades aerodinámicas están definidas por la composición y por las condiciones del proceso adoptadas.

5 A pesar de las oportunidades que ofrece la ingeniería de partículas, esta técnica no está exenta de dificultades de formulación que superar. Entre las más importantes que se encuentran en el desarrollo de productos para inhalación en polvo se encuentra sin duda la necesidad de garantizar una estabilidad química suficiente para el producto en desarrollo durante la ejecución del proceso de producción.

10 La estabilidad de un producto para inhalación es particularmente importante en relación con el hecho de que debe administrarse en el pulmón profundo manteniendo sus características físicas para una penetración cuantitativa de partículas hasta las regiones más profundas del pulmón. A esto hay que añadir el hecho de que el número de excipientes actualmente aprobados
15 para su administración por inhalación, y por tanto aceptables en términos de toxicidad para el tejido pulmonar, es extremadamente limitado.

SUMARIO DE LA INVENCION

En vista de todas las consideraciones anteriores, sería ventajoso preparar una composición farmacéutica para administración por inhalación en forma de
20 polvo seco que comprenda una glicilciclina, en particular tigeciclina, que sea estable y fácilmente administrable con los inhaladores de polvo seco comunes, manteniendo la facilidad de implementación.

En la técnica, el problema de proporcionar una formulación para inhalación que comprende una glicilciclina, en particular tigeciclina, que sea
25 estable y pueda administrarse con inhaladores de polvo seco comunes,

manteniendo al mismo tiempo características de alta capacidad de administración y transpirabilidad, y que puedan producirse industrialmente en un proceso económicamente ventajoso, de hecho sigue sin resolverse o no se ha resuelto satisfactoriamente.

5 Por lo tanto, el solicitante ha abordado el problema técnico de preparar una formulación para inhalación que comprende una glicilciclina, en particular tigeciclina, para el tratamiento de infecciones pulmonares por micobacterias no tuberculosas, con particular interés en infecciones causadas por micobacterias pertenecientes a la especie *Mycobacterium Abscessus Complex*.

10 En particular, el solicitante ha abordado el problema de obtener una alta estabilidad de la tigeciclina, tanto durante el proceso de producción como en el producto terminado en forma de polvo seco.

 Al mismo tiempo, el solicitante ha abordado el problema de garantizar una alta transpirabilidad para alcanzar, en altas cantidades terapéuticas, las regiones
15 más profundas del pulmón, identificadas como la región bronquial y alveolar más distal con el propósito de alcanzar los macrófagos alveolares y poder penetrar dentro de ellos mediante un mecanismo de permeación directa y rápida a través de la pared celular.

 El solicitante ha observado que el uso de lactosa en una solución que
20 contiene tigeciclina mantenida a pH 7 mediante la adición de un compuesto ácido, en particular un ácido orgánico o inorgánico, preferentemente volátil a las temperaturas de trabajo del proceso de secado, permitió obtener una solución estable durante el proceso de producción del polvo mediante secado y al mismo tiempo obtuvo un polvo seco estable en el tiempo y con características óptimas
25 de transpirabilidad.

En concreto, el solicitante ha observado que estos resultados se obtuvieron cuando la cantidad de lactosa era igual o superior a la cantidad de tigeclina.

5 El solicitante también ha observado que la adición de leucina a la solución utilizada en el proceso de secado mejoró aún más las características de transpirabilidad y fluidez del polvo seco resultante así como su estabilidad frente a la humedad ambiental.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica en forma de polvo seco para administración por
10 inhalación que comprende una glicilicina, en particular tigeclina, en una cantidad inferior al 50 % en peso con respecto al peso total de la composición, y lactosa en una cantidad igual o superior a la cantidad de dicha glicilicina.

Ventajosamente, la composición farmacéutica de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención también comprende leucina.

15 El solicitante ha observado que la tigeclina presente en el polvo seco de acuerdo con la presente invención estaba sustancialmente en forma amorfa.

En un segundo aspecto, la presente invención también se refiere a un proceso para preparar una composición farmacéutica en forma de polvo seco para administración por inhalación que comprende una glicilicina, en particular
20 tigeclina, en donde dicho proceso comprende las etapas siguientes:

- (a) preparar una solución en un disolvente acuoso que comprende una glicilicina, en particular tigeclina, lactosa y opcionalmente leucina;
- (b) secar la solución de la etapa (a) para obtener un polvo seco con X_{90} inferior a 10 μm , y
- 25 (c) recoger dicho polvo seco,

caracterizado por que dicha solución comprende además un ácido orgánico o inorgánico en una cantidad necesaria para dar a dicha solución un valor de pH entre 6,5 y 7,5, preferentemente de aproximadamente 7,0.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica en forma de polvo seco para administración por inhalación para su uso en el tratamiento de infecciones micobacterianas, en particular, micobacterias no tuberculosas, en donde dicha composición comprende una glicilciclina, en particular tigeciclina, en una cantidad inferior al 50 % en peso con respecto al peso total de la composición, y lactosa en una cantidad igual o superior a la cantidad de dicha glicilciclina.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de infecciones por micobacterias, en particular, micobacterias no tuberculosas, en un sujeto que lo necesite que comprende la administración por inhalación de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica en forma de polvo seco que comprende una glicilciclina, en particular tigeciclina, en una cantidad inferior al 50 % en peso con respecto al peso total de la composición, y lactosa en una cantidad igual o superior a la cantidad de dicha glicilciclina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La descripción se indicará a continuación con referencia a las figuras adjuntas, proporcionadas únicamente con fines indicativos y, por lo tanto, no limitativos, en donde:

- la figura 1 muestra la formación de productos de degradación de un color cada vez más intenso después de 24 horas de almacenamiento de una solución de tigeciclina a 5 °C, a 25 °C y a 40 °C respectivamente;
- la figura 2 muestra el difractograma obtenido con un polvo obtenido

mediante secado por pulverización, que comprende tigeciclina y lactosa en una relación 1:1 (curva A) y con un polvo que comprende tigeciclina, lactosa y leucina en una relación 1:1:1 (curva B):

- la figura 3 muestra una fotografía de microscopio electrónico de una muestra de la formulación 1 (3A) y de la formulación 2 (3B) descrita en el ejemplo 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica en forma de polvo seco para administración por inhalación que comprende una glicilciclina, en particular tigeciclina, en una cantidad inferior al 50 % en peso con respecto al peso total de la composición, y lactosa en una cantidad igual o superior a la cantidad de dicha glicilciclina.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "polvo para administración por inhalación" se refiere a un polvo adecuado para administración pulmonar. Un polvo para administración por inhalación se puede dispersar e inhalar mediante un inhalador adecuado, de modo que las partículas que lo componen puedan penetrar dentro de los pulmones hasta los alvéolos para llevar a cabo las características farmacológicas del principio activo que lo compone. Las partículas con un diámetro aerodinámico inferior a 5,0 μm se consideran normalmente inhalables.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "polvo seco" se refiere a un polvo que tiene un contenido de humedad inferior al 10 %, preferentemente inferior al 5 %, más preferentemente inferior al 3 %.

Ventajosamente, la glicilciclina utilizada en la composición farmacéutica de la presente invención es la tigeciclina. Otras glicilciclinas útiles en la

composición farmacéutica de la presente invención son la eravaciclina, y otras gliciliclinas experimentales conocidas con el acrónimo DMG-DMDOT, DMG-MINO y DMG-DOXY.

La cantidad de tigeciclina presente en la composición farmacéutica en forma de polvo seco de la presente invención es preferentemente del 15 % al 45 %, más preferentemente del 20 % al 40 %, incluso más preferentemente del 25 % al 35 % en peso con respecto al peso total de la composición.

La cantidad de lactosa presente en la composición farmacéutica de la presente invención es preferentemente del 30 % al 85 %, más preferentemente del 35 % al 80 %, incluso más preferentemente del 40 % al 75 % en peso basado en el peso total de la composición.

Ventajosamente, la relación en peso entre la cantidad de tigeciclina y la cantidad de lactosa presente en la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención está entre 1:1 y 1:3, preferentemente entre 1:1 y 1:2.

Ventajosamente, la composición farmacéutica de la presente invención también comprende leucina.

De acuerdo con un aspecto preferido de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención comprende leucina en una cantidad del 5 % al 30 %, preferentemente del 10 % al 25 % en peso con respecto al peso total de la composición.

La leucina es un aminoácido natural cuyas características de tolerabilidad local después de la inhalación están ahora ampliamente reconocidas y documentadas, aunque todavía no se ha introducido en el mercado un polvo para inhalación que contenga leucina como excipiente.

La leucina es un aminoácido hidrófobo y el solicitante ha observado que

durante el proceso de secado, la leucina tiende a depositarse sobre la superficie de las partículas formando una capa sustancialmente hidrófoba que mejora la resistencia a la humedad y la fluidez de las partículas producidas.

Ventajosamente, la composición farmacéutica de la presente invención
5 comprende tigeciclina en cantidades entre el 20 % y el 40 %, preferentemente entre el 25 % y el 35 %, lactosa en cantidades entre el 30 % y el 80 %, preferentemente entre 40 % y 70 % en peso con respecto al peso total de la composición, y leucina para la parte restante en la cantidad necesaria para alcanzar el 100 % en peso.

10 En un aspecto particularmente preferido, la composición farmacéutica de la presente invención comprende tigeciclina en cantidades de aproximadamente el 30 %, lactosa en cantidades entre el 45 % y el 60 %, y leucina en cantidades entre el 25 % y el 10 % en peso con respecto al peso total de la composición.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención tiene
15 preferentemente una distribución de tamaño (X_{90}) de modo que al menos el 90 % de las partículas tengan un diámetro equivalente inferior a 10,0 μm , preferentemente inferior a 7,0 μm , más preferentemente inferior a 5,0 μm .

El Solicitante ha observado que cuanto menor es el valor de X_{90} , mayor es la superficie del polvo y más profunda es la deposición pulmonar.

20 En concreto, la composición farmacéutica en polvo de acuerdo con la presente invención tiene un diámetro aerodinámico medio de partículas (Diámetro Aerodinámico Medio de Masa - MMAD) inferior a 5 μm , preferentemente de 2 μm a 4 μm .

Ventajosamente, la composición farmacéutica en polvo de acuerdo con la
25 presente invención tiene una fracción de partículas finas respirables (FPF)

superior al 50 %, preferentemente superior al 60 %, más preferentemente superior al 70 %.

La expresión "fracción de partículas finas (FPF)" se refiere a la fracción de polvo, en relación con el polvo total administrado por un inhalador, que tiene un diámetro aerodinámico (dae) inferior a 5,0 μm . La expresión "fracción suministrada (DF)" se refiere a la fracción del principio activo suministrado, respecto al total cargado. La prueba de caracterización que se realiza para evaluar estas propiedades del polvo es el Impactador de Próxima Generación (NGI), como se describe en la edición actual de la Farmacopea Europea. De acuerdo con la presente invención, las condiciones para realizar esta prueba consisten en someter el polvo a una aspiración a través del inhalador de manera que se genere un flujo de 60 ± 2 litros/min. Este flujo en el caso del inhalador mod. RS01 (Plastiap, Osnago IT) se obtiene generando una caída de presión en el sistema de 1,4 KPa.

De acuerdo con un aspecto preferido, la tigeciclina y la lactosa presentes en la composición farmacéutica en polvo de acuerdo con la presente invención están sustancialmente en forma amorfa, mientras que la leucina, cuando esté presente, está sustancialmente en forma cristalina.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "sustancialmente en forma amorfa" significa que el porcentaje de tigeciclina o lactosa en forma amorfa está entre el 51-100 %, preferentemente entre el 70-100 % e incluso más preferentemente entre el 90-100 % con respecto a la cantidad total de tigeciclina o lactosa en la composición farmacéutica en polvo.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "sustancialmente en forma cristalina" significa que el porcentaje de leucina en forma cristalina está

entre el 51-100 %, preferentemente, entre el 70-100 %, más preferentemente el 80-100 %, e incluso más preferentemente entre el 90-100 % con respecto a la cantidad total de leucina en la composición farmacéutica en polvo.

De acuerdo con la presente invención, el polvo también puede
5 comprender excipientes adecuados para la administración por inhalación.

Estos excipientes son preferentemente tensioactivos, tales como, por ejemplo, tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos y copolímeros en bloque de polioxietileno y polioxipropileno, conocidos como "poloxámeros", en particular el polisorbato 80 conocido como "Tween 80", azúcares tales como, por
10 ejemplo, lactosa, manitol, sacarosa, trehalosa, maltodextrinas y ciclodextrinas; ácidos grasos; ésteres de ácidos grasos; lípidos, preferentemente fosfolípidos tales como, por ejemplo, esfingofosfolípidos naturales y sintéticos, así como glicerofosfolípidos naturales y sintéticos, incluyendo diacilfosfolípidos, alquil-acil fosfolípidos y alquenil-acil fosfolípidos; aminoácidos; y péptidos tales como
15 dileucina y trileucina o proteínas hidrófobas.

La presencia de un tensioactivo es útil para asegurar la eliminación de las cargas electrostáticas eventualmente presentes en las formulaciones sin este, la presencia de ácidos grasos y otras sustancias lipídicas es útil para garantizar la suavidad del polvo, y la presencia de azúcares adicionales puede ser útil para
20 un recubrimiento adicional en polvo.

Ventajosamente, excipientes capaces de reducir la humedad residual del polvo, tales como, por ejemplo, excipientes de naturaleza hidrófoba, son particularmente útiles para mejorar la estabilidad de la composición farmacéutica de la presente invención.

25 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un proceso

para preparar una composición farmacéutica en forma de polvo seco para administración por inhalación que comprende una glicilciclina, en particular tigeciclina, en donde dicho proceso comprende las etapas siguientes:

- 5 (a) preparar una solución en un disolvente acuoso que comprende una glicilciclina, en particular tigeciclina, lactosa y opcionalmente leucina,
 - (b) secar la solución de la etapa (a) para obtener un polvo seco con X_{90} inferior a 10 μm , y
 - (c) recoger dicho polvo seco,
- 10 caracterizado por que dicha solución comprende además un ácido orgánico o inorgánico en una cantidad necesaria para dar a dicha solución un valor de pH entre 6,5 y 7,5, preferentemente de aproximadamente 7,0.

La tigeciclina es un principio activo extremadamente inestable en solución acuosa en donde sufre fenómenos de degradación principalmente por oxidación y epimerización, como se muestra en la Figura 1, que muestra la formación de
15 productos de degradación de color cada vez más intenso después de 24 horas de almacenamiento de una solución de tigeciclina a 5 °C, a 25 °C y a 40 °C, respectivamente.

El solicitante ha observado que una solución acuosa que comprende tigeciclina, lactosa y opcionalmente leucina a la que se añade un ácido orgánico
20 o inorgánico en cantidad suficiente para dar a dicha solución un valor de pH entre 6,5 y 7,5, preferentemente de aproximadamente 7,0, permite realizar el proceso de secado sin ningún fenómeno de degradación de la tigeciclina.

Preferentemente, el ácido orgánico o inorgánico es un compuesto volátil a las temperaturas de trabajo del proceso de secado, y en particular se
25 selecciona del grupo que comprende ácido fórmico, ácido acético, ácido

propiónico, ácido butírico, ácido clorhídrico, ácido brómico, ácido nítrico y ácido fosfórico.

Se prefiere particularmente el ácido fórmico porque el Solicitante ha observado que a las temperaturas de trabajo del proceso de secado, el ácido
5 fórmico se descompone en dióxido de carbono y agua, sin dejar rastro en el polvo resultante.

Ventajosamente, la etapa (a) de preparación de la solución se realiza al abrigo de la luz y a una temperatura igual o inferior a 20 °C, preferentemente inferior a 10 °C, y más preferentemente entre 0° y 5 °C.

10 Preferentemente, el disolvente utilizado está constituido por agua, ventajosamente agua desmineralizada, agua destilada, agua esterilizada o agua desionizada, pero también se pueden utilizar mezclas de agua y alcohol con una relación agua:alcohol entre 70:30 v/v y 30:70 v/v.

Ventajosamente, el disolvente utilizado se desgasifica oportunamente
15 para tener un contenido de oxígeno disuelto inferior al 10 %, preferentemente inferior al 5 %, más preferentemente inferior al 3 %.

El solicitante ha observado que la disminución del contenido de oxígeno en el disolvente permite reducir los fenómenos de oxidación de la tigeciclina, dando como resultado una mayor estabilidad del mismo en la solución preparada
20 para el proceso de secado.

Los alcoholes utilizados preferentemente se seleccionan del grupo que comprende metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-pentanol solos o en mezcla. Se prefiere especialmente el uso de etanol.

25 Ventajosamente, la solución se prepara añadiendo una gliciliciclina, en

particular tigeclina, lactosa y opcionalmente leucina al disolvente utilizado, preferentemente agua, y a continuación ajustando el pH al valor deseado, preferentemente a aproximadamente 7,0, mediante la adición de una solución acuosa al 10 % de ácido fórmico.

- 5 De acuerdo con una realización particularmente preferida de este segundo aspecto de la invención, la etapa (a) comprende las siguientes etapas:
- (a1) desgasificar dicho disolvente acuoso hasta que se obtenga un contenido de oxígeno disuelto inferior al 10 % en peso;
 - (a2) añadir a dicho disolvente acuoso dicha lactosa y opcionalmente dicha leucina, y después de la disolución completa de dicha lactosa y
10 opcionalmente de dicha leucina, añadir dicha glicilciclina, en particular tigeclina;
 - (a3) añadir un ácido orgánico o inorgánico en cantidad suficiente para dar a dicha solución un valor de pH de aproximadamente 7,0;
 - 15 (a4) enfriar dicha solución a una temperatura inferior a 5 °C en un recipiente sellado de la luz.

Ventajosamente, la etapa (b) del proceso de preparación de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo con la técnica de secado por pulverización utilizando un secador por pulverización.

- 20 El solicitante ha observado que el secado por pulverización permite obtener un polvo seco con partículas uniformes y sustancialmente amorfas.

En concreto, el Solicitante ha observado que el proceso de secado por pulverización permite obtener polvos compuestos de tamaño de partículas inhalables muy finas a través de un mecanismo de secado de una solución
25 adecuadamente atomizada en un ambiente de temperatura de entrada y salida

controlada, que ocurre en muy pocas centésimas de segundo asegurando una estabilidad sustancial del polvo obtenido después del proceso.

La velocidad de alimentación a la que es posible trabajar para obtener un polvo seco con las características deseadas de acuerdo con la invención, viene
5 dada por el tipo de secado por pulverización que se utiliza, es decir, un secador por pulverización de tamaño industrial o un secador por pulverización de tamaño "piloto", o también un secador por pulverización de laboratorio.

Ventajosamente, el Solicitante ha observado que en los secadores por pulverización de laboratorio la etapa (b) de secado por pulverización da
10 resultados óptimos con una velocidad de alimentación igual o superior a 3 g/minuto, mientras que en los sistemas de tamaño piloto se obtienen resultados óptimos con una velocidad de alimentación igual o superior a 10 g/minuto, preferentemente superior a 15 g/minuto, incluso más preferentemente igual o superior a 20 g/minuto.

15 Generalmente, la velocidad de alimentación utilizada por los secadores por pulverización de tamaño industrial está generalmente entre 150 y 200 g/minuto, pero no hay límites si se utilizaron secadores por pulverización de tamaños mayores.

Ventajosamente, la etapa (b) de secado por pulverización se realiza a una
20 temperatura de entrada entre 80° y 200 °C, ventajosamente entre 90° y 160 °C.

El término temperatura de entrada de acuerdo con la presente invención se refiere a la temperatura que alcanza la solución en la salida de la boquilla del secador por pulverización, en la entrada de la cámara de secado.

Preferentemente, la etapa (b) de secado por pulverización se realiza a una
25 temperatura de salida entre 40° y 120 °C, ventajosamente entre 50° y 100 °C.

Con el término temperatura de salida de acuerdo con la presente invención, se entiende la temperatura del producto ya seco después de salir de la cámara de secado, antes de entrar al separador ciclónico.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición
5 farmacéutica en forma de polvo seco para administración por inhalación para su uso en el tratamiento de infecciones micobacterianas, en donde dicha composición comprende una glicilciclina, en particular tigeciclina, en una cantidad inferior al 50 % en peso con respecto al peso total de la composición, lactosa en una cantidad igual o superior a la cantidad de dicha tigeciclina, y
10 opcionalmente leucina.

En concreto, la composición farmacéutica de la presente invención encuentra aplicación en el tratamiento de infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis* y por micobacterias no tuberculosas (NTM), preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en NTM de crecimiento
15 lento (SGM) y NTM de crecimiento rápido (RGM).

En concreto, las micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento (SGM) se seleccionan del grupo que consiste en *Mycobacterium avium complex* (MAC), *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium*
20 *marinum* y *Mycobacterium kansasii*.

Ventajosamente, las micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido (RGM) se seleccionan del grupo que consiste en *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus sensu stricto*, *Mycobacterium massiliense*, *Mycobacterium bolletii*, *Mycobacterium*
25 *peregrinum*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium abscessus complex*.

La presente invención se ilustrará con más detalle a continuación mediante un cierto número de ejemplos preparatorios, los cuales se proporcionan con fines puramente indicativos y sin limitación alguna de la presente invención.

5 EJEMPLO 1

Preparación de la solución que se va a secar

Para la preparación de la composición farmacéutica en forma de polvo seco de la presente invención se utilizó una solución acuosa que comprende tigeciclina y los excipientes indicados en las siguientes tablas para tener una
10 concentración de sólidos entre el 5 y el 5,5 % en peso, cuyo valor de pH se llevó a aproximadamente 7,0 con una solución acuosa de ácido fórmico al 10 %.

El proceso de preparación de la solución acuosa de tigeciclina comprende varias etapas y medidas, para mantener la estabilidad química durante toda la etapa de secado.

15 El agua utilizada como disolvente pasó por un proceso de desgasificación, con el fin de eliminar el oxígeno disuelto, a través de una corriente de nitrógeno a un flujo de (12 l/min durante 25 minutos en el caso de 100 ml de solución), hasta obtener un contenido de oxígeno inferior al 10 %, medido a través de una sonda (Oxímetro Hanna HI98198).

20 Los excipientes se disuelven en agua desgasificada, y tras la completa disolución, se añade el principio activo (Tigeciclina) en la cantidad indicada en cada ejemplo, igual a una concentración de sólidos entre el 5 % y el 5,5 % en peso.

Después de la disolución del principio activo, la solución se ajusta a pH
25 7,00 añadiendo ácido fórmico.

La solución así obtenida se mantiene refrigerada a una temperatura igual o inferior a 5 °C, dentro de un recipiente oscuro para protegerlo de la luz a la que es sensible el principio activo.

Preparación de la composición en polvo

- 5 La solución así obtenida se procesó mediante un aparato Spray Dryer ProCepT, configurando los siguientes parámetros de proceso:
- boquilla de diámetro 0,6 mm para la salida de la solución
 - gas de atomización: aire
 - presión de atomización: 0,3 MPa (3 bar)
 - 10 - gas de secado: aire
 - flujo del gas de secado: 0,35 m³/min
 - temperatura de entrada: 90 °C
 - temperatura de salida: 45-47 °C
 - velocidad de alimentación: 3 g/min
 - 15 - sistema de recogida de polvo: separador ciclónico

Al final del proceso de secado, inmediatamente después de la producción, la composición en polvo se envasó bajo atmósfera de nitrógeno en recipientes de vidrio, que a su vez fueron almacenados en bolsas de aluminio termoselladas.

20 Las siguientes tablas muestran una serie de ejemplos comparativos y de invención realizados de acuerdo con las especificaciones mencionadas anteriormente.

La Tabla 1 resume los resultados de la determinación analítica y del análisis granulométrico de las partículas obtenidas con la composición indicada en la primera columna de la tabla 1.

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

TGC: Tigeciclina

LEU: Leucina

LAT: Lactosa

ALB: Albúmina

5 WC: Contenido de agua

X₉₀: Diámetro por debajo del cual se encuentran el 90 % de las partículas

FPF: Fracción de partículas finas inferior a 5 µm

Los resultados resumidos en la tabla 1 relacionados con la determinación analítica de tigeciclina y de las impurezas presentes en el polvo resultante mostraron que la presencia de lactosa es necesaria para la estabilidad de la tigeciclina, si bien la presencia de leucina o albúmina por sí solas no es suficiente para estabilizar la tigeciclina, con la consiguiente formación de impurezas.

10

Al mismo tiempo, los resultados resumidos en la tabla 1 relacionados con el contenido de agua mostraron que la presencia de leucina permite obtener un polvo más seco con un menor contenido de agua, inferior al 5 % e incluso igual o inferior al 4 %.

- 5 Por el contrario, los resultados resumidos en la tabla 1 mostraron que la presencia de albúmina, incluso en combinación con lactosa, no permitió obtener el contenido de agua y el valor deseado de X_{90} , dando los valores más bajos de % de FPF.

- 10 Finalmente, los resultados del análisis del tamaño de partículas junto con su aerodinámica (X_{90} y % de FPF) mostró que todas las combinaciones, a excepción de la combinación ternaria TGC:LAT:ALB dio buenos resultados.

- 15 La Tabla 2 resume los resultados de la determinación analítica y del análisis del tamaño de partícula de las mismas partículas después del almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C y 60 % de HR) durante 9 meses y a 4 °C durante 15 meses.

TABLA 2

	9 meses, temperatura ambiente				15 meses, 4 °C			
Composición	% de WC	X_{90} μ m	% de TGC	% de Impurezas	% de WC	X_{90} μ m	% de TGC	% de Impurezas
100 % de TGC	6,4	3,2	81,9	18,1	5,1	3,1	-	-
TGC:LEU 1:1	4,3	3,8	84,4	15,6	3,9	3,5	-	-
TGC:LAT 1:1	7,0	4,6	95,9	4,1	5,7	4,6	98,3	1,7
TGC:ALB 1:1	7,0	4,1	-	-	6,4	4,0	-	-

	9 meses, temperatura ambiente				15 meses, 4 °C			
Composición	% de WC	X ₉₀ µm	% de TGC	% de Impurezas	% de WC	X ₉₀ µm	% de TGC	% de Impurezas
TGC:LAT:LEU 1:1:1	5,3	4,1	95,9	4,1	4,3	4,0	98,2	1,8
TGC:ALB:LEU 1:1:1	5,4	5,3	-	-	4,7	5,0	-	-
TGC:LAT:ALB 1:1:1	6,8	6,6	-	-	6,0	6,3	-	-

TGC: Tigeciclina

LEU: Leucina

LAT: Lactosa

ALB: Albúmina

- 5 Los resultados de la Tabla 2 confirmaron la estabilidad a largo plazo de las composiciones que comprenden lactosa, después del almacenamiento a 4 °C o a temperatura ambiente.

La Tabla 3 resume los resultados de la determinación analítica de las partículas obtenidas con la composición indicada en la primera columna de la
 10 tabla 1 después de almacenamiento a granel o en cápsulas durante 1 o 3 meses en diversas condiciones de temperatura o humedad relativa.

TABLA 3

	Volumen		Cápsulas estándar		Cápsulas anhidras	
Composición	40 °C	30 °C	25 °C		25 °C	
	75 %	65 %	60 % de HR		60 % de HR	
	de HR	de HR	1 mes	3 meses	1 mes	3 meses
	1 mes	1 mes				
TGC:LAT 1:2	KO	OK	OK	KO	OK	OK
TGC:LAT 1:1,5	KO	OK	OK	KO	OK	OK
TGC:LAT 1:1	KO	OK	OK	KO	OK	OK
TGC:LAT 2:1	KO	KO	KO	-	KO	-
TGC:LAT 3:1	KO	KO	KO	-	KO	-
TGC:LAT 4:1	KO	KO	KO	-	KO	-

TGC: Tigeciclina

LEU: Leucina

LAT: Lactosa

5 HR: Humedad relativa

KO: prueba fallida, formación de impurezas superior al 5 %

OK: Prueba exitosa, producto estable

Los resultados de la Tabla 3 resaltaron la necesidad de tener una cantidad de lactosa igual o mayor que la cantidad de tigeciclina, con una relación en peso entre la cantidad de tigeciclina y la cantidad de lactosa que varía de 1:1 a 1:2.

10

La tabla 4 resume los resultados de la determinación analítica de las partículas obtenidas con la composición indicada en la primera columna de la tabla 1 después del almacenamiento a granel o en cápsulas secas después del llenado en atmósfera de nitrógeno, durante 1 mes en diversas condiciones de

temperatura o humedad relativa.

TABLA 4

		40 °C/HR del 75 %		30 °C/HR del 65 %	
% de composición	TGC: LAT	Volumen	Cápsula	Volumen	Cápsula
TGC:LAT:LEU 50:40:10	1:0,8	KO	OK	OK	OK
TGC:LAT:LEU 40:40:20	1:1	KO	OK	OK	OK
TGC:LAT:LEU 30:45:25	1:1,5	KO	OK	OK	OK
TGC:LAT:LEU 30:60:10	1:2	KO	OK	OK	OK
TGC:LAT:LEU 25:50:25	1:2	KO	OK	OK	OK

TGC: Tigeciclina

LEU: Leucina

5 LAT: Lactosa

HR: Humedad relativa

KO: prueba fallida, formación de impurezas superior al 5 %

OK: Prueba exitosa, producto estable

10 Los resultados de la Tabla 4 confirmaron la utilidad de la leucina para mejorar la estabilidad a largo plazo del polvo, que pasó así con éxito la prueba a 30 °C y 65 % de humedad relativa y también la prueba más extrema a 40 °C y 75 % de humedad relativa en cápsulas secas después de llenarlas en una atmósfera de nitrógeno.

15 También en este caso, los mejores resultados se obtienen con una relación de tigeciclina:lactosa entre 1:1 y 1:2, y se observó a partir de los resultados del análisis del tamaño de partícula (X_{90} y % de FPF) que la cantidad óptima de tigeciclina resultó no ser superior al 30 % en peso.

La siguiente tabla 5 resume los resultados de la determinación analítica y del análisis del tamaño de partículas de dos formulaciones ternarias que comprenden un 30 % en peso de tigeciclina y cantidades óptimas de lactosa y leucina de acuerdo con la presente invención.

- 5 La formulación 1 comprendía TGC:LAT:LEU en una relación porcentual igual a 30:45:25 con una relación de tigeciclina:lactosa de 1:1,5 mientras que la formulación 2 comprendía TGC:LAT:LEU en una relación porcentual igual a 30:60:10 con una relación de tigeciclina:lactosa de 1:2.

TABLA 5

		Formulación 1	Formulación 2
% de TGC:LAT:LEU		30:45:25	30:60:10
TGC: LAT		1:1,5	1:2
% de WC A GRANEL		4,4	4,7
% de WC de CPS		2,6	2,0
% de TGC		101,7	99,7
% de Impurezas		1,1	0,9
PSD	X ₅₀	2,5	2,2
	X ₉₀	5,0	4,3
	VMD	2,7	2,4
PA	FPF	62,1	73,7
	MMAD	3,7	2,6
	GSD	1,77	1,83

10 TGC: Tigeciclina

LEU: Leucina

LAT: Lactosa

% de WC A GRANEL: Contenido de agua a granel

% de WC de CPS: Contenido de agua en cápsulas

PSD: Distribución de tamaño de partícula

VMD: Diámetro medio del volumen

5 PA: Parámetros aerodinámicos

FPF: Fracción de partículas finas

MMAD: Diámetro aerodinámico medio de masa

GSD: Desviación estándar geométrica

Los datos de la tabla 5 confirmaron los resultados óptimos obtenidos tanto
 10 con las composiciones 1 como 2, tanto desde el punto de vista de la
 transpirabilidad, con valores óptimos de PSD y PA, y desde el punto de vista de
 la estabilidad, con valores óptimos de tigeciclina y cantidades mínimas de
 impurezas.

La Figura 3 muestra una fotografía de microscopio electrónico de una
 15 muestra de la formulación 1 (3A) y de la formulación 2 (3B).

EJEMPLO 2

Descripción de los métodos analíticos utilizados

Los valores indicados en las tablas anteriores se determinaron con los
 siguientes métodos.

20 Caracterización de la composición en polvo

1. Análisis del tamaño de partícula

Las composiciones en polvo obtenidas se caracterizaron en términos de
 tamaño de partícula seca usando un aparato de difracción láser Sympatec
 HELOS/BR, capaz de analizar el tamaño de las partículas, equipado con el
 25 sistema de dispersión RODOS/L para el análisis de polvos, asociado al sistema

ASPIROS/L para la carga automática de la muestra.

El instrumento fue calibrado con material de referencia y preparado siguiendo las instrucciones dadas en el manual de usuario de la herramienta.

Proceso de análisis:

- 5 El producto fue muestreado en portamuestras oportuno (vial) mediante Aspiros y analizado.

El gas de dispersión utilizado fue aire comprimido oportunamente libre de partículas.

- 10 El método con el que se realizó el análisis de Distribución de Tamaño de Partícula fue el siguiente:

- Herramienta de análisis: Medidor de partículas por difracción de luz láser Sympatec HELOS/BR
- Lente: R1 (0,1-35 μm)
- Sistema de dispersión de muestras: RODOS/L
- 15 - Sistema de alimentación de muestras: ASPIROS/L
- Presión de dispersión: 0,3 MPa (3 bar), con autoajuste de despresurización
- Tiempo de integración de la señal: 10,0 s
- Duración de la medición de referencia: 10,0 s
- 20 - Medición válida en el intervalo de concentración del canal 20 del 1,5 % al 50 %
- Versión del programa informático: PAQXSOS 3.1.1
- Método de cálculo: LIBRE

- 25 Todos los análisis se realizaron en un ambiente con temperatura y humedad ambiente.

El análisis granulométrico arroja los valores de diámetro por debajo de los cuales el 50 % de la población (X_{50}), el 90 % de la población (X_{90}) y el diámetro medio en volumen (VMD) de la población de partículas en la muestra de composición de polvo caen respectivamente.

5 2. Determinación del principio activo y de los demás componentes de la composición en polvo

Para la determinación del contenido de principio activo y de los demás componentes de la composición en polvo, se utilizó un método analítico de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).

10 El método analítico utilizado se caracteriza por los siguientes parámetros:

Disolvente: Tampón fosfato 80/20 pH 8/acetonitrilo

Fase móvil: acetonitrilo/tampón fosfato pH 6,4

Elución en gradiente

Tiempo (min)	% Acetonitrilo	% de tampón pH 6,4
0	11,8	88,2
2	11,8	88,2
42	24,4	75,6
57	50	50
60	50	50
+ 10 minutos después del tiempo		

Flujo: 1 ml/min

15 Volumen de inyección: 25 µl

Columna de análisis: Agilent Pursuit XR C18, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm

Temperatura de la columna: 30 °C

Temperatura del automuestreador: 5 °C

Longitud de onda: 248 nm

Tiempo de retención: 20 min

Para los análisis se utilizó un HPLC Agilent modelo 1200 con detector tipo
5 matriz de diodos, se utilizó el modelo G1315C.

Se obtuvieron muestras para análisis del contenido de principio activo
disolviendo en el disolvente una cantidad de composición en polvo de modo que
se obtuviera una concentración entre 500 µg/ml y 600 µg/ml para tigeciclina,
como solución de referencia.

10 Para el análisis de impurezas se utilizaron muestras para el análisis del
contenido de principio activo.

La solución de referencia se inyectó tres veces consecutivas antes de la
muestra para determinar la precisión del sistema, expresado como porcentaje de
desviación estándar relativa (% de RSD) que debe ser inferior al 2 %.

15 El contenido de principio activo se obtiene mediante la relación del área
con respecto al área del pico de tigeciclina en la solución de referencia en una
concentración conocida. La degradación del producto se calcula como la relación
de la suma de las áreas de los picos analíticos correspondientes a los productos
de degradación, corregido para cada factor de respuesta, al área total (activo +
20 impurezas) en la muestra. Todos los picos analíticos cuya área fue superior al
0,1 por ciento del área total se cuentan dentro de la suma de los productos de
degradación.

3. Prueba de transpirabilidad con NGI (Impactador de Próxima Generación)

El Impactador de Próxima Generación (NGI) es un impactador para
25 polvos, descrito en la farmacopea (EP; USP), se utiliza para medir el diámetro

aerodinámico de partículas de polvo dispersas en el aire en forma de aerosol.

Una formulación para inhalación, administrada por un inhalador adecuado y transportada al dispositivo por succión, depósitos en varias fases del impactador, dispuesto en serie, en función de sus características aerodinámicas, que dependen del tamaño de las partículas, densidad y forma. A cada fase de NGI le corresponde un intervalo de tamaños de partículas aerodinámicas del polvo depositado en su interior, determinado mediante análisis cuantitativo por UV del presente principio activo.

Mediante la determinación cuantitativa del principio activo en cada fase se puede calcular la distribución de tamaños aerodinámicos del polvo y el diámetro aerodinámico medio y la fracción respirable, definida por la Farmacopea Europea como la fracción que tiene un diámetro aerodinámico inferior a 5,0 μm .

Para la prueba de transpirabilidad, los polvos de las formulaciones de los ejemplos se dividieron en cápsulas de HPMC tamaño 3 y se suministraron a través de un inhalador de polvo RS01 – modelo 7 de dosis única, cod. 239700001AB (Aerolizador - Plastiapipe S.p.A.).

El dispositivo fue ensamblado de acuerdo con las instrucciones de uso y las indicaciones de la Farmacopea Europea.

Desde el punto de vista analítico, para la ejecución de la prueba, es suficiente el suministro de una única cápsula de polvo para cada prueba de transpirabilidad. Las pruebas se realizaron a un caudal de 60 Lpm durante 4 segundos derivado de una caída de presión en el sistema de 1,4 KPa.

A este caudal para cada etapa de NGI corresponden los siguientes cortes de diámetro aerodinámico.

- fase 1: $>8,06 \mu\text{m}$

- fase 2: entre 8,06 μm y 4,46 μm
- fase 3: entre 4,46 μm y 2,82 μm
- fase 4: entre 2,82 μm y 1,66 μm
- fase 5: entre 1,66 μm y 0,94 μm
- 5 - fase 6: entre 0,94 μm y 0,55 μm
- fase 7: entre 0,55 μm y 0,34 μm
- etapa 8 (MOC): <0,34 μm

La fracción respirable (fracción de partículas finas) es la cantidad de fármaco, calculada en relación con la dosis suministrada, caracterizada por partículas que tienen un diámetro aerodinámico medio inferior a 5,0 μm y se calcula mediante un software validado adecuado (CITDAS Copley).

Los parámetros aerodinámicos de una formulación para inhalación sometida a análisis NGI, se expresan en términos de:

- Fracción suministrada (DF): es decir, el porcentaje de la dosis de principio activo liberada fuera de la boquilla del inhalador, en relación con la dosis cargada.
- 15 - Dosis de Partículas Finas (FPD): dosis teóricamente respirable de sustancia activa, caracterizada por un diámetro aerodinámico inferior a 5,0 μm .
- 20 - Fracción de Partículas Finas (FPF): fracción teóricamente respirable (diámetro aerodinámico inferior a 5,0 μm) de sustancia activa expresada como porcentaje de la cantidad liberada.
- Diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD): diámetro aerodinámico medio de las partículas suministradas.
- 25 - Desviación estándar geométrica (GSD): Desviación estándar geométrica

relativa al diámetro aerodinámico medio.

La determinación cuantitativa del principio activo en cada etapa se realizó mediante espectrofotometría UV utilizando el método analítico que se describe a continuación:

5 Disolvente: Tampón fosfato 80/20 pH 8/acetonitrilo

Cubetas para análisis: de plástico, desechables, con trayectoria óptica de 10 mm

Longitud de onda: 411 nm

10 Para los análisis, se utilizó un espectrofotómetro multicelular Agilent modelo Cary 3500.

Se obtuvieron muestras para los análisis del contenido de principio activo, derivadas de la prueba NGI, usando volúmenes de disolvente tales como para obtener un intervalo de concentración entre 0,4 µg/ml y 60 µg/ml para tigeciclina, con una solución de referencia que tiene una concentración de tigeciclina de
15 aproximadamente 25 µg/ml.

El contenido de principio activo se obtiene mediante la relación entre la absorbancia relativa y la absorbancia del pico de tigeciclina en la solución de referencia a una concentración conocida.

EJEMPLO 3

20 **Caracterización del polvo: determinación del estado sólido mediante difractometría de rayos X**

Medición de difractometría de rayos X

Se realizaron mediciones de difractometría de rayos X para determinar el estado sólido del polvo.

25 Los cristales difractan los rayos X de una manera característica de su

estructura. Por esta razón, la técnica de difracción de rayos X permite determinar el estado sólido cristalino o amorfo de los componentes de la muestra.

El instrumento utilizado es el D2-Phaser de Bruker AXS con sensor
5 LYNXEYE, software de medición DIFFRAC.MEASUREMENT CENTER.V7.

Las muestras de polvo se dispusieron en una capa uniforme sobre soportes de muestras de silicio con un diámetro de 20 mm y un espesor de 0,5 mm.

El método de análisis seleccionado utiliza la siguiente conformación del
10 instrumento:

- Fuente: cobre
- Ranura de divergencia: 0,2 mm
- Ranura Soller: 4°
- Cuchilla: 1 mm

15 Los parámetros de exploración fueron los siguientes:

- Intervalo de ángulo: 3-50° 2Theta
- Longitud del paso entre mediciones: 0,02°
- Tiempo de permanencia en cada ángulo: 1s
- Apertura del detector: 4 mm

20 - Rotación de muestras: 15 rpm

La figura 2 muestra el difractograma obtenido con un polvo que comprende tigeclina y lactosa en una relación 1:1 (curva A) y con un polvo que comprende tigeclina, lactosa y leucina en una relación 1:1:1 (curva B).

Como se observa fácilmente, la curva A no muestra ningún pico de
25 naturaleza cristalina, dando como resultado que el polvo esté sustancialmente

en forma amorfa. La curva B muestra dos picos atribuibles a la leucina que revela su alineación con tendencia a la cristalización.

EJEMPLO 4

Evaluación de la actividad antimicobacteriana

- 5 La prueba se realizó para evaluar la actividad citotóxica y la actividad antimicobacteriana contra micobacterias no tuberculosas (NTM) (*Mycobacterium abscessus*) en la línea celular de macrófagos THP-1 de la formulación 2 del ejemplo 1 constituida por tigeciclina/lactosa/L-leucina (30/60/10 p/p/p) con respecto al principio activo puro tigeciclina.
- 10 Medio DMEM completo utilizado para la composición de macrófagos
 Modificación del medio Dulbecco Eagle (Cellgro 15-017-cv) suplementado con:
 Suero fetal de ternera inactivado por calor (Atlas Biologicals, Fort Collins, CO, F-0500-A) (10 %)
- 15 LCM (10 %)
 Medio acondicionado por L929: Las células L-929 (CCL-1) (ATCC) secretan el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), la citocina que diferencia los macrófagos/progenitores de monocitos de la médula ósea en una población homogénea de macrófagos maduros. Se siembran en $4,7 \times 10^5$
- 20 células en 55 ml de DMEM + 10 % de suero fetal de ternera en una bola de 75 cm². Las células se dejan crecer durante 3 días y a continuación se recoge el sobrenadante y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm, se alicuotaron y se congelaron a -20 °C.
 El filtrado libre de células se utiliza en medios DMEM.
- 25 L-glutamina (Sigma G-7513) (2 mM)

Tampón HEPES (Sigma H-0887) (10 mM) Antibiótico/antimicótico (Sigma A-9909) (1X)

aminoácidos no esenciales MEM (Sigma M-7145) (1X)

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

5 Preparación y cultivo de la línea celular de macrófagos THP-1

Las células THP-1 se expandieron durante 2 semanas. Posteriormente, las células THP-1 se suspendieron en un medio DMEM completo (para macrófagos a una concentración de 5×10^5 células/ml). Las células se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos, 2 ml por pocillo (1×10^6 por pocillo).

La placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos permite probar por triplicado un intervalo de 7 concentraciones de fármaco y controles no tratados. Las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ en una cámara humidificada.

Los medios DMEM completos libres de antibióticos/antimicóticos no se cambiaron durante la prueba de 3 días.

Infección y tratamiento de macrófagos THP-1

El día 0, los medios se retiraron de las células y se reemplazaron con 0,2 ml de DMEM libre de antibióticos/antimicóticos que contenían *Mycobacterium abscessus* en una relación de 10 bacterias por macrófago.

Las placas de cultivo de tejidos se colocaron dentro de bolsas Ziploc cerradas y se transportaron a la incubadora. Una vez dentro de la incubadora, se abrieron las bolsas. Las células se incubaron con las bacterias durante 2 horas.

Después de la infección, las bacterias extracelulares se eliminaron lavando cada pocillo una vez con PBS. A continuación, se añadieron 2 ml de

medio DMEM completo libre de antibióticos/antimicóticos y diversas concentraciones de fármaco.

Para preparar concentraciones de fármaco, se ejecutaron diluciones en serie 2 veces añadiendo 10 ml de la suspensión anterior a 10 ml de medio completo más suero en el siguiente vial, lo que da como resultado un intervalo de prueba de 0,25, 1, 4 y 16x MIC.

Cada concentración de fármaco se probó por triplicado. Las placas de cultivo se incubaron con antibióticos a 37 °C + 5 % de CO₂ durante 3 días.

Después de 3 días, las células se trataron con gentamicina durante 2 horas para destruir las bacterias extracelulares y a continuación se lavaron 3 veces con medio. El cultivo en placas de lisados celulares infectados y expuestos a la formulación 2 y a la materia prima de tigeciclina y la evaluación de la viabilidad celular para las células THP-1 se realizaron después de 4 horas, 1 día y 2 días.

Los resultados se resumen en las siguientes Tablas 6 y 7.

TABLA 6

Resultados con tigeciclina pura

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

TABLA 7

Resultados con la formulación 1

µg/ml de formulación 1	µg/ml de tigeciclina	Día 1 CFU	Día 2 CFU	Día 3 CFU
0	0	217	1233	13.333
1	0,3	123	203	3300
2	0,6	170	163	2600
4	1,2	177	160	2000
8	2,4	163	183	517
16	4,8	193	147	497
24	7,2	163	183	160

La prueba mostró una perfusión relevante de tigeciclina dentro de los macrófagos infectados tanto del principio activo puro como de la formulación 1.

- 5 La comparación entre la eficacia de la formulación 1 con respecto al principio activo puro puso de relieve una equivalencia sustancial de comportamiento entre las dos preparaciones teniendo en cuenta que la cantidad de tigeciclina en la formulación 1 es igual al 30 % del total.

- 10 En el caso de la formulación 1, la concentración máxima de tigeciclina utilizada fue igual a 7,2 µg/ml, muy por debajo de lo evaluado con tigeciclina pura.

- 15 No obstante, la reducción de UFC de *Mycobacterium abscessus* es evidente incluso a bajas concentraciones de tigeciclina, mostrando así velocidades de disolución comparables entre la formulación 1 y el principio activo y, sobre todo, la estabilidad de la tigeciclina después de la preparación mediante secado por pulverización.

La prueba de citotoxicidad realizada preliminarmente con la formulación 1

no mostró toxicidad. Los macrófagos expuestos a la formulación 1 han mantenido el 95 % de vitalidad después de la exposición.