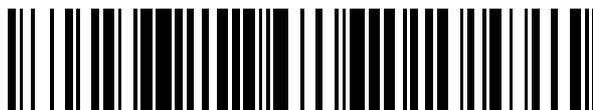


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 389**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 38/14 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10168285 .4**

96 Fecha de presentación: **02.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **2266534**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2010**

54

Título: **Combinación de fosfomicina/aminoglucósido aerosolizada para el tratamiento de las infecciones respiratorias bacterianas**

30

Prioridad:

17.05.2004 US 571739 P

03.03.2005 US 659005 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

10.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

10.12.2012

73

Titular/es:

GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)

333 Lakeside Drive

Foster City, CA 94404, US

72

Inventor/es:

BAKER, WILLIAM y

MACLEOD, DAVID

74

Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 392 389 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinación de fosfomicina/aminoglucósido aerosolizada para el tratamiento de las infecciones respiratorias bacterianas.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una formulación nueva, segura, no irritante y fisiológicamente compatible inhalable de una combinación de fosfomicina y aminoglucósido que resulta adecuada para el tratamiento de la fibrosis quística causada por las bacterias Gram-negativas, tales como *Burkholderia cepacia*, especies de *Citrobacter*, *Escherichia coli*, especies de *Enterobacter*, especies de *Fusobacterium*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Moraxella catarrhalis*, *Proteus mirabilis*, especies de *Prevotella*,
10 *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y bacterias Gram-positivas, tales como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Staphylococcus aureus* sensibles a la meticilina, *Streptococcus pneumoniae* y especies β -hemolíticas de *Streptococcus*.

Antecedentes de la invención

15 La terapia más ampliamente aceptada para el tratamiento de las infecciones respiratorias causadas por bacterias Gram-negativas en pacientes de fibrosis quística implica la administración intravenosa de un único antibiótico o de combinaciones de antibióticos (Gibson *et al.*, 2003; Ramsey, 1996). Este método de tratamiento presenta varias limitaciones significativas, que comprenden: (1) un espectro reducido de actividad de los antibióticos existentes, (2) concentraciones insuficientes de antibiótico que alcanza el tracto respiratorio para garantizar un rápido inicio y unas tasas elevadas de eliminación bacteriana, y (3) el desarrollo de efectos secundarios negativos debido a
20 concentraciones sistémicas elevadas del fármaco.

La administración en aerosol de antibióticos (Conway, 2005; O'Riordan, 2000) resuelve varias limitaciones de la administración parenteral (Flume y Klepser, 2002; Kuhn, 2001). Permite la administración tópica de concentraciones elevadas de fármaco en los espacios endobronquiales y reduce los efectos secundarios al reducir la exposición sistémica al antibiótico. Sin embargo, los pacientes de fibrosis quística reciben típicamente terapias antibióticas prolongadas y repetidas durante toda su vida (Gibson *et al.*, 2003; Ramsey, 1996). Por lo tanto, la toxicidad acumulativa de aminoglucósido y el desarrollo de resistencias resulta todavía un problema significativo.
25

Fosfomicina

La fosfomicina es un antibiótico de ácido fosfórico de amplio espectro (Kahan *et al.*, 1974; Woodruff *et al.*, 1977) que presenta actividad bactericida contra las bacterias Gram-negativas, incluyendo *Citrobacter* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *S. marcescens* (Greenwood *et al.*, 1992; Rimm, 1979; Marchese *et al.*, 2003; Schulin, 2002), así como bacterias Gram-positivas, que comprenden enterococos resistentes a vancomicina, *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA) y *S. pneumoniae* (Greenwood *et al.*, 1992; Grimm, 1979; Perri *et al.*, 2002). La fosfomicina presenta su actividad máxima contra *E. coli*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *S. marcescens*, que resultan generalmente inhibidos a concentraciones de fosfomicina ≤ 64 $\mu\text{g/ml}$ (Forsgren y Walder, 1983). La fosfomicina es moderadamente activa contra *P. aeruginosa* (Forsgren y Walder, 1983), particularmente en comparación con la tobramicina (Schulin, 2002).
30
35

La fosfomicina es bactericida, pero muestra una eliminación dependiente del tiempo de *E. coli* y *S. aureus* (Grif *et al.*, 2002). La tasa y el grado de eliminación dependen del periodo de tiempo durante el que la fosfomicina se encuentra en contacto con el organismo diana (Craig, 1998; Mueller *et al.*, 2004). El incremento de la concentración de fosfomicina no produce un incremento correspondiente de la tasa o el grado de actividad de eliminación. Esta característica resulta significativa debido a que resulta preferido tratar las infecciones por *P. aeruginosa* con antibióticos que muestran una actividad de eliminación bactericida dependiente de la concentración (Craig, 1998; Mueller *et al.*, 2004).
40

La monoterapia de fosfomicina se utiliza comúnmente en el tratamiento de infecciones no complicadas del tracto urinario causadas por *E. coli*, y menos frecuentemente en el tratamiento de infecciones respiratorias bacterianas, que comprende a los pacientes con fibrosis quística (Kamijyo *et al.*, 2001; Katznelson *et al.*, 1984; Kondo *et al.*, 1996; Reeves, 1994; Bacardi *et al.*, 1977; Bonora *et al.*, 1977; Honorato *et al.*, 1977; Menendez *et al.*, 1977). Sin embargo, la fosfomicina sola no ha sido muy utilizada para tratar infecciones causadas por *P. aeruginosa*. La fosfomicina ha sido administrada parenteralmente en combinación con antibióticos de diferentes clases para tratar la endocarditis (Moreno *et al.*, 1986) y la fibrosis quística (Mirakhor *et al.*, 2003) pero no se ha administrado directamente en el ambiente pulmonar mediante la administración por aerosol.
45
50

La fosfomicina se encuentra disponible en formulaciones tanto orales (fosfomicina calcio y fosfomicina trometamol) e intravenosa (fosfomicina disódica) (Woodruff *et al.*, 1977). La fosfomicina trometamol es la formulación preferida para la administración oral debido a que se absorbe más fácilmente en la sangre en comparación con la fosfomicina calcio. Tras una única dosis intravenosa o intramuscular de 2 g de fosfomicina, las concentraciones séricas máximas alcanzan valores comprendidos entre 25 y 95 $\mu\text{g/ml}$ en 1-2 horas (Woodruff *et al.*, 1977). En contraste, las
55

concentraciones alcanzan valores de 1 a 13 µg/ml en el pulmón normal tras la administración parenteral de una dosis comparable de fosfomicina (Bonora *et al.*, 1977), lo que resulta insuficiente para eliminar la mayoría de los patógenos bacterianos, en particular *P. aeruginosa* (Forsgren y Walder, 1983; Schulin, 2002). Los pacientes con fibrosis quística presentan una farmacocinética alterada, caracterizada por un volumen incrementado de distribución y tasa de eliminación (Tan *et al.*, 2003), que probablemente reduciría adicionalmente la eficacia de la fosfomicina administrada parenteralmente.

La fosfomicina se encuentra ampliamente distribuida en diversos tejidos y líquidos corporales, pero no se une significativamente a las proteínas plasmáticas (Mirakhor *et al.*, 2003). En consecuencia, la fosfomicina se encuentra disponible para ejercer efectos antibacterianos en el caso de que alcance concentraciones suficientes en el sitio de la infección. El tracto respiratorio de los pacientes con fibrosis quística se encuentra obstruido por secreciones viscosas denominadas esputo (Ramsey, 1996). La efectividad de varias clases de antibióticos, tales como aminoglucósidos y β-lactamos se encuentra reducida debido a la pobre penetración en el esputo. Además, la actividad de estos antibióticos se reduce adicionalmente debido a la unión a componentes del esputo (Hunt *et al.*, 1995; Kuhn, 2001; Ramphal *et al.*, 1988; Mendelman *et al.*, 1985).

El desarrollo de resistencia en bacterias aisladas de pacientes tratados con fosfomicina para las infecciones del tracto urinario se produce muy infrecuentemente (Marchese *et al.*, 2003). La resistencia cruzada con otras clases de antibióticos inhibidores de la pared celular no se produce debido a que la fosfomicina actúa sobre el enzima fosfoenolpiruvato (UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvato-transferasa), que no es diana para otros antibióticos (Kahan *et al.*, 1974; Woodruff *et al.*, 1977). La fosfomicina resulta activamente incorporada en las células bacterianas mediante dos sistemas de transporte; un transporte de L-α-glicerofosfato constitutivamente funcional y el sistema de incorporación de hexosas fosfato (Kahan *et al.*, 1974). En el caso de que surja resistencia a la fosfomicina, típicamente se debe a una mutación genética en uno o ambos sistemas de transporte codificados cromosómicamente, y menos comúnmente, debido a enzimas modificadores (Arca *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 2003).

Tobramicina

La tobramicina es un antibiótico aminoglucósido que es activo contra los bacilos aeróbicos Gram-negativos, incluyendo *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Acinetobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *K. pneumoniae*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *S. marcescens* y *Shigella* spp. (Vakulenko y Mobashery, 2003). En particular, la tobramicina es altamente activa contra *P. aeruginosa*. Las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de la tobramicina de *P. aeruginosa* sensible típicamente son inferiores a 2 µg/ml (Shawar *et al.*, 1999; Spencker *et al.*, 2002; Van Eldere, 2003). La mayoría de bacterias Gram-positivas son resistentes a la tobramicina, con la excepción de *S. aureus* y *S. epidermidis* (Vakulenko y Mobashery, 2003).

La tobramicina es rápidamente bactericida y muestra una eliminación dependiente de la concentración (Vakulenko y Mobashery, 2003). El incremento de la concentración de la tobramicina incrementa tanto la tasa como el grado de eliminación bacteriana. Por lo tanto, para alcanzar el éxito terapéutico, resulta necesario administrar una dosis suficientemente grande para producir un nivel máximo de tobramicina 5 a 10 veces superior a la MIC del organismo diana en el sitio de la infección. Resulta preferido tratar las infecciones por *P. aeruginosa* con antibióticos que muestren actividad de eliminación bactericida dependiente de la concentración (Ansorg *et al.*, 1990).

La tobramicina se administra habitualmente para tratar infecciones bacterianas Gram-negativas menos graves (Vakulenko y Mobashery, 2003). Sin embargo, puede combinarse con otras clases de antibióticos para tratar infecciones graves del tracto urinario y abdominal, así como endocarditis y bacteremia (Vakulenko y Mobashery, 2003). La administración parenteral de tobramicina en combinación con antibióticos inhibidores de la pared celular se ha utilizado para tratar infecciones respiratorias, en particular las causadas por *P. aeruginosa* en pacientes de CF (Gibson *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 2000; Ramsey *et al.*, 1999; Ramsey *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1999; Spencker *et al.*, 2003).

La tobramicina resulta poco absorbida por vía oral y debe administrarse parenteralmente (Hammett-Stabler y Johns, 1998). La tobramicina se encuentra disponible en formulaciones tanto intravenosas como de aerosol. Tras la administración parenteral, la tobramicina se encuentra distribuida principalmente dentro del líquido extracelular. La tobramicina es rápidamente excretada mediante filtración glomerular, resultando en una semivida plasmática de 1 a 2 horas (Tan *et al.*, 2003). La penetración de la tobramicina en las secreciones respiratorias es muy pobre y su actividad resulta adicionalmente reducida por la unión al esputo (Kuhn, 2001). La administración mediante aerosol de la tobramicina produce niveles en el esputo significativamente más altos, de ≥1.000 µg/ml (Geller *et al.*, 2002) en comparación con la administración parenteral, pero la unión al esputo sigue siendo un problema significativo (Hunt *et al.*, 1995; Mendelman *et al.*, 1985; Ramphal *et al.*, 1988).

La nefrotoxicidad y la ototoxicidad son reacciones negativas asociadas a la terapia de tobramicina (Al-Aloui *et al.*, 2005; Hammett-Stabler y Johns, 1998). La nefrotoxicidad resulta de la acumulación de la tobramicina dentro de lisosomas de células epiteliales que revisten los túbulos proximales. Esto provoca una alteración de la función celular y finalmente la necrosis celular (Mingeot-Leclercq y Tulkens, 1999). Clínicamente, se presenta como insuficiencia renal no oligúrica. La prevalencia de la nefrotoxicidad en pacientes de fibrosis quística se estima que es de entre 31% y 42% (Al-Aloui *et al.*, 2005). La incidencia de la ototoxicidad, que se caracteriza por la pérdida de

audición y mareos, se estima que es de hasta 25% de los pacientes tratados con aminoglucósidos (Hammett-Stabler y Johns, 1998). Al contrario que la nefrotoxicidad, la ototoxicidad es irreversible. El mayor factor de riesgo de desarrollo de toxicidad es la exposición acumulativa a dosis elevadas de tobramicina (Hammett-Stabler y Johns, 1998; Mingeot-Leclercq y Tulkens, 1999). Los pacientes de fibrosis quística se tratan con dosis elevadas prolongadas y repetidas de tobramicina durante toda su vida (Tan *et al.*, 2003) y presentan un riesgo incrementado de desarrollar insuficiencia renal acumulativa (Al-Aloui *et al.*, 2005).

La resistencia bacteriana a la tobramicina se ha convertido en crecimiento prevalente y se debe a la monoterapia de antibióticos repetida y prolongada (Conway *et al.*, 2003; Van Eldere, 2003; Mirakhur *et al.*, 2003; Pitt *et al.*, 2005; Schulin, 2002). Por ejemplo, los pacientes de fibrosis quística resultan colonizados por cepas de *P. aeruginosa* que son mayoritariamente resistentes a tobramicina, gentamicina, ceftazidima, piperacilina y ciprofloxacina (Eldere, 2003; Pitt *et al.*, 2005; Pitt *et al.*, 2003; Weiss y Lapointe, 1995). De esta manera, las terapias de antibióticos existentes se están convirtiendo en ineficaces para tratar las infecciones por *P. aeruginosa* debido a resistencias farmacológicas.

Okazaki M. *et al.*, "Effectiveness of fosfomicin combined with other antimicrobial agents against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates using time index assay", J. Infect. Chemother. Vol. 8, 2002, páginas 37-42; Tessier, F. *et al.*, "In vitro activity of fosfomicin combined with ceftazidime, imipenem, amikacin and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*", Eur. J. Clin. Microbiol. Dis. Vol. 16: 1997 páginas 159-162; Takahashi K. *et al.*, "Synergistic Activities of Combinations of Beta lactams, fosfomicin and tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa*", Antimicrobial agents and chemotherapy Vol. 26 nº 5 noviembre de 1984 (1984-11), páginas 789-791, patente WO nº 03/035030 A, patente US 2003/191051 A1; Touw, D.J. *et al.*, "Inhalation of Antibiotics of Cystic Fibrosis", European Respiratory Journal vol. 8: 1995, páginas 1594-1604; Döring G. *et al.*, "Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus", European Respiratory Journal Vol. 16, 2000 páginas 749-767.

Resulta evidente que resulta todavía necesario un método mejorado de tratamiento de infecciones respiratorias agudas y crónicas causadas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, particularmente *P. aeruginosa* resistente a múltiples fármacos. Esto resulta particularmente evidente en los pacientes de fibrosis quística en los que las terapias actuales se encuentran limitadas por problemas relacionados con el desarrollo de resistencia y toxicidad. Dicho método de tratamiento comprendería preferentemente la inhalación de una combinación antibiótica aerosolizada de fosfomicina y un aminoglucósido, tal como tobramicina, que administre una cantidad terapéuticamente efectiva de los fármacos directamente en el espacio endobronquial de las vías respiratorias o en los conductos nasales. Dicho tratamiento resultaría eficaz, reduciría la frecuencia de resistencias farmacológicas y mejoraría la seguridad.

Resultaría muy ventajoso proporcionar una formulación y sistema de administración de una dosis suficiente de fosfomicina más un aminoglucósido, tal como tobramicina en una forma concentrada, que contuviese el volumen mínimo posible de solución o de peso de polvos secos que pudiese aerosolizarse y administrarse predominantemente en el espacio endobronquial.

De esta manera, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar una formulación concentrada líquida o de polvos secos de fosfomicina más aminoglucósido que contenga cantidades suficientes pero no excesivas de fosfomicina y aminoglucósido que pueda aerosolizarse eficientemente mediante nebulización en tamaños de partículas de aerosol comprendidas predominantemente en el intervalo de entre 1 y 5 µm y que presente una salinidad que se ajusta para permitir la generación de un aerosol de fosfomicina más aminoglucósido bien tolerado por pacientes y que presente una vida de almacenamiento adecuada.

Sumario de la invención

Un aspecto de la presente exposición es un método para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio inferior (pulmonar) como la fibrosis quística, la infección pulmonar crónica por *Pseudomonas* en pacientes de fibrosis quística causadas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, que comprende la etapa que consiste en administrar una cantidad efectiva de una formulación de aerosol que comprende fosfomicina y tobramicina en el espacio endobronquial o nasal de pacientes que necesitan dicho tratamiento.

Un aspecto de la presente invención es una formulación concentrada líquida o de polvos secos que resulta adecuada para la administración de una combinación de fosfomicina-tobramicina en el espacio endobronquial o nasal de pacientes destinada al tratamiento de la fibrosis quística.

Todavía otro aspecto de la presente invención es una formulación, líquida o de polvos secos, que resulta adecuada para la administración de aminoglucósido y fosfomicina en el espacio endobronquial y nasal de pacientes, que reduce el desarrollo de resistencias a antibióticos en comparación con cualquiera de los fármacos utilizado individualmente.

Todavía otro aspecto de la presente invención es una formulación, líquida o de polvos secos, que resulta adecuada para la administración de un aminoglucósido y fosfomicina en el espacio endobronquial o nasal de pacientes, que incrementa el efecto posantibiótico (PAE) en comparación con el PAE de cualquiera de los fármacos utilizado individualmente.

5 Todavía otro aspecto de la presente invención es una formulación que comprende entre 1 y 300 mg de fosfomicina y entre 1 y 300 mg de aminoglucósido en 0,5 a 7 ml de agua con una concentración de cloro >30 mM, en la que dicha formulación presente un pH de entre 4,5 y 8,0 y se administra mediante aerosolización. El aerosol contiene partículas que presentan un diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) predominantemente de entre 1 y 5 μ y se administran utilizando un nebulizador que puede atomizar las partículas del tamaño deseado.

10 Todavía otro aspecto de la presente invención es una formulación de polvos secos que comprende entre aproximadamente 1 y aproximadamente 300 mg de fosfomicina, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 300 mg de aminoglucósido y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable en una forma de polvos secos micronizados que administra partículas con un diámetro medio de masa MMAD de entre 1 y 5 μ al aerosolizarlas.

15 La exposición se refiere a una formulación inhalable que comprende fosfomicina más un aminoglucósido adecuado para el tratamiento de infecciones bacterianas pulmonares agudas y crónicas, particularmente las causadas por la bacteria Gram-negativas *P. aeruginosa* resistente a múltiples fármacos que son resistentes al tratamiento con β -lactamos y aminoglucósidos. La formulación de aerosol presenta un volumen reducido, aunque administra una dosis terapéuticamente eficaz de fosfomicina más aminoglucósido en el sitio de la infección en cantidades suficientes para tratar las infecciones respiratorias bacterianas. Las formulaciones de aminoglucósido más fosfomicina de polvos secos y reconstituidas presentan una vida y estabilidad de almacenamiento prolongadas.

20 Las formulaciones de la presente invención preferentemente comprenden 8 partes en peso de fosfomicina y 2 partes en peso de tobramicina.

20 **Breve descripción de los dibujos**

Las figuras 1 y 2 representan las curvas de tiempo-eliminación para una combinación de fosfomicina-tobramicina 9:1 y demuestran la rápida eliminación bactericida de *P. aeruginosa* ATCC 27853 en comparación con la eliminación bacteriostática de fosfomicina y tobramicina por sí solas.

25 Las figuras 3 y 4 representan las curvas de tiempo-eliminación para combinaciones de fosfomicina:tobramicina 8:2 y demuestran la rápida eliminación bacteriana de *P. aeruginosa* ATCC nº 27853.

Las figuras 5, 6 y 7 representan las curvas de tiempo-eliminación para combinaciones de fosfomicina:tobramicina 7:3 y demuestra la rápida eliminación bactericida de *P. aeruginosa* ATCC nº 27853.

Las figuras 8 y 9 comparan las curvas de eliminación para las combinaciones de fosfomicina:tobramicina 9:1, 8:2 y 7:3 y de tobramicina sola contra *P. aeruginosa* ATCC nº 27853.

30 Las figuras 10, 11 y 12 demuestran la eliminación dependiente de la concentración de las combinaciones de fosfomicina:tobramicina 9:1, 8:2 y 7:3 contra *P. aeruginosa* ATCC nº 27853.

Las figuras 13, 14 y 15 representan la eliminación de *E. coli* en pulmón de rata tras la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de combinaciones de fosfomicina:tobramicina 9:1, 8:2 y 7:3, respectivamente.

35 Las figuras 16 y 17 demuestran que la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación de fosfomicina:tobramicina 9:1 resultó en una eliminación >5 log₁₀ de *E. coli* en pulmón de rata, en comparación con una eliminación inferior a 1 log₁₀ de fosfomicina y tobramicina solas.

La figura 18 demuestra que la administración en aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación de fosfomicina:tobramicina 8:2 resultó en una eliminación >5 log₁₀ de *E. coli* en pulmón de rata, en comparación con una eliminación de 2 log₁₀ mediante la administración de aerosol de una solución 40 mg/ml de tobramicina sola.

40 Las figuras 19 y 20 demuestran que la administración en aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación de fosfomicina:tobramicina 8:2 provocó una mayor eliminación de *P. aeruginosa* en pulmón de rata, en comparación con fosfomicina y tobramicina solas.

La figura 21 demuestra que la administración en aerosol de una solución 60 y 90 mg/ml de una combinación de fosfomicina:tobramicina 8:2 resultó en la eliminación significativa de *P. aeruginosa* en pulmón de rata.

45 Definición de términos

Tal como se utilizan en la presente memoria:

"Un cuarto de solución salina" o "1/4 NS" se refiere a solución salina normal diluida a un cuarto de su concentración, conteniendo 0,225% (p/v) de NaCl.

50 "fosfomicina:tobramicina 9:1" se refiere a una solución en agua o una formulación de polvos secos que contiene una proporción 9:1 en peso de ácido fosfomicina a base tobramicina.

"fosfomicina:tobramicina 8:2" se refiere a una solución en agua o una formulación de polvos secos que contiene una proporción 8:2 en peso de ácido fosfomicina a base tobramicina, de manera que la cantidad de fosfomicina es ocho veces la cantidad de tobramicina.

5 "fosfomicina:tobramicina 7:3" se refiere a una solución en agua o una formulación de polvos secos que contiene una proporción 7:3 en peso de ácido fosfomicina a base tobramicina, de manera que la cantidad de fosfomicina es cuatro veces la cantidad de tobramicina.

"fosfomicina:tobramicina 5:5" se refiere a una solución en agua o una formulación de polvos secos que contiene una proporción 5:5 en peso de ácido fosfomicina a base tobramicina, de manera que la cantidad de fosfomicina es cuatro veces la cantidad de tobramicina.

10 "Concentración inhibidora mínima (MIC)" se refiere a la concentración mínima de uno o más antibióticos que impide el crecimiento visible tras la incubación durante 18 a 20 horas a 35°C.

"Concentración bactericida mínima (MBC)" se refiere a la concentración mínima de antibiótico que resulta en ≥ 3 Log₁₀ de eliminación bacteriana.

15 "Eliminación dependiente del tiempo" se refiere a que concentraciones de fármaco más altas no eliminan bacterias de modo más rápido o en mayor grado.

"Eliminación dependiente de la concentración" se refiere a que a mayores concentraciones de fármaco, más alta es la tasa y grado de eliminación bacteriana.

"Bacteriostático" se refiere a que el antibiótico actúa mediante la inhibición del crecimiento bacteriano.

"Bactericida" se refiere a que el antibiótico actúa eliminando bacterias.

20 "Sinergia" se refiere a que el efecto combinado de los antibióticos que se examinan es significativamente superior al de cualquiera de los fármacos individualmente.

Descripción detallada de la forma de realización preferida

25 La presente invención se refiere a una formulación concentrada de fosfomicina más tobramicina que resulta adecuada para la administración eficaz mediante aerosolización en el espacio endobronquial o nasal. La invención resulta preferentemente adecuada para la formulación de fosfomicina más tobramicina concentradas para la aerosolización utilizando nebulizadores de chorro, ultrasónicos o equivalentes para producir partículas de aerosol de entre 1 y 5 μ , necesarias para la administración eficaz de fosfomicina más tobramicina en el espacio endobronquial o nasal para el tratamiento la fibrosis quística, particularmente la causada por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos. La formulación contiene una cantidad mínima aunque eficaz de fosfomicina más tobramicina
30 formulada en el volumen mínimo posible de solución fisiológicamente aceptable que presenta una salinidad ajustada para permitir la generación de un aerosol de fosfomicina y tobramicina bien tolerado por los pacientes, pero que minimice el desarrollo de efectos secundarios no deseables, tales como el broncoespasmo y la tos.

35 Los requisitos principales para cualquier formulación aerosolizada son su seguridad y eficacia. Son ventajas adicionales el coste más bajo, la practicidad de uso, una vida de almacenamiento larga, y el almacenamiento y manipulación del nebulizador.

40 La fosfomicina más tobramicina aerosolizada se formula para la administración eficaz de fosfomicina más tobramicina en el espacio endobronquial pulmonar o nasal. Se selecciona un nebulizador para permitir la formación de un aerosol de fosfomicina más tobramicina que presente un diámetro medio de masa media predominantemente de entre 1 y 5 μ . La cantidad formulada y administrada de fosfomicina más tobramicina resulta eficaz para el tratamiento de la fibrosis quística, particularmente la causada por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos. La formulación presenta salinidad, fuerza osmótica y pH ajustados para permitir la generación de un aerosol de fosfomicina más tobramicina que resulte bien tolerado por el paciente. La formulación presenta el volumen aerosolizable más pequeño posible capaz de administrar una dosis efectiva de fosfomicina más tobramicina
45 en el sitio de la infección. Además, la formulación aerosolizada no perjudica la funcionalidad de las vías respiratorias o conductos nasales y minimiza los efectos secundarios no deseables.

I. EVALUACIÓN DE LAS COMBINACIONES DE ANTIBIÓTICOS

50 Se formularon combinaciones de fosfomicina:aminoglucósidos tal como se describe en el Ejemplo 1. La fosfomicina era el componente principal de la combinación debido a su seguridad inherente y la necesidad de reducir la toxicidad del aminoglucósido. Las combinaciones de fosfomicina:aminoglucósido, en particular fosfomicina:tobramicina se evaluaron para (a.) potencia *in vitro*, (b.) tasas de eliminación, (c.) frecuencia de la resistencia, y (d.) eficacia en el animal.

a. Potencia *in vitro*

5 La potencia *in vitro* de fosfomicina y tobramicina solas y en combinación contra un panel de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas representativas de especies que causan infecciones del tracto respiratorio en la fibrosis quística, la bronquiectasia, la sinusitis y la neumonía asociada al ventilador, se muestra en las Tablas 1 y 2. Los datos demuestran que las combinaciones de fosfomicina:tobramicina presentan actividad antibacteriana contra un amplio espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las MIC de las combinaciones de fosfomicina:tobramicina no mejoraron respecto a fosfomicina o tobramicina solas.

Tabla 1. Valores de MIC de fosfomicina y tobramicina solas y en combinación contra bacterias Gram-negativas

Bacteria	MIC (µg/ml)				
	Fosfomicina	Tobramicina	F9:T1	F7:T3	F5:T5
<u><i>P. aeruginosa</i></u>					
COR-003	16	0,5	8	4	1
COR-009	1024	2048	1024	512	2048
COR-021	8	64	8	8	8
COR-027	128	0,5	8	2	1
<u><i>E. coli</i></u>					
COR-032	1	0,5	1	1	1
COR-039	64	0,25	2	0,5	0,5
COR-040	1	32	1	1	2
<u><i>H. influenzae</i></u>					
COR-042	8	0,5	4	2	1
COR-049	128	0,5	4	1	1
<u><i>B. cepacia</i></u>					
COR-090	≥ 2048	128	1024	ND	ND
COR-098	≥ 2048	64	1024	ND	ND
<u><i>S. maltophilia</i></u>					
COR-082	128	4	4	4	8
COR-083	64	512	256	128	128
COR-087	≥ 512	128	128	128	128
<u><i>K. pneumoniae</i></u>					
COR-042	8	0,5	4	2	1
COR-049	128	0,5	4	1	1
<u><i>M. catarrhalis</i></u>					
COR-109	4	8	4	ND	ND
COR-113	4	8	4	ND	ND
ND=No determinado					

Tabla 2. Valores de MIC de fosfomicina y tobramicina solas y en combinación contra bacterias Gram-positivas

Bacteria	MIC (µg/ml)				
	Fosfomicina	Tobramicina	F9:T1	F7:T3	F5:T5
<u><i>S. aureus</i></u>					
COR-051 (MSSA)	1	0,25	2	1	0,5
COR-055 (MRSA)	4	0,25	4	1	0,5
COR-059	2	128	2	4	4
COR-060 (GISA)	2	64	1	4	8
<u><i>S. pneumoniae</i></u>					
COR-061	32	64	16	32	32
COR-068	8	16	16	16	16
<u><i>S. pyogenes</i></u>					
COR-104	64	32	ND	ND	ND
COR-105	16	64	ND	ND	ND
<u><i>E. faecalis</i></u>					
COR-099	32	512	ND	ND	ND
COR-103	32	8	ND	ND	ND
ND = No determinado					

5 La Tabla 3 muestra los valores de MIC₅₀ y MIC₉₀ de la fosfomicina y tobramicina solas y en combinación con 100 cepas de *P. aeruginosa* aisladas procedentes de muestras de esputo pulmonar de pacientes con fibrosis quística. El presente estudio demuestra que en ausencia de mucina, la tobramicina es el antibiótico más activo. La combinación de fosfomicina y tobramicina resultó en una mejora significativa de los valores de MIC₅₀ y MIC₉₀ en comparación con fosfomicina sola. En el modelo de unión a mucina en la CF (mucina +), las combinaciones de fosfomicina:tobramicina presentaban valores de MIC₅₀ y MIC₉₀ comparables a los de la tobramicina sola.

10 Tabla 3. Valores de MIC de fosfomicina y tobramicina solas y en combinación con 100 cepas de *P. aeruginosa*

Antibiótico	MIC ₅₀ (µg/ml)		MIC ₉₀ (µg/ml)	
	Mucina (-)	Mucina (+)	Mucina (-)	Mucina (+)
Fosfomicina	64	64	≥ 512	128
Tobramicina	2	16	16	64
F9:T1	16	32	64	128
F8:T2	8	32	64	128
F7:T3	8	16	64	64

La Tabla 4 muestra los resultados de estudios de sinergia mediante el método del damero entre fosfomicina y nueve aminoglucósidos. Todas las interacciones entre las nueva combinaciones diferentes de fosfomicina:aminoglucósido se clasificaron como indiferentes. Ninguna de las combinaciones presentó actividad sinérgica contra *P. aeruginosa* ATCC nº 27853. Estos datos demuestran que no resulta evidente que pueda conseguirse una mejora de la eficacia mediante la combinación de fosfomicina y aminoglucósidos.

5

Tabla 4. Estudios mediante el método de damero de fosfomicina y diversos aminoglucósidos para *P. aeruginosa* ATCC nº 27853

Combinación de antibióticos	Interacción
Fosfomicina:Tobramicina	Indiferente
Fosfomicina:Gentamicina	Indiferente
Fosfomicina:Arbecacina	Indiferente
Fosfomicina:Dibecacina	Indiferente
Fosfomicina:Canamicina B	Indiferente
Fosfomicina:Estreptomycin	Indiferente
Fosfomicina:Amicacina	Indiferente
Fosfomicina:Neomicina	Indiferente
Fosfomicina:Netilmicina	Indiferente

10 La Tabla 5 representa los resultados de estudios de sinergia mediante el método de damero entre la fosfomicina y tobramicina frente a cepas clínicas de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *H. influenzae* y *S. aureus*. Se clasificaron las interacciones entre la fosfomicina y la tobramicina como indiferentes para la amplia mayoría de aislados examinados. La interacción en la combinación de fosfomicina y tobramicina era sinérgica frente a únicamente una cepa de *P. aeruginosa* y una cepa de *E. coli*. Estos datos sugieren además que no resultaba evidente que pudiese alcanzarse una mejora de la eficacia mediante la combinación de fosfomicina y tobramicina.

15

Tabla 5. Estudios mediante el método de damero entre fosfomicina y tobramicina para cepas de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *H. influenzae* y *S. aureus*

Cepas bacterianas	N=	Interacción entre antibióticos			
		Sinérgica	Aditiva	Indiferente	Antagónica
<i>P. aeruginosa</i>	17	1	0	16	0
<i>E. coli</i>	5	1	0	4	0
<i>H. influenzae</i>	1	0	0	1	0
<i>S. aureus</i>	4	0	0	4	0

20 La Tabla 6 representa los valores de MBC/MIC de fosfomicina y tobramicina solas y de las combinaciones de fosfomicina:tobramicina 9:1, 8:2 y 7:3 para *P. aeruginosa* ATCC nº 27853. Los antibióticos con valores de MBC/MIC ≤1 resultan preferidos debido a que inhiben las bacterias mediante su eliminación y no mediante el enlentecimiento de su crecimiento. El presente estudio inesperadamente demostró que los valores de MBC/MIC de las combinaciones de fosfomicina:tobramicina 9:1, 8:2 y 7:3 eran idénticos a la tobramicina sola. Este resultado fue inesperado, debido a que la proporción MBC/MIC de la fosfomicina sola era ≥8. El estudio también demostró que no se observaba un resultado similar con ninguna de las demás combinaciones fosfomicina:aminoglucósido.

25

Tabla 6. Valores de MBC/MIC de aminoglucósidos solos y combinaciones 9:1, 8:2 y 7:3 de fosfomicina y aminoglucósido para *P. aeruginosa* ATCC nº 27853

Combinación de antibióticos	MBC/MIC			
	Aminoglucósido	F9:T1	F8:T2	F7:T3
Fosfomicina:Tobramicina	1	1	1	1
Fosfomicina:Gentamicina	2	4	2	8
Fosfomicina:Amicacina	2	4	4	2
Fosfomicina:Netilmicina	1	2	4	2
Fosfomicina:Arbecacina	1	4	4	2
Fosfomicina:Estreptomina	4	2	2	2
Fosfomicina:Neomicina	2	2	2	4
Fosfomicina:Canamicina B	ND	4	2	4
Fosfomicina:Dibecacina	1	4	2	1

ND=No determinado

5 La Tabla 7 muestra los valores de MBC/MIC de fosfomicina y tobramicina solas y las combinaciones 9:1, 8:2 y 7:3 para *P. aeruginosa* ATCC nº 27853, *E. coli* ATCC nº 25922 y *S. aureus* ATCC nº 29213. Para *P. aeruginosa*, los valores de MBC/MIC de las combinaciones 9:1, 8:2 y 7:3 eran idénticos al de la tobramicina sola. Este resultado fue inesperado debido a que no se observó con *E. coli* ni con *S. aureus*.

Tabla 7. Valores de MBC/MIC de fosfomicina y tobramicina solas y de las combinaciones 9:1, 8:2 y 7:3 de fosfomicina y tobramicina

Antibiótico	MBC/MIC		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Fosfomicina	≥ 8	8	1
Tobramicina	1	1	8
F9:T1	1	1	2
F8:T2	1	2	4
F7:T3	1	2	4

10

b. Tasas de eliminación

15 La Tabla 8 muestra los resultados de estudios de tiempo-eliminación de las combinaciones de fosfomicina:aminoglucósido 9:1, 8:2 y 7:3 contra *P. aeruginosa* ATCC nº 27853. El examen de la eliminación bacteriana durante el tiempo reveló sinergia entre las combinaciones fosfomicina:tobramicina, fosfomicina:gentamicina y fosfomicina:arbecacina. Las combinaciones restantes de fosfomicina:aminoglucósido no eran sinérgicas. Estos datos demuestran que no resulta evidente qué combinación de fosfomicina:aminoglucósido, ni qué proporción de fosfomicina:aminoglucósido sería sinérgica.

Tabla 8. Estudios de tiempo-eliminación con las combinaciones de fosfomicina:aminoglucósido 9:1, 8:2 y 7:3 contra *P. aeruginosa* ATCC nº 27853. Se evaluaron los antibióticos a una concentración de 32 µg/ml.

20

Combinación de antibióticos	Sinergia		
	F9:T1	F8:T2	F7:T3
Fosfomicina:Tobramicina	Sí	No	No
Fosfomicina:Gentamicina	Sí	No	No
Fosfomicina:Amicacina	No	No	No
Fosfomicina:Netilmicina	No	No	No
Fosfomicina:Arbecacina	No	No	Sí
Fosfomicina:Estreptomina	No	No	No
Fosfomicina:Neomicina	No	No	No
Fosfomicina:Canamicina	No	No	No
Fosfomicina:Dibecacina	No	No	No

5 La Tabla 9 representa el tiempo para conseguir la eliminación bactericida de *P. aeruginosa* ATCC nº 27853 mediante diversas combinaciones de fosfomicina:aminoglucósido. Se evaluaron los antibióticos a una concentración de 32 µg/ml. El presente estudio demostró que las combinaciones de fosfomicina:tobramicina 9:1, 8:2 y 7:3 conseguían la eliminación bactericida más rápidamente que cualquier otra combinación de fosfomicina:aminoglucósido. Los datos también demostraron que tres de las combinaciones de fosfomicina:aminoglucósido no mostraban eliminación bactericida. Estos resultados fueron inesperados debido a que la tobramicina sola consiguió la eliminación bactericida en 1 hora, y la fosfomicina sola no era bactericida.

10 Tabla 9. Tiempo para conseguir la eliminación bactericida de *P. aeruginosa* ATCC nº 27853 con combinaciones de fosfomicina:aminoglucósido 9:1, 8:2 y 7:3

Combinación de antibióticos	Tiempo (h)		
	F9:T1	F8:T2	F7:T3
Fosfomicina:Tobramicina	2	1	1
Fosfomicina:Gentamicina	6	4	2
Fosfomicina:Amicacina	6	2	2
Fosfomicina:Netilmicina	NC	NC	NC
Fosfomicina:Arbecacina	NC	4	2
Fosfomicina:Estreptomina	NC	NC	NC
Fosfomicina:Neomicina	NC	NC	NC
Fosfomicina:Dibecacina	NC	4	4

15 Las figuras 1 y 2 representan las curvas de tiempo-eliminación para una combinación de fosfomicina:tobramicina 9:1 y demuestran la rápida eliminación bactericida de *P. aeruginosa* ATCC nº 27853 en comparación con la eliminación bacteriostática de la fosfomicina y la tobramicina solas. Esto resultó inesperado debido a que el análisis de damero no demostró la existencia de sinergia entre la fosfomicina y la tobramicina.

20 Las figuras 3 y 4 representan las curvas de tiempo-eliminación para las combinaciones de fosfomicina:tobramicina 8:2 y demuestran la rápida eliminación bactericida de *P. aeruginosa* ATCC nº 27853. A una concentración de 32 µg/ml, la actividad de eliminación de la combinación era significativamente superior a la de la fosfomicina y ligeramente superior a la de la tobramicina. A 16 µg/ml, la combinación era superior a la tobramicina y a la fosfomicina solas.

Las figuras 5, 6 y 7 representan las curvas de tiempo-eliminación para las combinaciones de fosfomicina:tobramicina

7:3 y demuestran una rápida eliminación bactericida de *P. aeruginosa* ATCC nº 27853. A concentraciones de 16 µg/ml y 32 µg/ml, la actividad de eliminación de la combinación era significativamente superior a la de la fosfomicina y ligeramente superior a la de la tobramicina sola. A 8 µg/ml, la combinación era superior a tanto tobramicina como fosfomicina solas.

5 Las figuras 8 y 9 comparan las curvas de eliminación para las combinaciones de fosfomicina:tobramicina 9:1, 8:2 y 7:3 y de tobramicina sola contra *P. aeruginosa* ATCC nº 27853. A una concentración de 32 µg/ml, todos los antibióticos presentaban tasas y grados de eliminación comparables. A 16 µg/ml, la tobramicina era el antibiótico más activo, seguido de F7:T3, F8:T2 y F9:T1.

10 Las figuras 10, 11 y 12 demuestran la eliminación dependiente de la concentración de las combinaciones de fosfomicina:tobramicina 9:1, 8:2 y 7:3 contra *P. aeruginosa* ATCC nº 27853. Esto resultó inesperado debido a que el componente principal de la combinación, la fosfomicina, muestra una eliminación dependiente del tiempo. La tobramicina sola muestra una eliminación dependiente de la concentración.

c. Frecuencia de la resistencia

15 La Tabla 10 representa la frecuencia de desarrollo de resistencias a fosfomicina y tobramicina solas, y a una combinación de fosfomicina:tobramicina 9:1 para cinco cepas de *P. aeruginosa*. El presente estudio demostró que la frecuencia de desarrollo de resistencia a la combinación de fosfomicina:tobramicina 9:1 era 1.000 a 100.000 veces inferior a la de la fosfomicina sola y 10 a 1.000 veces inferior a la de la tobramicina sola.

Tabla 10. Frecuencia de desarrollo de resistencia a la fosfomicina, tobramicina y a una combinación de fosfomicina:tobramicina 9:1

20

Cepas de <i>P. aeruginosa</i>	Frecuencia de la resistencia		
	Fosfomicina	Tobramicina	Fos + Tob
COR-002	$1,4 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^{-6}$	$< 2,9 \times 10^{-8}$
COR-003	$5,5 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-6}$	$< 1,2 \times 10^{-9}$
COR-013	$6,4 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-7}$
COR-014	$1,5 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$< 1,4 \times 10^{-9}$
ATCC 27853	$4,1 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-6}$	$< 2,5 \times 10^{-9}$

25

La Tabla 11 representa el factor de incremento de la MIC de mutantes de *P. aeruginosa* aislados tras una sola exposición a fosfomicina, tobramicina o a una combinación 9:1 de fosfomicina:tobramicina. El presente estudio demuestra que los mutantes 9:1 no presentaron ningún incremento significativo de la MIC (1 a 2 veces) en comparación con los mutantes de fosfomicina (factor de 128 a 512) o de tobramicina (factor de 2 a 16).

Tabla 11. Factor de incremento de la MIC tras una única exposición a antibiótico

Cepa de <i>P. aeruginosa</i>	Factor de incremento de MIC		
	F9:T1	Fos	Tob
COR-002	1	> 256	1
COR-003	2	> 256	2
COR-013	1	> 64	8
COR-014	1	> 512	16
ATCC 27853	2	128	1

30

La Tabla 12 representa el desarrollo de resistencias en una cepa clínica de *P. aeruginosa* tras 28 días de exposición continua a fosfomicina, tobramicina o combinación 9:1 de fosfomicina:tobramicina. La exposición a la combinación

9:1 causó un incremento de 8 veces de la MIC alcanzado el día 14, pero la MIC no excedió el punto de rotura de la resistencia a la fosfomicina, de 256 µg/ml. La exposición a la tobramicina incrementó la MIC en 128 veces, superando el punto de rotura de resistencia a la tobramicina, de 16 µg/ml. Se observó un rápido y drástico desarrollo de resistencia con exposición de *P. aeruginosa* a fosfomicina sola.

5 Tabla 12. Desarrollo de resistencia tras la exposición continua a antibiótico

Antibiótico	MIC (µg/ml)				
	0d	7d	14d	21d	28d
F9:T1	8	16	64	64	64
Tobramicina	0,5	0,5	0,5	32	64
Fosfomicina	16	> 512	> 512	>512	>512

d. Eficacia en animales

10 Las figuras 13, 14 y 15 representan la eliminación de *E. coli* en pulmón de rata tras la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una de entre las combinaciones de fosfomicina:tobramicina 9:1, 8:2 y 7:3, respectivamente. El presente estudio demostró la completa erradicación (5 a 6 Log₁₀ CFU) de la infección pulmonar por *E. coli* tras 45 a 60 minutos de tratamiento.

15 Las figuras 16 y 17 demuestran que la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación 9:1 de fosfomicina:tobramicina resultó en una eliminación >5 log₁₀ de *E. coli* en pulmón de rata, en comparación con una eliminación inferior a 1 log₁₀ con fosfomicina y tobramicina solas.

La figura 20 demuestra que la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación 8:2 de fosfomicina:tobramicina resultaba en una eliminación >5 log₁₀ de *E. coli* en pulmón de rata, en comparación con una eliminación de 2 log₁₀ con tobramicina sola. Esto resultó inesperado debido a que los datos de potencia *in vitro* no demostraron que la combinación fuese superior a la tobramicina sola.

20 Las figuras 19 y 20 demuestran que la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación 8:2 de fosfomicina:tobramicina resulta en una mayor eliminación de *P. aeruginosa* en pulmón de rata que la fosfomicina y la tobramicina solas.

La figura 21 demuestra que la administración de aerosol de una solución 60 y 90 mg/ml de una combinación 8:2 de fosfomicina:tobramicina resulta en una eliminación significativa de *P. aeruginosa* en pulmón de rata.

25 II. FORMULACIÓN EN AEROSOL DE FOSFOMICINA/TOBRAMICINA

El aminoglucósido útil en la invención es la tobramicina.

Los compuestos fosfomicina que resultan particularmente útiles en la invención son antibióticos tales como fosfomicina trometamol, fosfomicina sal disódica y fosfomicina calcio.

30 La formulación preferida de fosfomicina más tobramicina según la invención contiene 10 a 500 mg de fosfomicina más tobramicina por cada 0,5 a 7 ml de agua preferentemente con una concentración de cloruro >30 mM. Corresponde a las dosis que resultarían necesarias para impedir la colonización o para tratar infecciones graves del tracto respiratorio superior e inferior causadas por un abanico de organismos susceptibles.

35 Los pacientes pueden ser sensibles al pH, osmolaridad y contenido iónico de una solución nebulizada. Por lo tanto, estos parámetros deberían ajustarse para resultar compatibles con la fosfomicina más tobramicina y tolerables para el paciente. La solución o suspensión más preferida de fosfomicina más tobramicina contendrá una concentración de cloruro >30 mM a pH de entre 4,5 y 8,0.

40 La formulación de la invención se nebuliza predominantemente en tamaños de partícula que permiten la administración del fármaco en los bronquiolos terminales y respiratorios o en los conductos nasales, en donde residen las bacterias durante la infección y colonización. Para la administración eficaz de la fosfomicina más tobramicina en el espacio endobronquial pulmonar de las vías respiratorias en un aerosol, resulta necesaria la formación de un aerosol con un diámetro aerodinámico de masa media de predominantemente entre 1 y 5 µ. La cantidad formulada y administrada de fosfomicina más tobramicina para el tratamiento y profilaxis de la fibrosis quística, particularmente si es causada por *P. aeruginosa*, debe concentrarse efectivamente en la superficie pulmonar. La formulación debe presentar el volumen aerosolizable más pequeño posible capaz de administrar una

dosis efectiva de fosfomicina más tobramicina en el sitio de la infección. La formulación debe proporcionar además condiciones que no afecten negativamente a la funcionalidad de las vías respiratorias y de los conductos nasales. En consecuencia, la formulación debe contener suficiente cantidad del fármaco formulado bajo las condiciones que permitan su administración eficaz y evitar simultáneamente reacciones no deseables. La nueva formulación según la invención satisface la totalidad de dichos requisitos.

Según la invención, se formula fosfomicina más tobramicina en una forma de dosificación líquida destinada a la terapia mediante inhalación en pacientes que ya presentan, o que presentan el riesgo de contraer la fibrosis quística. Debido a que los pacientes se encuentran en todo el mundo ubicados, resulta imperativo que la formulación de dosificación líquida presente una vida de almacenamiento razonablemente prolongada. De esta manera, resultan importantes las condiciones de almacenamiento y empaquetamiento.

La formulación de fosfomicina más tobramicina puede prepararse asépticamente en forma de una solución acuosa en una ampolla de doble soplado-llenado, de manera que cada antibiótico se formule independientemente en agua y se ajuste el pH. La tobramicina se formula a pH ácido (1 a 6), mientras que la fosfomicina se formula a pH básico (8 a 13). La formulación de pH bajo para la tobramicina garantiza que todos sus átomos de nitrógeno básico se encuentran protonados, protegiendo así a la molécula de la oxidación y degradación de las aminas (las soluciones de tobramicina amarillean a temperatura ambiente). De esta manera, las soluciones de pH bajo de tobramicina son menos estables a temperatura ambiente durante periodos indefinidos de tiempo. La fosfomicina es más estable a pH alto, debido a que el anillo epóxido reactivo presenta la tendencia a hidrolizarse (apertura de anillo) a pH ácido o bajo. Las soluciones de pH alto de fosfomicina también son estables a temperatura ambiente. Por lo tanto, el recipiente ampolla de doble soplado-llenado permite la formulación estable separada y a temperatura ambiente de cada antibiótico a pH alto y bajo, de manera que la combinación de productos farmacológicos y el pH final se crean mediante la mezcla de ambas soluciones en el nebulizador inmediatamente antes de la utilización. La idoneidad de almacenamiento de la formulación permite el uso fiable de la fosfomicina más tobramicina formulada y adecuada para la aerosolización.

III. NEBULIZADORES PARA LA ADMINISTRACIÓN PULMONAR DE LA COMBINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Se utiliza un dispositivo para nebulizar la formulación de la invención en partículas de aerosol de un intervalo de tamaños de predominantemente 1 a 5 μ m para administrar las formulaciones de la presente invención. En la presente solicitud el término "predominantemente" se refiere a que por lo menos 70%, aunque preferentemente más de 90%, de todas las partículas de aerosol generadas se encuentra comprendida en el intervalo de 1 a 5 μ m. Entre los dispositivos típicos se incluyen nebulizadores de chorro, nebulizadores ultrasónicos, nebulizadores generadores de aerosol presurizado y nebulizadores de placa porosa vibratoria. Entre los nebulizadores adecuados representativos se incluyen el nebulizador eFlow[®] disponible de Pari Innovative Manufacturers, Midlothian, VA, el nebulizador iNeb[®] disponible de Profile Drug Delivery, West Sussex, Reino Unido; el nebulizador Omeron MicroAir[®], disponible de Omeron, Inc., Chicago, IL, y el nebulizador AeroNebGo[®], disponible de Aerogen Inc., Mountain View, CA.

Un nebulizador de chorro utiliza la presión del aire para romper una solución líquida en gotitas de aerosol. Un nebulizador ultrasónico que funciona con un cristal piezoeléctrico que rompe un líquido en gotitas de aerosol de tamaño reducido. Los sistemas presurizados en general fuerzan las soluciones a través de poros pequeños para generar partículas pequeñas. Un dispositivo de placa porosa vibratoria utiliza la vibración rápida para romper un flujo de líquido en tamaños de gota adecuados. Sin embargo, únicamente algunas formulaciones de fosfomicina más tobramicina pueden nebulizarse eficientemente, debido a que los dispositivos son sensibles a las propiedades físicas y químicas de la formulación.

La invención es una formulación de volumen reducido a alta concentración de fosfomicina más tobramicina que puede administrarse en forma de un aerosol a concentraciones eficaces del fármaco en el tracto respiratorio en personas que presentan el riesgo de sufrir infección con la fibrosis quística causada por bacterias susceptibles. La formulación es segura, bien tolerada y muy económica.

Además, la formulación proporciona una vida de almacenamiento adecuada para la distribución comercial.

Lo expuesto anteriormente se pone más claramente de manifiesto a partir de los ejemplos siguientes, proporcionados a título ilustrativo y no limitativo del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Preparación de soluciones de fosfomicina/tobramicina para la aerosolización

Solución comparativa 9:1 de fosfomicina/tobramicina. Se disolvió fosfomicina disódica (18,057 g, 13,99 g de ácido libre) en 250 ml de agua y se ajustó el pH a 7,41 mediante la adición gota a gota de 1,53 ml de HCl 4,5 N. A la solución resultante se le añadieron 1,56 g de base tobramicina al 97,5%. Se ajustó el pH de la solución a 7,60 mediante la adición de 2,45 ml de HCl 4,5 N. La solución se diluyó a 500 ml con agua y se filtró a través de un filtro de membrana Nalge Nunc 167-0020 de 0,2 μ m. El pH final era 7,76, la osmolaridad era de 537 mOsmol/kg, se calculó la proporción de fosfomicina/tobramicina para ser 9:1, y la concentración de cloro era de 35,8 mM.

5 Solución de la invención 8:2 de fosfomicina/tobramicina. Se preparó una solución de fosfomicina/tobramicina en una proporción 8:2. Se disolvieron 3,1680 g de fosfomicina disódica (2,4013 g de ácido libre) en 50 ml de agua. Se disolvieron 0,6154 g de base tobramicina al 97,5% (0,6000 g de base tobramicina pura) en la solución de fosfomicina. Se ajustó el pH mediante la adición de 0,910 ml de HCl 6 M. Se diluyó la solución a 100 ml de agua. El pH final de la solución era 7,65, la osmolaridad era de 477 mOsmol/kg, y la concentración de cloro era de 54,6 mM. Se calculó la proporción de fosfomicina/tobramicina final para que fuese 8:2.

10 Solución comparativa 7:3 de fosfomicina:tobramicina. Utilizando el procedimiento descrito para la solución 9:1 anteriormente, se preparó una solución de fosfomicina/tobramicina en una proporción 7:3; se disolvieron 17,466 g de fosfomicina disódica (13,239 g de ácido libre) en agua; el pH se ajustó a 7,43 mediante la adición de 1,46 ml de HCl 4,5 N, 5,819 g de base tobramicina al 97,5% (5,674 g de base tobramicina pura) y se ajustó el pH de la solución combinada mediante la adición de 9,20 ml de HCl 4,5 N. El pH final de la solución era 7,68, la osmolaridad era de 560 mOsmol/kg, la proporción de fosfomicina/tobramicina era de 7:3 y la concentración de cloro era de 95,9 mM.

Ejemplo 2

Preparación de una solución hiperosmolar 8:2 de fosfomicina y tobramicina

15 Se disolvieron 7,9165 g de fosfomicina disódica (6,0007 g de fosfomicina ácido libre) y 1,5382 g de base tobramicina al 97,5% (1,4997 g de base tobramicina pura) en 50 ml de agua. Se ajustó el pH a 7,62 mediante la adición de 2,3 ml de HCl 6 M. Se diluyó la solución combinada hasta 100 ml. El pH final era de 7,64, la osmolaridad era de 1.215 mOsmol/kg, la concentración de cloro final era de 138 mM y la proporción de fosfomicina/tobramicina era de 8:2.

20 Ejemplo 3 comparativo

Preparación de soluciones individuales de fosfomicina de pH elevado y de tobramicina de pH bajo para la reconstitución

25 Se preparó una solución de fosfomicina mediante la disolución de 5,891 g de fosfomicina disódica (4,465 g de fosfomicina ácido libre) en agua y diluyendo hasta 100 ml. El pH era de 9,42, y la osmolaridad era de 795 mOsmol/kg.

Se preparó una solución de tobramicina mediante la disolución de 1,869 g de base tobramicina al 97,5% (1,822 g de base tobramicina pura) en 60 ml de agua, ajustando el pH a 4,90 mediante la adición de 18,8 ml de HCl 1 M, y diluyendo hasta 100 ml con agua. El pH era de 4,89 y la osmolaridad era de 148 mOsmol/kg.

30 Se agruparon 1 ml de la solución de fosfomicina y 1 ml de la solución de tobramicina. Para la solución de producto farmacológico combinado el pH era de 7,30, la osmolaridad era de 477 mOsmol/kg y la concentración de cloro era de 94,0 mM, y la proporción de fosfomicina/tobramicina, de 7:3.

Ejemplo 4

Preparación de una solución 8:2 de fosfomicina:tobramicina a partir de tobramicina comercial para solución de inhalación (TOBI) y fosfomicina disódica liofilizada (seca) (FOSFO)

35 Se disolvieron 3,1665 g de fosfomicina disódica (FOSFO, 2,4002 g de fosfomicina ácido libre) en dos ampollas de 5 ml (60 mg/ml) de solución de tobramicina para inhalación (TOBI, 600 mg de base tobramicina) más 40 ml de agua. El pH inicial de solución era 7,50. A la solución se le añadieron 667 µl de NaCl 4,5 M. Se diluyó la solución combinada hasta 100 ml con agua. La formulación final presentaba las propiedades siguientes: pH 7,49, osmolaridad: 502 mOsmol/kg, concentración de cloro: 33,8 mM, y la proporción de fosfomicina/tobramicina era de 8:2, y la concentración de fármaco era de 24 mg/ml de fosfomicina y 6 mg/ml de tobramicina.

Los Ejemplos 5 a 10 proporcionan los procedimientos que han sido utilizados para generar los datos presentados en las tablas y figuras de la presente solicitud.

Ejemplo 5

Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC)

45 Se evaluó en ensayos de MIC la eficacia de los antibióticos y de las combinaciones de antibióticos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas representativas de especies que causan infecciones respiratorias en pacientes con fibrosis quística, bronquiectasia, sinusitis y neumonía asociada al respirador. Se aislaron cepas de *P. aeruginosa* a partir de muestras de esputo pulmonar recogido de pacientes con fibrosis quística, cultivos de sangre, infecciones de tracto respiratorio e infecciones de la piel o de tejido blanco. Se aislaron *E. coli*, *H. influenzae*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*, *K. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *E. faecalis* a partir de infecciones del tracto respiratorio. Se utilizaron *E. coli* ATCC nº 25922, *P. aeruginosa* ATCC nº 27853 y *S. aureus* ATCC nº 29213 como cepas de control de calidad.

Método A: las MIC de fosfomicina sola, tobramicina sola, o combinaciones de fosfomicina más tobramicina se determinaron mediante el método de dilución de placa de agar siguiendo las directrices de la NCCLS (NCCLS, 2003). Se sembraron por estrías cepas bacterianas en placas de agar de soja triptica (PML Microbiologicals, Wilsonville, Or.) que contenía 5% de sangre desfibrinada de oveja (en adelante denominadas placas de agar-sangre) y se incubaron durante la noche a 35°C. Se inocularon dos a tres colonias bacterianas de los cultivos de durante la noche en 3 ml de solución salina normal estéril, se agitaron con vórtice brevemente y se ajustaron a un estándar de 0,5 McFarland (NCCLS, 2003). Se diluyó la suspensión bacteriana 1:40 en solución salina normal estéril y se utilizó como inóculo. Se prepararon placas de agar Mueller-Hinton en adelante denominadas MHA) mediante la combinación de 16 g de agarosa (Becton-Dickinson, Sparks, MD), 22 g de polvos de caldo de Mueller-Hinton (Becton-Dickinson, Sparks, MD) y se ajustó a 1 l de agua destilada. Se esterilizó el agar mediante autoclavado, se enfrió a 55°C, y se suplementó con 25 µg/ml de glucosa-6-fosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.). Se dividieron en alícuotas veinticinco ml de agar frío en tubos cónicos de 50 ml y se suplementaron con concentraciones apropiadas de antibiótico para conseguir concentraciones comprendidas entre 0,06 µg/ml y 512 µg/ml. Tras mezclar suavemente el agar y el antibiótico, la suspensión se vertió en placas de Petri estériles de 100 mm y se dejó que se solidificase a temperatura ambiente. Se inocularon las placas de agar antibiótico con aproximadamente 2×10^4 CFU/punto con un inoculador de 48 puntos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.). Se define la MIC como la concentración mínima de uno o más antibióticos que impide el crecimiento visible tras la incubación durante 18 a 20 horas a 35°C. Se determinó la eficacia de un antibiótico o combinación de antibióticos particular sobre poblaciones grandes de *P. aeruginosa* mediante el cálculo de los valores de MIC₅₀ y MIC₉₀. El valor de MIC₅₀ se define como la concentración de uno o más antibióticos que inhibe el 50% de las cepas de *P. aeruginosa*. El valor de MIC₉₀ se define como la concentración de uno o más antibióticos que inhibe el 90% de las cepas de *P. aeruginosa* (Wiedemann y Grimm, 1996).

Método B: las MIC de fosfomicina sola, tobramicina sola, o combinaciones de fosfomicina más tobramicina se determinaron para las cepas de *P. aeruginosa* en presencia de mucina gástrica porcina para evaluar el efecto de la mucina y de la unión de proteínas sobre la actividad antibiótica. Las metodologías eran idénticas a las descritas en el Ejemplo 5, Método A, con la excepción de que se añadió 2% (peso/volumen) de mucina gástrica porcina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) en lugar de MHA antes del autoclavado.

Método C: se determinaron las MIC de amicacina, arbecacina, dibecacina, gentamicina, canamicina, netilimicina, neomicina, estreptomocina y tobramicina solas para *P. aeruginosa* ATCC nº 27853 mediante el método de la microdilución en caldo según los estándares de la NCCLS (NCCLS, 2003). Se utilizó *E. coli* ATCC nº 25922 y *S. aureus* ATCC nº 29213 como cepas de control de calidad. Se sembraron por estría las cepas bacterianas en placas de agar-sangre y se incubaron a 35°C durante 18 horas. Se inocularon dos a tres colonias bacterianas de los cultivos de durante la noche en 3 ml de solución salina normal estéril, se agitaron con vórtice brevemente y se ajustaron a un estándar de 0,5 McFarland (NCCLS, 2003). La suspensión bacteriana se diluyó 1:100 en caldo de Mueller-Hinton de cationes ajustados (en adelante denominado CAMBH). Se pipetearon cincuenta microlitros de inóculo bacteriano (aproximadamente 2×10^5 CFU/ml) en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos que contenía 50 µl de CAMHB (Remel, Lenexa, Kansas) suplementado con diluciones de 2 veces de los antibióticos con concentraciones comprendidas entre 0,125 µg/ml y 128 µg/ml. Se define la MIC como la concentración mínima de uno o más antibióticos que impide el crecimiento visible tras la incubación a 35°C durante 18 a 24 horas.

Ejemplo 6

40 Sinergia en damero

Se determinaron las interacciones potenciales entre fosfomicina y amicacina, arbecacina, dibecacina, gentamicina, canamicina B, neomicina, netilimicina, estreptomocina o tobramicina mediante el método del damero (Eliopoulos y Moellering, 1996). Se evaluaron diluciones en serie de dos veces de fosfomicina y aminoglucósidos, circundantes del valor esperado de MIC para ambos compuestos. Se sembraron por estría cepas bacterianas en placas de agar-sangre y se incubaron a 35°C durante 18 a 24 horas. Se inocularon dos a tres colonias bacterianas de los cultivos de durante la noche en 3 ml de solución salina normal estéril, se agitaron con vórtice brevemente y se ajustaron a un estándar de 0,5 McFarland (NCCLS, 2003). Se pipetearon cincuenta microlitros de inóculo bacteriano (aproximadamente 2×10^5 CFU/ml) en pocillos individuales de placas de 96 pocillos que contenían 50 µl de CAMHB suplementado con diluciones de 2 veces de los dos antibióticos de interés. Se calculó la concentración inhibidora fraccional (FIC) como la MIC del compuesto nº 1 en combinación con un segundo compuesto, dividido por la MIC del compuesto nº 1 solo. Se calculó una suma de la FIC (SFIC) para cada combinación de fármacos como la suma de las FIC individuales de los compuestos nº 1 y nº 2. Se calculó la FIC como la concentración mínima de antibióticos que impedía el crecimiento visible tras la incubación durante 18 a 20 horas a 35°C. Se definió la sinergia como una SFIC ≤0,5, la indiferencia como una SFIC >0,5 y <4, y el antagonismo como una SFIC >4. Se utilizó la SFIC más baja para la interpretación final de las interacciones entre fármacos.

Ejemplo 7

Determinación de la cinética de tiempo-eliminación

Se llevaron a cabo experimentos de tiempo-eliminación en presencia de 2% de mucina gástrica porcina con el fin de evaluar el efecto de la mucina y la unión de proteínas sobre la actividad antibiótica. Se inocularon dos a tres colonias

bacterianas en 10 ml de CAMHB y se incubaron a 35°C en un baño de agua bajo agitación (250 rpm) durante 18 a 24 horas. Se preparó una dilución 1:40 del cultivo de durante la noche en 10 ml de CAMHB fresco y se incubó a 35°C en un baño de agua bajo agitación (250 rpm) durante 1 a 2 horas. Se ajustó el cultivo resultante a un estándar de 0,5 McFarland (NCCLS, 2003). Para reducir la variabilidad en el tamaño del inóculo bacteriano al comparar múltiples antibióticos, se inoculó un tubo maestro de CAMHB que contenía 2% (peso/volumen) de mucina gástrica porcina con una dilución 1:200 de inóculo bacteriano (aproximadamente 5×10^5 CFU/ml) suplementado con 25 µg/ml de glucosa-6-fosfato, y se agitó con vórtice brevemente. A continuación, se pipetearon alícuotas de diez mililitros en tubos cónicos de 50 ml. Se añadieron fosfomicina sola, tobramicina sola, y combinaciones de fosfomicina más amicacina, arbecacina, dibicacina, gentamicina, canamicina, netilimicina, neomicina, estreptomycin o tobramicina al medio de cultivo a concentraciones iguales a 1, 2, 4 y 8 veces la MIC de la fosfomicina (4 µg/ml) para *P. aeruginosa* ATCC nº 27853. También se comparó la actividad de eliminación de fosfomicina más amicacina, arbecacina, dibicacina, gentamicina, canamicina, netilimicina, neomicina, estreptomycin o tobramicina con la actividad de eliminación de sus componentes individuales solos. Por ejemplo, se compararon 32 µg/ml de una combinación 9:1 de fosfomicina:tobramicina con la actividad de eliminación de 28,8 µg/ml de fosfomicina sola y 3,2 µg/ml de tobramicina sola. Se realizó un control sin fármaco en cada experimento. Los cultivos se incubaron con antibiótico a 35°C en un baño de agua bajo agitación (250 rpm) durante 24 horas. Se determinó la eliminación bacteriana a las 0, 1, 2, 4, 6 y 24 horas preparando diluciones en serie de 10 veces de los cultivos en solución salina normal estéril y extendiendo alícuotas de 100 µl sobre placas de agar-sangre. Se incubaron las placas de cultivo a 35°C durante 18 a 24 horas y se realizó un recuento manual del número de colonias. El límite de detección para el método de recuento de colonias era de 1 Log₁₀. Se construyeron curvas de tiempo-eliminación dibujando el Log₁₀ del número de CFU/ml del cultivo frente al tiempo. Se consideró que las concentraciones de antibiótico que reducían el inóculo original en ≥ 3 Log₁₀ CFU/ml eran bactericidas, y que las concentraciones que reducían el inóculo original en ≤ 2 Log₁₀ CFU/ml, como bacteriostáticas (NCCLS, 1999). Se definió sinergia como una reducción del recuento de colonias bacterianas de ≥ 2 Log₁₀ CFU/ml al utilizar las combinaciones de antibióticos en comparación con la utilización de los antibióticos individuales más activos (NCCLS, 1999).

Ejemplo 8

Determinación de la concentración bactericida mínima (MBC)

Se determinaron las MBC de fosfomicina, amicacina, arbecacina, dibicacina, gentamicina, canamicina B, netilimicina, neomicina, estreptomycin y tobramicina solas para *P. aeruginosa* ATCC nº 27853, *E. coli* ATCC nº 25922 y *S. aureus* ATCC nº 29213 mediante el método de la microdilución en caldo siguiendo los estándares de la NCCLS (NCCLS, 1999). Se sembraron por estría cepas bacterianas en placas de agar-sangre y se incubaron a 35°C durante 18 a 24 horas. Se inocularon dos a tres colonias bacterianas de los cultivos de durante la noche en 3 ml de solución salina normal estéril, se agitaron con vórtice brevemente, y se ajustaron a un estándar de 0,5 McFarland (NCCLS, 2003). Se pipetearon cincuenta microlitros de inóculo bacteriano (aproximadamente 2×10^5 CFU/ml) en pocillos individuales de placas de 96 pocillos que contenían 50 µl de CAMHB (Remel, Lenexa, Kansas) suplementados con diluciones de 2 veces de antibióticos de concentración comprendida entre 0,125 µg/ml y 128 µg/ml. Se incubaron las placas a 35°C durante 18 a 24 horas y se determinó la MIC tal como se describe en el Ejemplo 5, Método C. Se mezcló el contenido de pocillos que no mostraban crecimiento (MIC y superior) con un pipeteador y se extendieron muestras por duplicado de 10 µl en placas de agar-sangre. Se incubaron las placas de cultivo a 35°C durante 18 a 24 horas y se realizó un recuento manual del número de colonias bacterianas en cada placa. Se determinaron los valores de rechazo mediante los métodos de NCCLS, que consideran el tamaño final del inóculo, la opción de muestreo único o doble, el error de pipeteado y la distribución de Poisson de las respuestas muestrales (NCCLS, 1999). Por ejemplo, con un inóculo final de 5×10^5 CFU/ml y la evaluación de muestras por duplicado, se consideró que la dilución más baja que presentase menos de un total de 25 colonias era la MBC. Se definió la MBC como una reducción ≥ 3 Log₁₀ de CFU/ml del inóculo original tal como indican los estándares de la NCCLS (NCCLS, 1999). Se calcularon las proporciones MBC/MIC dividiendo la MBC por la MIC.

Ejemplo 9

Determinación de la frecuencia de resistencia en una etapa

Se determinó la frecuencia de la mutación de resistencia espontánea en una etapa para 5 cepas susceptibles de *P. aeruginosa*. Se preparó el inóculo bacteriano mediante la inoculación de 5 ml de CAMHB con 2 a 3 colonias bacterianas e incubando a 35°C en un baño de agua bajo agitación (250 rpm) durante 18 horas. Se preparó una dilución 1:20 del cultivo de durante la noche en 50 ml de CAMHB fresco en un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se incubó a 35°C en un baño de agua bajo agitación (250 rpm) durante 8 horas. Se centrifugaron los cultivos a 2.500 rpm, temperatura ambiente, durante 20 minutos. Se separó mediante decantación el sobrenadante y el sedimento celular de los 50 ml de cultivo se resuspendió en 500 µl a 1.000 µl de CAMHB. Se determinó la CFU/ml en la suspensión bacteriana preparando diluciones en serie de 10 veces en solución salina normal estéril, y extendiendo alícuotas de 100 µl en placas de agar-sangre. Se incubaron las placas de cultivo a 35°C durante 18 a 24 horas y se realizó un recuento manual del número de colonias. Se extendieron cien microlitros de suspensión de células bacterianas (aproximadamente 10^9 CFU) en placas de MHA que contenían 128 µg/ml de fosfomicina, 8 µg/ml de tobramicina o 128 µg/ml de fosfomicina más 8 µg/ml de tobramicina. Las placas de cultivo se incubaron a 35°C durante 48 a 72 horas y se realizó un recuento manual del número de colonias en cada placa. Se calculó la

frecuencia de resistencia dividiendo el número de bacterias que crecían a la concentración definida de antibiótico por el número de bacterias en el inóculo original. Se evaluaron los mutantes representativos para cambios de la MIC frente a fosfomicina sola, tobramicina sola, y combinaciones de fosfomicina más tobramicina, tal como se describe en el Ejemplo 5, Método A.

5 Ejemplo 10

Análisis de resistencia multietapa

Se evaluó el desarrollo de la resistencia durante el pase en serie continuo con una cepa clínica de *P. aeruginosa* sensible a la fosfomicina (MIC=8 µg/ml) y a la tobramicina (MIC=0,5 µg/ml). Se inoculó una única colonia de *P. aeruginosa* COR-014 en 5 ml de MHCAB y se agitó con vórtice brevemente. Se prepararon diluciones en serie de dos veces de fosfomicina sola que comprendía el intervalo de 1 µg/ml a 512 µg/ml, de tobramicina sola que comprendía el intervalo de 0,0625 µg/ml a 512 µg/ml y una combinación 9:1 de fosfomicina:tobramicina que comprendía el intervalo de 0,0625 µg/ml a 512 µg/ml en CAMHB. Se pipetearon diez microlitros de suspensión bacteriana en 3 ml de cada dilución de antibiótico y se incubaron estáticamente a 35°C durante 18 a 24 horas. Se seleccionaron los tubos con la concentración máxima de antibiótico que presentaban crecimiento bacteriano visible de cada serie de dilución de antibiótico y se pipetearon 100 µl del cultivo en una serie fresca de dilución de antibiótico. Los tubos se incubaron estáticamente a 35°C durante 18 a 24 horas. Se repitió este procedimiento un total de 28 veces. Se determinaron las MIC de fosfomicina sola, tobramicina sola y fosfomicina más tobramicina para la cepa parental y aislados resistentes recogidos tras cada pase tal como se indica en el Ejemplo 5, Método C.

Ejemplo 11

20 Determinación de la eficacia animal

Se evaluó la eficacia *in vivo* de aerosalizaciones de fosfomicina sola, tobramicina sola y combinaciones de fosfomicina y tobramicina frente a *E. coli* ATCC nº 25922 y *P. aeruginosa* ATCC nº 27853 en pulmones de rata. El inóculo bacteriano utilizado para establecer las infecciones de pulmón de rata estaba constituido por una mezcla de bacterias y perlas de agarosa. Se sembraron por estría *E. coli* ATCC nº 25922 ó *P. aeruginosa* ATCC nº 27853 en placas de agar-sangre y se incubaron durante 18 a 24 horas a 35°C. Se inocularon dos a tres colonias en 10 ml de caldo de soja tríptica (en adelante denominado TSB) y se incubaron estáticamente a 35°C durante 1,5 a 2 horas. Se ajustó el cultivo a una densidad óptica de 0,1 (625 nm) en TSB fresco y se diluyó a continuación 1:5 en TSB. Se añadió un mililitro de suspensión bacteriana (aproximadamente 10⁷ CFU/ml) a 10 ml de una solución de agar noble al 2% y se mezcló brevemente mediante inversión. Se añadió la mezcla a 150 ml de aceite mineral blanco pesado equilibrado a 55°C y se agitó sobre hielo durante 5 minutos. La suspensión fría se vertió en un tubo de centrifuga de 250 ml y se centrifugó a 3.000 rpm, 4°C, durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante mediante decantación, se resuspendió el sedimento en 25 ml de solución salina estéril normal y se transfirió a un tubo de centrifuga cónico de 50 ml. Tras la centrifugación a 3.000 rpm, 4°C, durante 10 minutos, se separó el sobrenadante mediante decantación y se resuspendió el sedimento en 10 ml de solución salina. La suspensión se centrifugó a 3.000 rpm, 4°C, durante 10 minutos y se separó el sobrenadante mediante decantación. Se resuspendió el sedimento en aproximadamente 10 ml de solución salina normal estéril y después se diluyó 1:30 en una solución estéril de perlas de agarosa al 2%, proporcionando aproximadamente 10 a 1.000 CFU/ml.

Previamente a la instalación intratraqueal del inóculo bacteriano, se anestesiaron ratas Sprague-Dawley macho (200 a 250 g) mediante exposición a isoflurano durante 5 minutos. Se insertó una aguja intratraqueal en la tráquea y se instilaron en los pulmones con una jeringa de 1 ml, 80 µl de perlas de agarosa que contenía aproximadamente 10 a 100 CFU de *E. coli* ATCC nº 25922 ó *P. aeruginosa* nº 27853. Se introdujeron las ratas en jaulas individuales y se dejó que se recuperasen durante aproximadamente 18 horas.

Se administró fosfomicina sola, tobramicina sola y combinaciones de fosfomicina:tobramicina en ratas utilizando un dispositivo de exposición a aerosol (In Tox Products, New Mexico). El sistema estaba constituido por una cámara central que presentaba rutas separadas de suministro de aerosol y de salida. La cámara central presentaba 24 entradas que se encontraban directamente conectadas al sistema de suministro de aerosol. Se introdujeron las ratas en tubos individuales de exposición a aerosol y se fijaron con una placa de empuje ajustable y conjunto de tapa terminal de manera que no pudiesen girar o alejarse del extremo del tubo. Los tubos de restricción que contenían las ratas se cargaron en las entradas de la cámara central y se ajustó el flujo de aire a 1 litro/minuto. Se mantuvo constante el flujo de aire (aire de calidad respirable) al nebulizador PARI LC Star a 6,9 litros por minuto. Se nebulizó fosfomicina sola, tobramicina sola o combinaciones 9:1, 8:2 ó 7:3 de fosfomicina:tobramicina a un caudal de 0,2 ml/minuto y se administraron en las ratas mediante la ruta de suministro de aerosol. Se administró aire adicional (en adelante denominado aire de dilución) en el nebulizador para equilibrar la sobrepresión de aire utilizado para administrar fármacos aerosolizados en las ratas. Se expusieron los roedores a los antibióticos aerosolizados durante un máximo de 2 horas, dos veces diarias durante 3 días consecutivos. Cada grupo de tratamiento estaba constituido por 5 a 8 animales en cada grupo. Se incluyó un control de no tratamiento en cada experimento.

Se evaluó la eliminación bacteriana 18 horas después de la última exposición. Las ratas se anestesiaron con isoflurano y se eutanizaron mediante la administración intraperitoneal de 500 µl de fenobarbital. Se extirparon los

pulmones asépticamente, se eliminó el exceso de tejido y se determinó el peso de cada pulmón. Se introdujeron los pulmones en viales de vidrio de 10 ml, y se añadieron 3 ml de solución salina estéril normal por gramo de tejido. Se homogeneizaron las muestras con un homogeneizador manual durante 30 segundos. Se determinó la eliminación bacteriana preparando diluciones en serie de 10 veces del homogenado de pulmón en solución salina estéril normal, y extendiendo alícuotas de 100 µl en placas de agar-sangre. Se incubaron las placas de cultivo a 35°C durante 18 a 24 horas y se realizó un recuento manual del número de colonias bacterianas. Se determinó la eficacia antibiótica mediante la comparación de las CFU/pulmón del grupo de control de no tratamiento con los grupos de tratamiento.

Referencias

- Al-Aloui, M., H. Miller, S. Alapati, P.A. Stockton, M.J. Ledson, y M.J. Walshaw. 2005. Renal impairment in cystic fibrosis patients due to repeated intravenous aminoglycoside use. *Ped. Pulmon.* 39:15-20.
- Ansorg, R., K.-D. Muller, y W. Wiora. 1990. Comparison of inhibitory and bactericidal activity of antipseudomonal antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Chemother.* 36:222-229.
- Arca, P., G. Reguera, y C. Hardisson. 1997. Plasmid-encoded fosfomicin resistance in bacteria isolated from the urinary tract in a multicentre survey. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:393-399.
- Bacardi, R., J. Tornos, I. Moga, N. Marti, P. Alomar, L. Gaztelurrutia, y C. Villalonga. 1977. Treatment of respiratory infections with fosfomicin. *Chemother.* 23 (Supl. 1):343-347.
- Bonora, V., C. Lozano, M. Santos, M. Paz, J. Bagueña, y M. Gobernado. 1977. Fosfomicin in treatment of respiratory bacterial infections. *Chemother* 23 (Supl.1):337-341.
- Conway, S.P. 2005. Nebulized antibiotic therapy: the evidence. *Chronic Respir. Dis.* 2:35-41.
- Conway, SP., KG Brownlee, M Denton, y DG Peckham. 2003. Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am J Respir Med* 2(4):321-332.
- Craig, W.A. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* 26 (1):1-12.
- Forsgren, A. y M. Walder. 1983. Antimicrobial activity of fosfomicin in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 11(5): 467-471.
- Flume, P. y M.E. Klepser. 2002. The rationale for aerosolized antibiotics. *Pharmacotherapy* 22(3 Pt 2):71 S-79S.
- Geller, D.E., W.H. Pitlick, P.A. Nardella, W.G. Tracewell, y B.W. Ramsey. 2002. Pharmacokinetics and bioavailability of aerosolized tobramycin in cystic fibrosis. *Chest.* 122:219-226.
- Gibson, RL., JL Bums, y BW Ramsey. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 168(8):918-951.
- Greenwood, D., J. Brown, y R. Edwards. 1992. The influence of anaerobiosis on the activity fosfomicin tromtamol. *Infection.* 20(4):S305-S309.
- Grif, K., M.P. Dierich, K.Pfaller, P.A. Miglioli, y F. Allerberger. 2001. In vitro activity of fosfomicin in combination with various antistaphylococcal substances. *J Antimicrob Chemother* 48:209-217.
- Grimm, H. 1979. In vitro investigations with fosfomicin on Mueller-hinton agar with and without glucose-6-phosphate. *Infect.* 7(4):256-259.
- Hammett-Stabler, C.A. y T. Johns. 1998. Laboratory guidelines for monitoring of antimicrobial drugs. *Clin. Chem.* 44(5): 1129-1140.
- Honorato, J., R. R.P. Ortola, R. Masso, yJ.M. Reparaz. 1977. fosfomicin in acute bronchopneumonopathies. *Chemother* 23 (Supl. 1):331-336.
- Hunt, B.E., A. Weber, A. Berger, B. Ramsey, y A.L. Smith. 1995. Macromolecular mechanisms of sputum inhibition of tobramycin activity. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39(1):34-39.
- Kahan, F.M., J.S.Kahan, P.J. Cassidy, y H. Kropp. 1974. The mechanism of action of fosfomicin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci* 253:364-386.
- Katznelson, D., Y. Yahev, y E. 1984. Rubinstein. Fosfomicin in the treatment of cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol* 3(3):213.
- Kamijyo, A., Z. Matsuzaki, K. Kikushima, J. Ogino, I. Nozawa, T. Matsuoka, S. Endo, y Y. Okamoto. 2001. Fosfomicin nebulizer therapy to chronic sinusitis. *Auris. Nasus. Larynx.* 28(3):227-232.

- Kondo, H., K. Suzuki, I. Takagi, N. Miyamoto, S. Baba, T. Kobayashi, A. Yokota, I. Tanaka, y K. Sugiyama. 1996. Transitional concentration of antibacterial agent to the maxillary sinus via a nebulizer. *Acta Otolaryngol (Stockh) Supl* 525:64-67.
- Mirakhor, A., M.J. Gallagher, M.J. Ledson, C.A. Hart, y M.J. Walshaw. 2003. Fosfomicin therapy for multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Cystic Fibrosis* 2:19-24.
- 5 Kuhn, R.J. 2001. Formulation of aerosolized therapeutics. *Chest*. 120:94S-98S.
- Lang, B.J., S.D. Aaron, W. Ferris, P.C. Herbert, y N.E. MacDonald. 2000. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 162:2241-2245.
- Marchese, A., L. Gualco, E.A. Debbia, G.C. Schito, y A.M. Schito. 2003. In vitro activity of fosfomicin against gram-negative urinary pathogens and the biological cost of fosfomicin resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 22(2): 53-59.
- 10 Mendelman, P.M., A.L. Smith, J. Levy, A. Weber, B. Ramsey, y R.L. Davis. 1985. Aminoglycoside penetration, inactivation, and efficacy in cystic fibrosis sputum. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132(4):761-765.
- Menendez, A., A. Tutor, y A.S. Sousa. 1977. Treatment of respiratory infections with fosfomicin. *Chemother* 23 (Supl. 1):348-357.
- 15 Mingeot-Leclercq, M-P. y P.M. Tulkens. 1999. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43(5):1003-1012.
- Mirakhor, A., M.J. Gallagher, M.J. Ledson, C.A. Hart, y M.J. Walshaw. 2003. Fosfomicin therapy for multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J. Cyst fibros.* 2(1):19-24.
- 20 Moreno, S., C. Ezpeleta, F. Parras, C. Barros, J. Martinez Beltran, y L. Buzon. 1986. Cure of a case of *Haemophilus aphrophilus* endocarditis with a combination of fosfomicin and gentamicin. *J. Antimicrob. Chemother.* 18(6): 771-772.
- Mueller, M., A. de la Pena, y H. Derendorf. 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of antiinfective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48(2):369-377.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grows aerobically; approved standard. M7-A6, Vol. 23 n°2. National Committee for clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- 25 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. M26-A, Vol. 19 n° 18. National Committee for clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Nilsson, A.I., O.G. Berg, O. Aspevall, G. Kahlmeter, y D.I. Andersson. 2003. Biological costs and mechanisms of fosfomicin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47(9):2850-2858.
- 30 O'Riordan, T.G. 2000. Inhaled antimicrobial therapy: from cystic fibrosis to the flu. *Respir. Care.* 45(7):836-845.
- Perri, M.B., E. Hershberger, M. Ionescu, C. Lauter, y M.J. Zervos. 2002. In vitro susceptibility of vancomycinresistant enterococci (VRE) to fosfomicin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 42:269-271.
- Pitt, TL., M Sparrow, M Warner, y M Stefanidou. 2005. Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax* 58(9):794-796.
- 35 Ramphal, R., M. Lhermitte, M. Filliat, y P. Roussel. 1988. The binding of antipseudomonal antibiotics to macromolecules from cystic fibrosis sputum. *J. Antimicrob. Chemother.* 22:483-490.
- Ramsey, BW., MS Pepe, JM Quan, KL Otto, AB Montgomery, J Williams-Warren, KM Vasiljev, D Borowitz, CM Bowman, BC Marshall, S Marshall, y AL Smith. 1999. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic fibrosis inhaled tobramycin study group. *N Engl J Med* 340(1):23-30.
- 40 Ramsey BW. 1996. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 335(3):179-188.
- Ramsey, BW., HL Dorkin, JD Eisenberg, RL Gibson, IR Harwood, RM Kravitz, DV Schidlow, RW Wilmott, SJ Astley, MA McBuurnie 1993. Efficacy of aerosolized tobramycin in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 328(24): 1740-1746.
- 45 Reeves, D.S. 1994. Fosfomicin trometamol. *J Antimicrob Chemother* 34:853-858.
- Schulin, T. 2002. In vitro activity of the aerosolized agents colistin and tobramycin and five intravenous agents against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in southwestern Germany. *J Antimicrob Chemother* 49:403-406.

- Shawar, R.M., DL MacLeod, RL Garber, JL Bums, JR Stapp, CR Clausen, y SK Tanaka. 1999. Activities of tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(12):2877-2880.
- 5 Smith, A.L., C. Doersbuk, D. Goldman, E. Gore, B. Hilman, M. Marks, R. Moss, B. Ramsey, G. Redding, T. Rubio, J. Williams-Warren, R. Wilmott, H. D. Wilson, y R. Yogev. 1999. Comparison of a β -lactam alone versus β -lactam and an aminoglycoside for pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 134:413-421.
- Spencer, F.B., L. Staber, T. Lietz, R. Schille, y A.C. Rodloff. 2002. Development of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* obtained from patients with cystic fibrosis at different times. *Clin. Microbiol. Infect.* 9:370-379.
- 10 Tan, K.V., M. Mulheran, A.J. Knox, y A.R. Smyth. 2003. Aminoglycoside prescribing and surveillance in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care med.* 167(6):819-823.
- Van Eldere, J. 2003. Multicenter surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:347-352.
- Vakulenko, S.B. y S. Mobashery. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(3):430-450.
- 15 Weiss, K., y J.R. Lapointe. 1995. Routine susceptibility testing of four antibiotic combinations for improvement of laboratory guide to therapy of cystic fibrosis infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39(11):2411-2414.
- Woodruff, H.B., J.M. Mata, S. Hernandez, S. Mochales, A. Rodriguez, E.O. Stapley, H. Wallick, A.K. Miller y D. Hendlin. 1977. Fosfomicin: Laboratory studies. *Chemother.* 23(1):1-22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulaci3n de aerosol que comprende 1 a 300 mg de fosfomicina m1s 1 a 300 mg de tobramicina, suspendidos en 0,5 a 7 ml de una soluci3n fisiol3gicamente apropiada, en la que la proporci3n en peso de fosfomicina a tobramicina es de 8 partes de fosfomicina a 2 partes de tobramicina, para su utilizaci3n en la prevenci3n y el tratamiento de la fibrosis quística en un paciente que requiera dicho tratamiento.
2. Formulaci3n de aerosol seg3n la reivindicaci3n 1, en la que dicha formulaci3n presenta un pH entre 4,5 y 8,0 en agua con una concentraci3n de cloro >30 mM.
3. Formulaci3n de aerosol seg3n la reivindicaci3n 1, en la que dicha formulaci3n est1 destinada a la administraci3n mediante aerosolizaci3n utilizando un nebulizador de chorro, ultras3nico, presurizado o de placa porosa vibratoria.
- 10 4. Formulaci3n en polvo seco de aerosol que comprende 1 a 300 mg de fosfomicina m1s 1 a 300 mg de tobramicina, en la que la proporci3n en peso de fosfomicina a tobramicina es de 8 partes de fosfomicina a 2 partes de tobramicina y por lo menos un excipiente farmac3uticamente aceptable en una forma en polvo seco micronizado que suministra un MMAD de 1 a 5 μ al aerosolizar, para su utilizaci3n en la prevenci3n y el tratamiento de la fibrosis quística en un paciente que requiera dicho tratamiento.

Figura 1. Curvas de tiempo-eliminación de una combinación 9:1 de fosfomicina:tobramicina contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. Símbolos: Δ control de no fármaco, \blacktriangle fosfomicina (28,8 $\mu\text{g/mL}$), \bullet tobramicina (3,2 $\mu\text{g/mL}$), \blacksquare fosfomicina (28,8 $\mu\text{g/mL}$) + tobramicina (3,2 $\mu\text{g/mL}$), y --- línea bactericida.

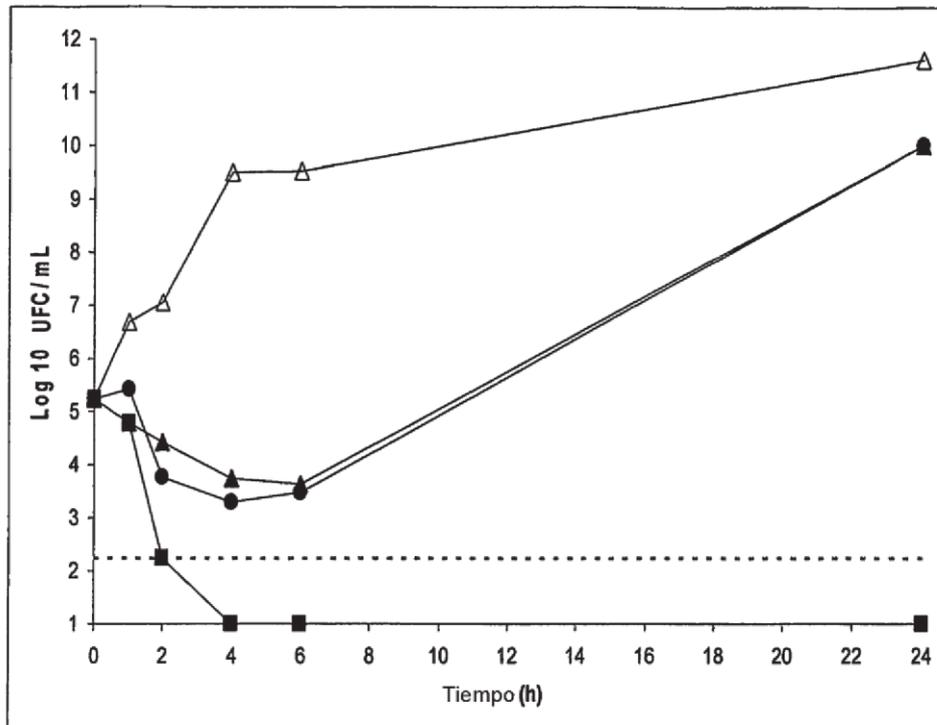


Figura 2. Curvas de tiempo-eliminación de una combinación 9:1 de fosfomicina:tobramicina contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. Símbolos: Δ control de no fármaco, \blacktriangle fosfomicina (14,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), \bullet tobramicina (1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), \blacksquare fosfomicina (14,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + tobramicina (1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), γ --- línea bactericida.

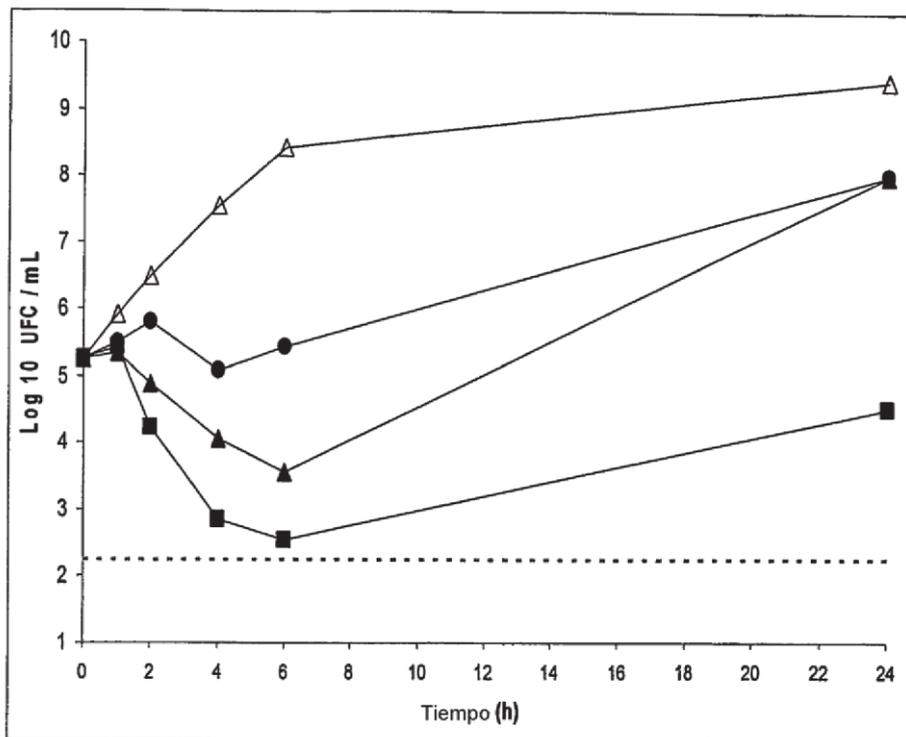


Figura 3. Curvas de tiempo-eliminación de una combinación 8:2 de fosfomicina:tobramicina contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. Símbolos: Δ control de no fármaco, \blacktriangle fosfomicina (25,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), \bullet tobramicina (6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), \blacksquare fosfomicina (25,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + tobramicina (6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), γ --- línea bactericida.

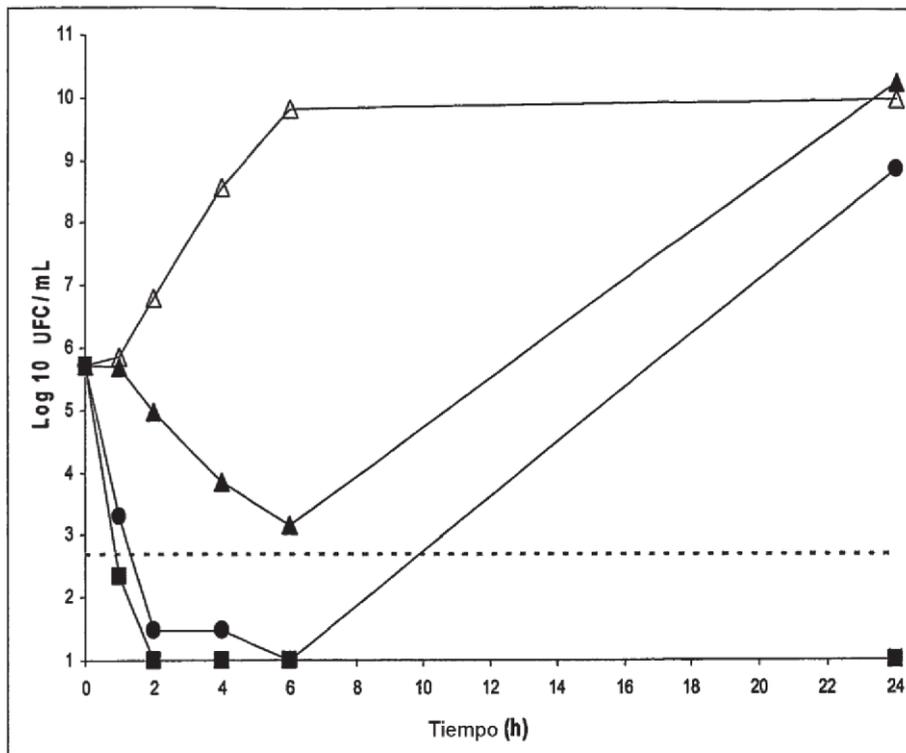


Figura 4. Curvas de tiempo-eliminación de una combinación 8:2 de fosfomicina:tobramicina contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. Símbolos: Δ control de no fármaco, \blacktriangle fosfomicina (12,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), \bullet tobramicina (3,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), \blacksquare fosfomicina (12,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + tobramicina (3,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y --- línea bactericida.

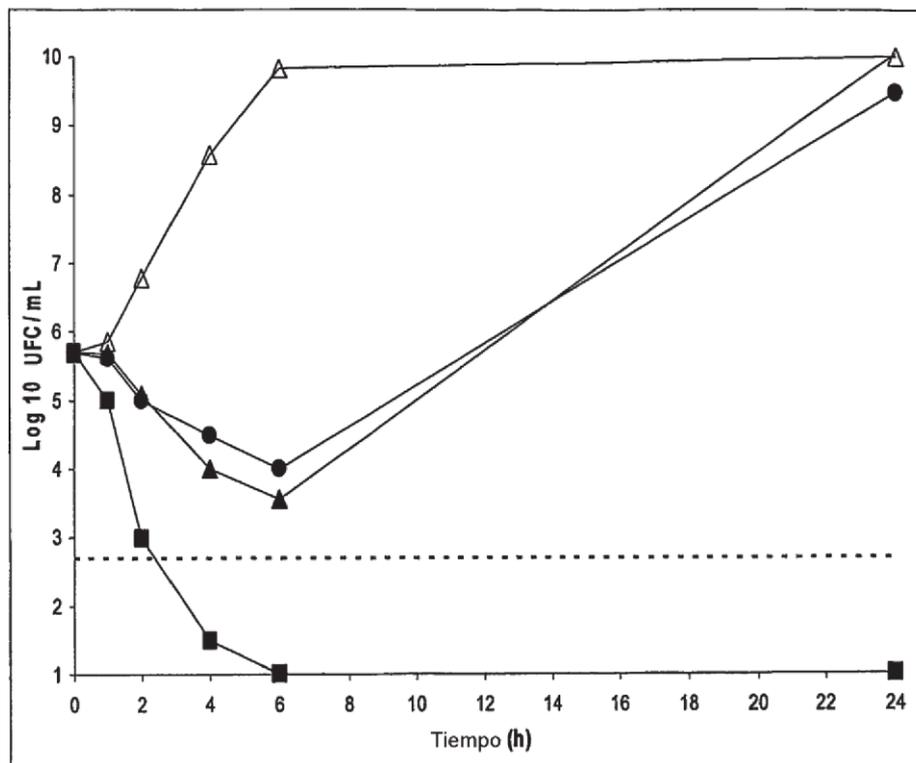


Figura 5. Curvas de tiempo-eliminación de una combinación 7:3 de fosfomicina:tobramicina contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. Símbolos: Δ control de no fármaco, \blacktriangle fosfomicina (22,4 $\mu\text{g/mL}$), \bullet tobramicina (9,6 $\mu\text{g/mL}$), \blacksquare fosfomicina (22,4 $\mu\text{g/mL}$) + tobramicina (9,6 $\mu\text{g/mL}$), y --- línea bactericida.

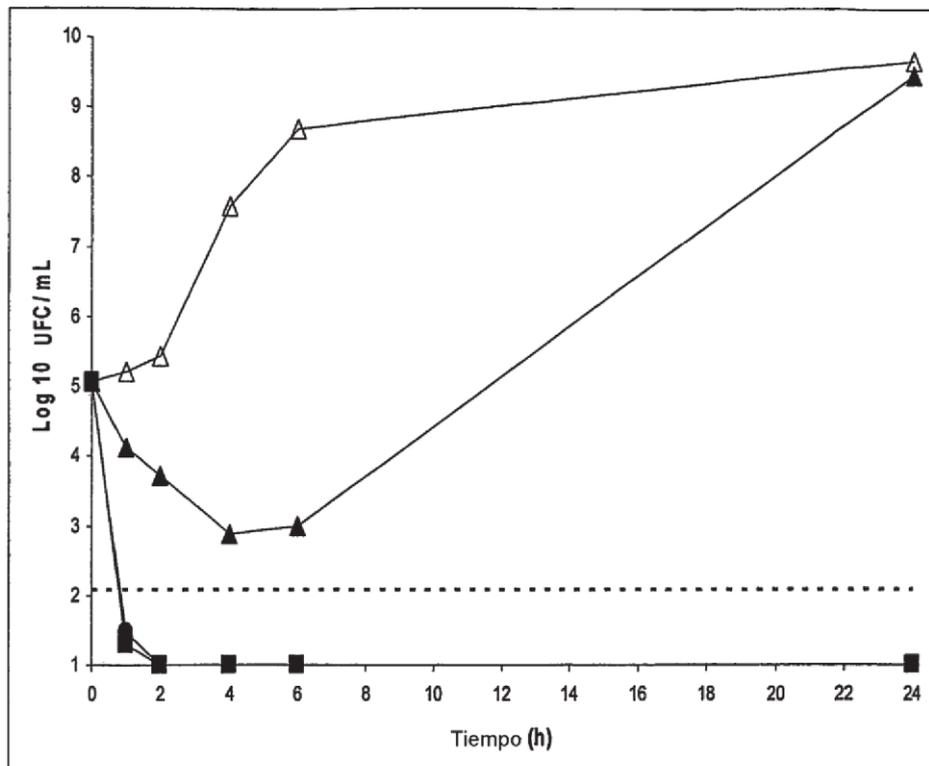


Figura 6. Curvas de tiempo-eliminación de una combinación 7:3 de fosfomicina:tobramicina contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. Símbolos: Δ control de no fármaco, \blacktriangle fosfomicina (11,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), \bullet tobramicina (4,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), \blacksquare fosfomicina (11,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + tobramicina (4,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), γ --- línea bactericida.

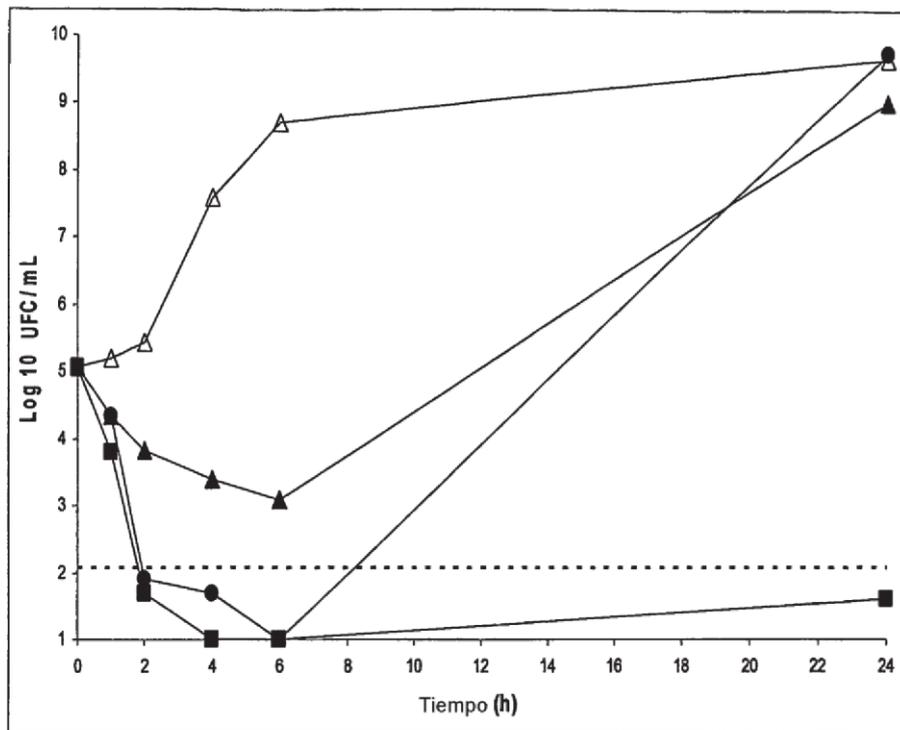


Figura 7. Curvas de tiempo-eliminación de una combinación 7:3 de fosfomicina:tobramicina contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. Símbolos: Δ control de no fármaco, \blacktriangle fosfomicina (5,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), \bullet tobramicina (2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), \blacksquare fosfomicina (5,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + tobramicina (2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y --- línea bactericida.

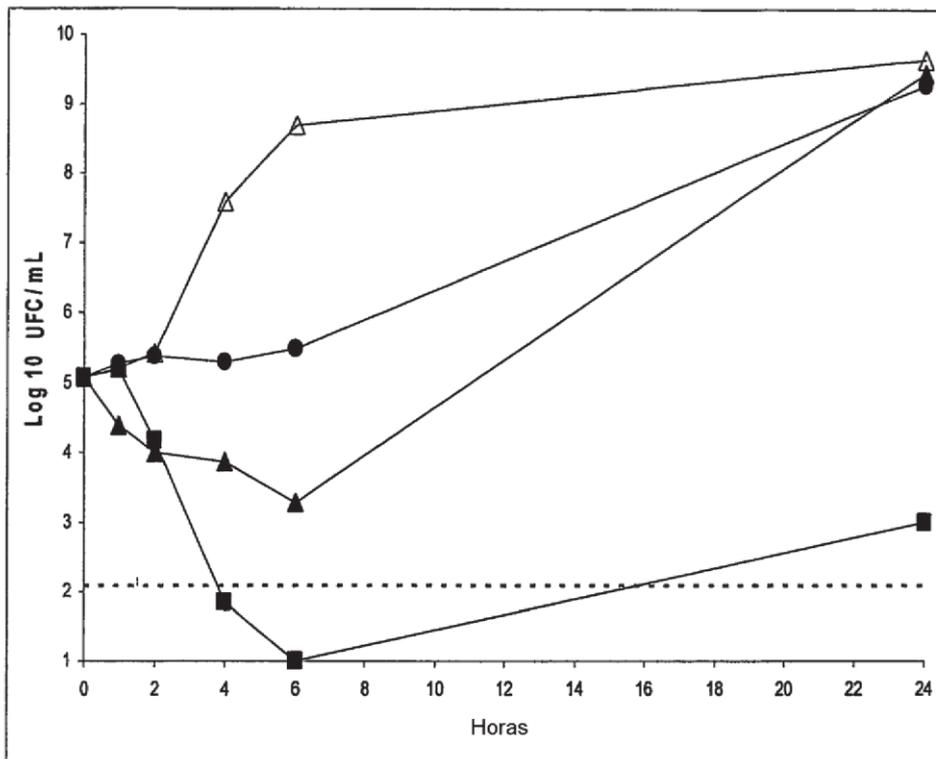


Figura 8. Curvas de tiempo-eliminación de fibromicina sola y una combinación 9:1, 8:2 y 7:3 de fosfomicina:tobramicina contra *P. aeruginosa* ATCC nº 27853. Los antibióticos se evaluaron a 32 µg/mL. Símbolos: Δ 9:1, \blacktriangle 8:2, \bullet 7:3, \circ tobramicina, y --- línea bactericida.

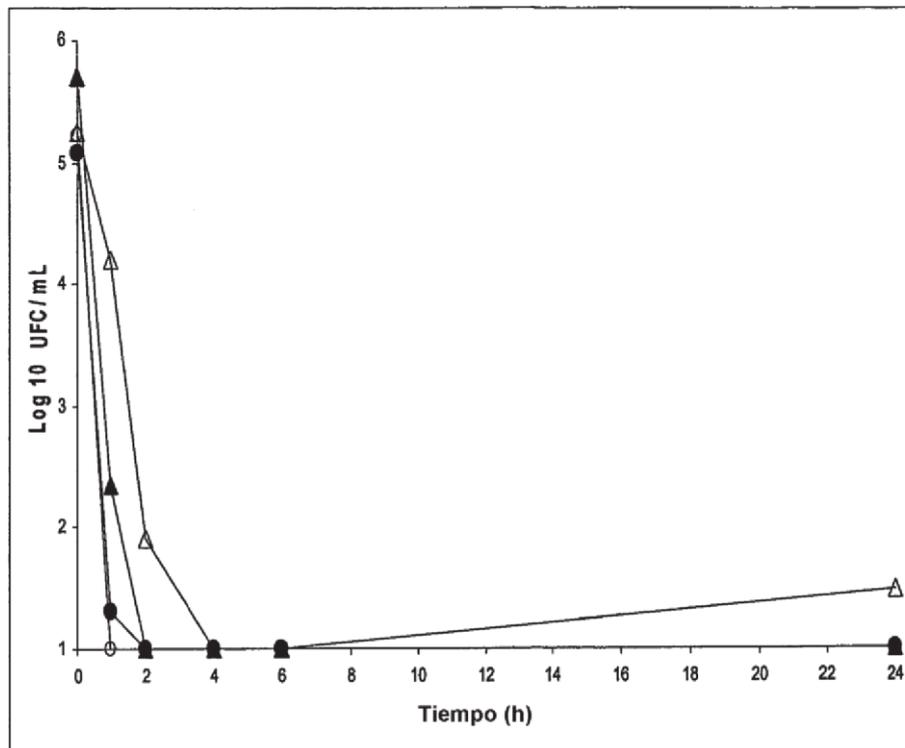


Figura 9. Curvas de tiempo-eliminación de fibromicina sola y una combinación 9:1, 8:2 y 7:3 de fosfomicina:tobramicina contra *P. aeruginosa* ATCC nº 27853. Los antibióticos se evaluaron a 16 µg/mL. Símbolos: Δ 9:1, \blacktriangle 8:2, \bullet 7:3, \circ tobramicina, y \dashrightarrow línea bactericida.

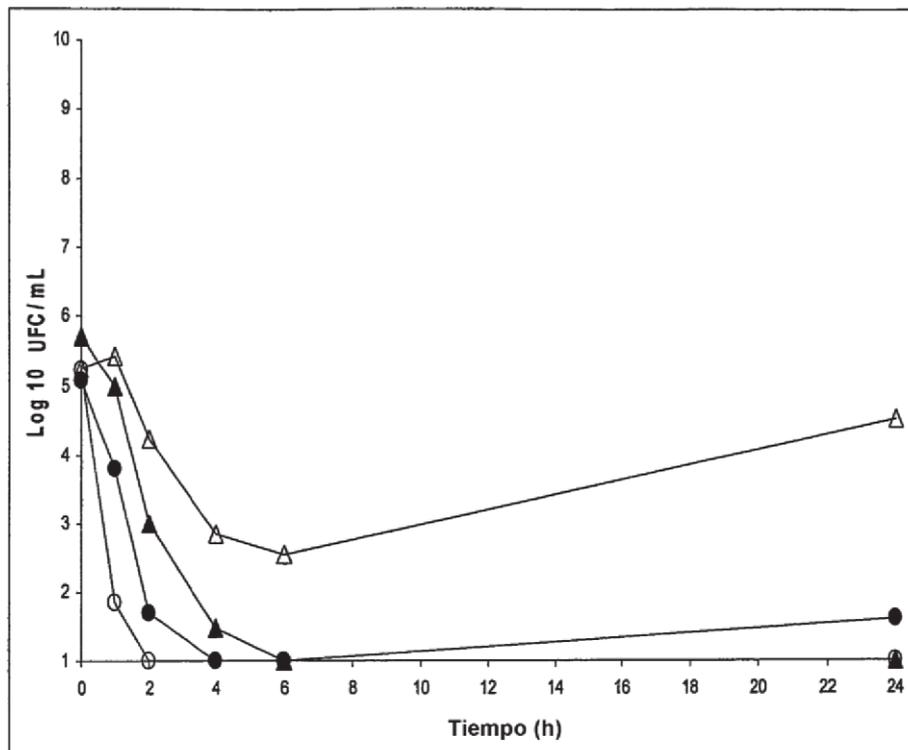


Figura 10. Curvas de tiempo-eliminación de una combinación 9:1 de fosfomicina:tobramicina contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. Símbolos: Δ control de no fármaco, \square 4,0 $\mu\text{g/mL}$, \blacksquare 8,0 $\mu\text{g/mL}$, \circ 16 $\mu\text{g/mL}$, \bullet 32 $\mu\text{g/mL}$, y --- línea bactericida.

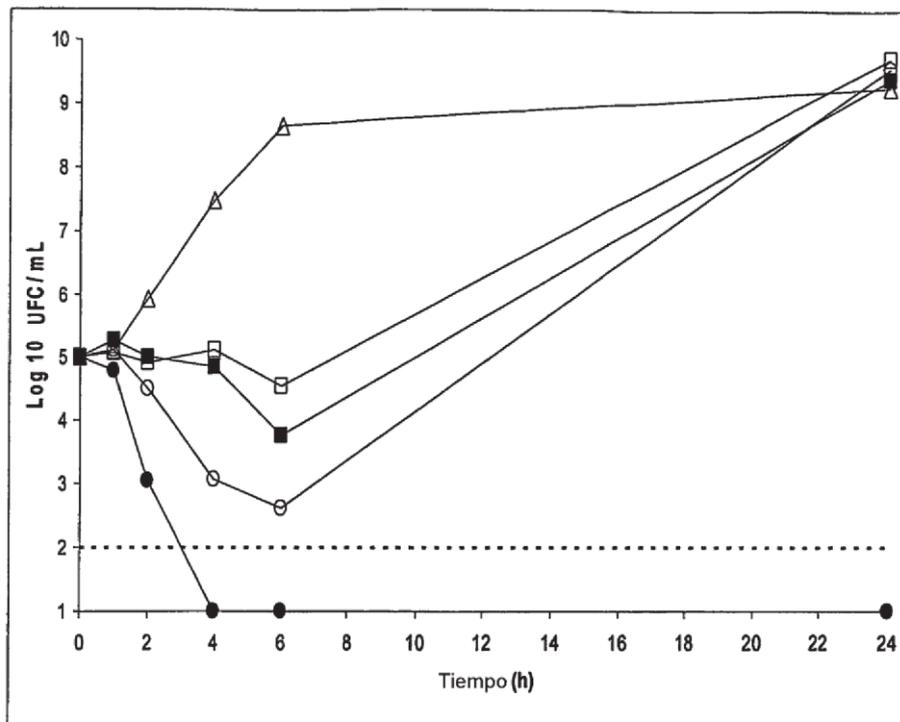


Figura 11. Curvas de tiempo-eliminación de una combinación 8:2 de fosfomicina:tobramicina contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. Símbolos: Δ control de no fármaco, \square 4,0 $\mu\text{g/mL}$, \blacksquare 8,0 $\mu\text{g/mL}$, \circ 16 $\mu\text{g/mL}$, \bullet 32 $\mu\text{g/mL}$, y --- línea bactericida.

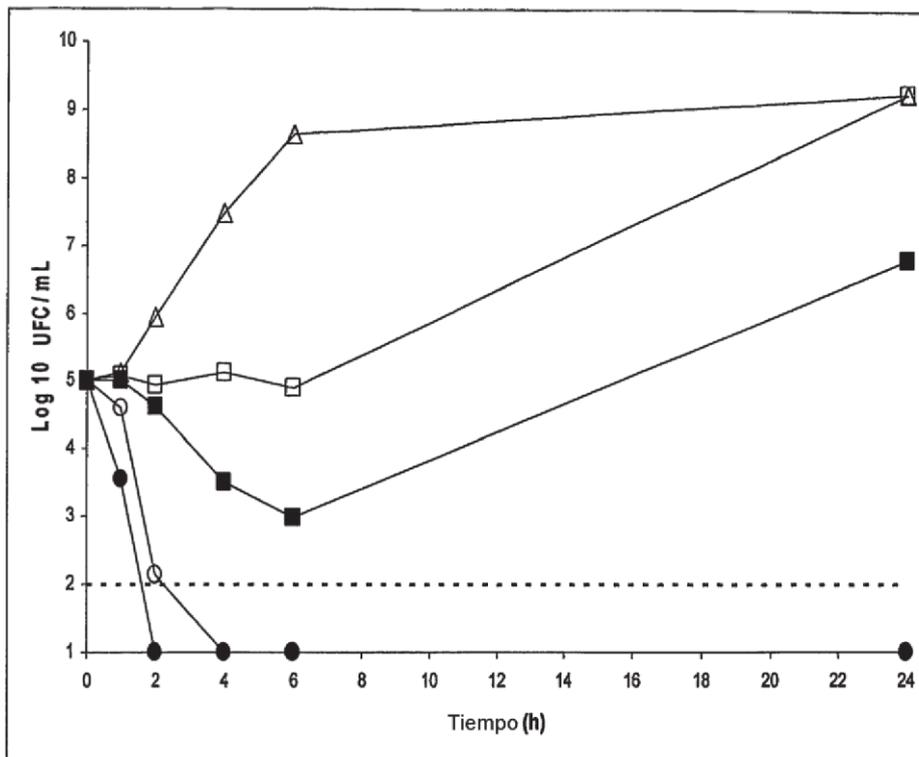


Figura 12. Curvas de tiempo-eliminación de una combinación 7:3 de fosfomicina:tobramicina contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. Símbolos: Δ control de no fármaco, \square 4,0 $\mu\text{g/mL}$, \blacksquare 8,0 $\mu\text{g/mL}$, \circ 16 $\mu\text{g/mL}$, \bullet 32 $\mu\text{g/mL}$, y --- línea bactericida.

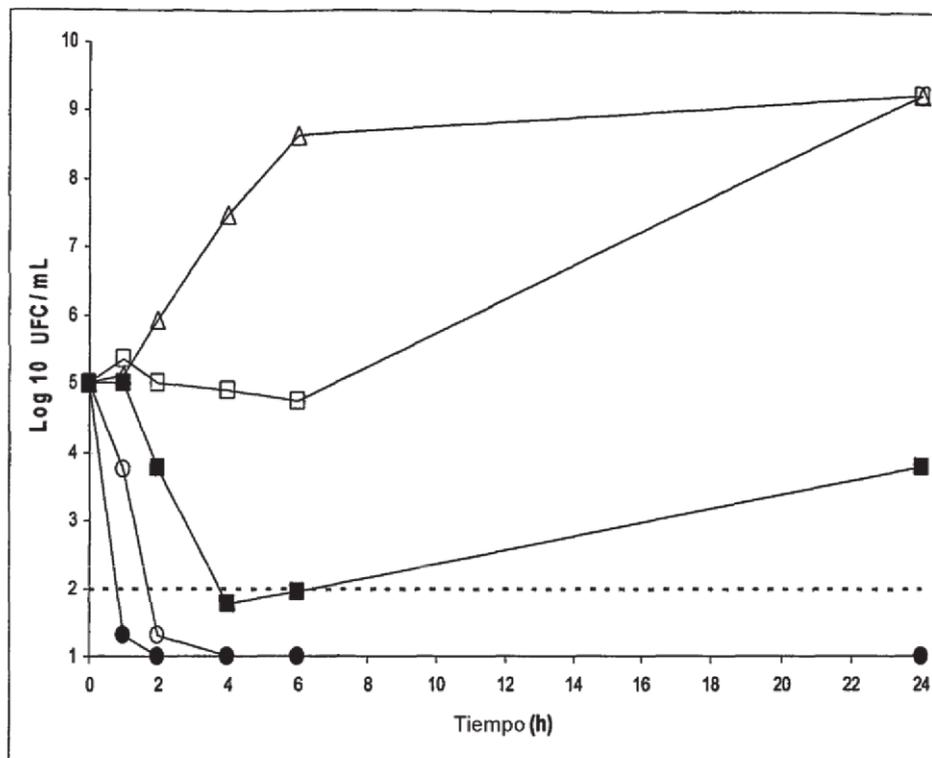


Figura 13. Eliminación de *E. coli* en pulmon de rata tras la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación 9:1 de fosfomicina:tobramicina

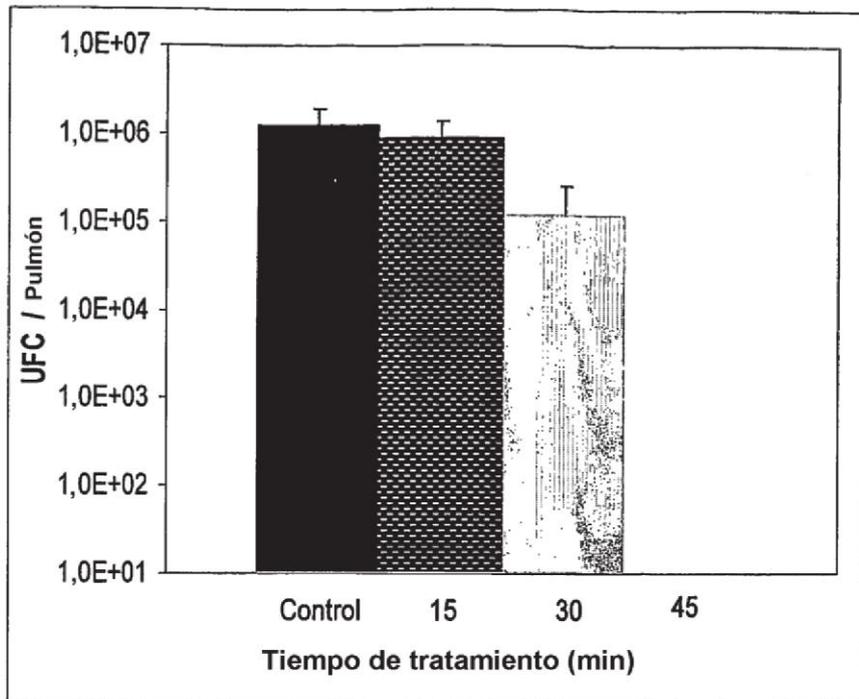


Figura 14. Eliminación de *E. coli* en pulmon de rata tras la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación 8:2 de fosfomicina:tobramicina

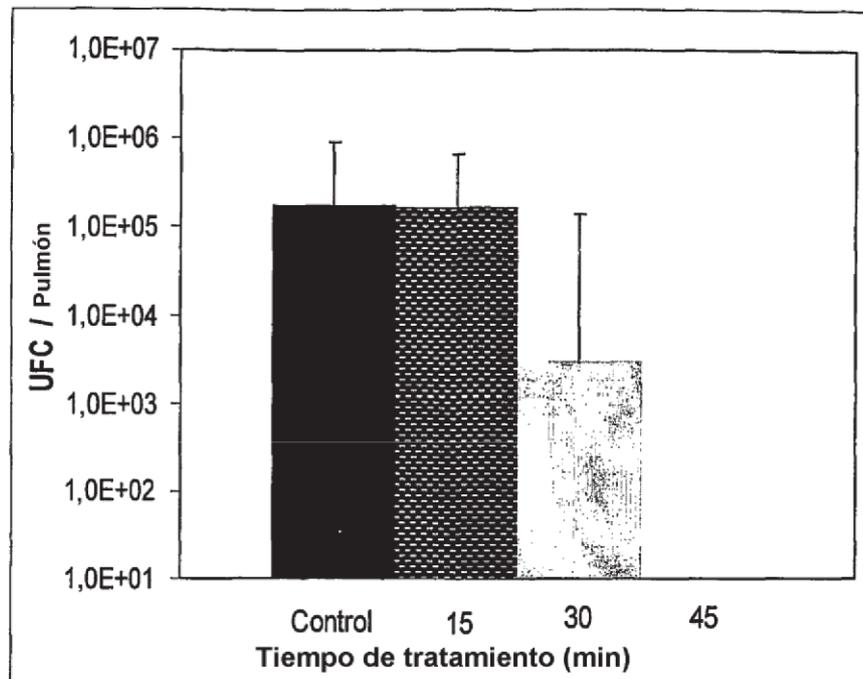


Figura 15. Eliminación de *E. coli* en pulmón de rata tras la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación 7:3 de fosfomicina:tobramicina

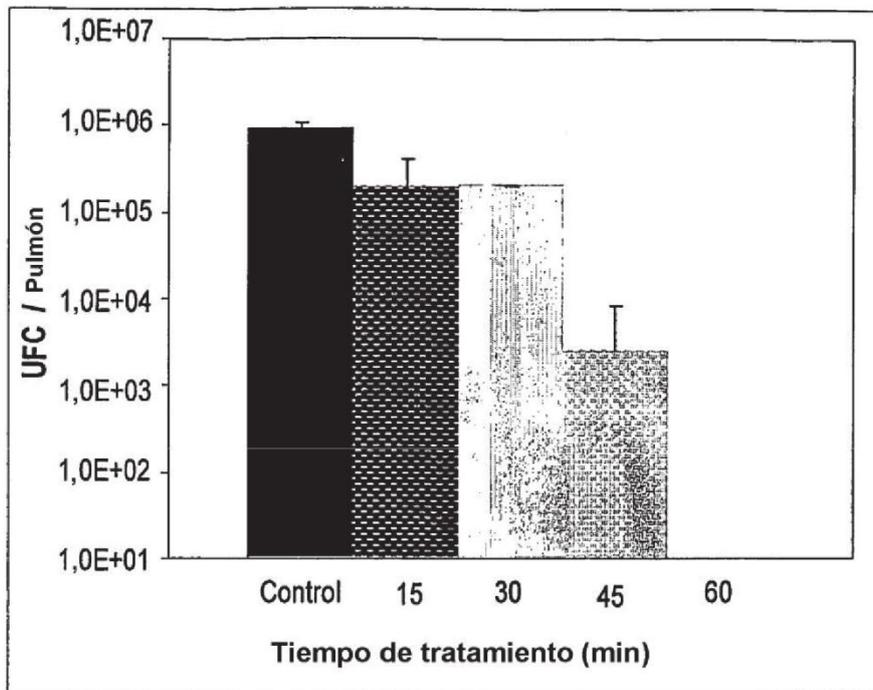


Figura 16. Eliminación de *E. coli* en pulmón de rata tras la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación 9:1 de fosfomicina:tobramicina y una solución 28 mg/ml de fosfomicina sola. Las ratas se expusieron a antibiótico aerosolizado durante 1 hora, dos veces al día durante 3 días.

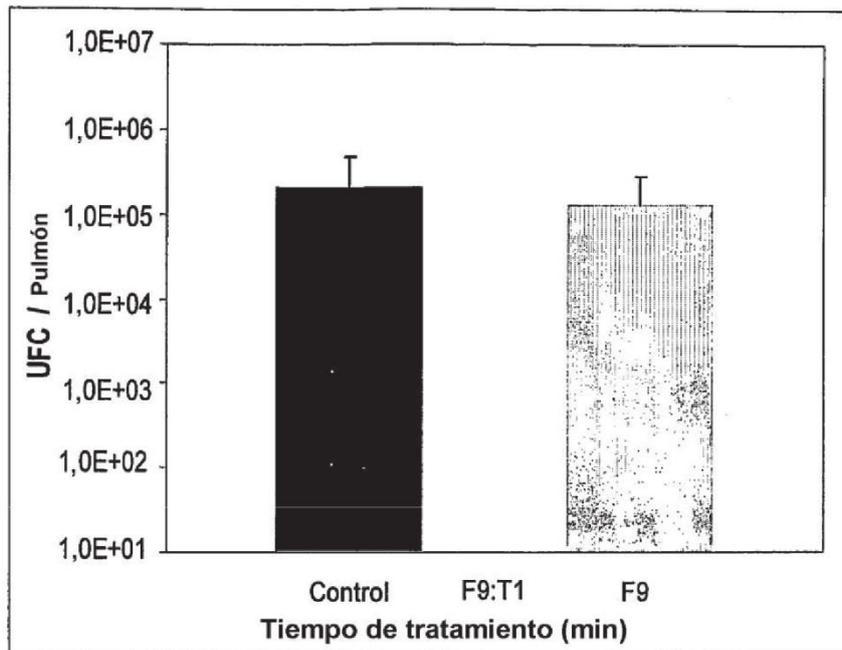


Figura 17. Eliminación de *E. coli* en pulmón de rata tras la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación 8:2 de fosfomicina:tobramicina y una solución 3,1mg/ml de tobramicina sola. Las ratas se expusieron a antibiótico aerosolizado durante 1 hora, dos veces al día durante 3 días.

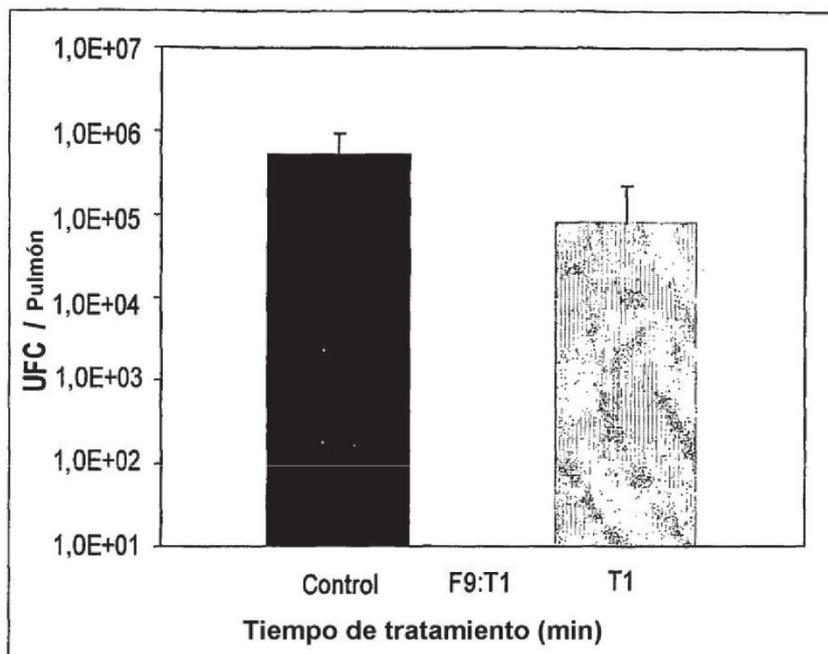


Figura 18. Eliminación de *E. coli* en pulmón de rata tras la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación 8:2 de fosfomicina:tobramicina y una solución 40 mg/ml de tobramicina. Las ratas se expusieron a antibiótico aerosolizado durante 1 hora, dos veces al día durante 3 días.

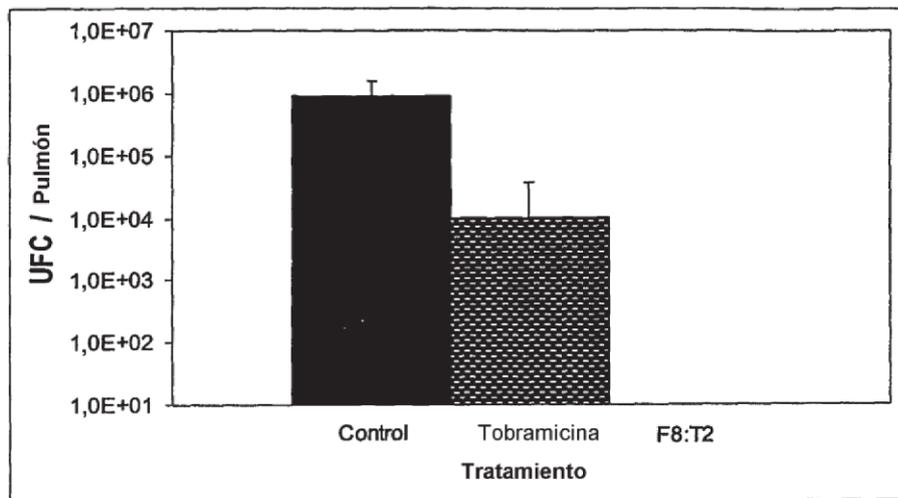


Figura 19. Eliminación de *E. coli* en pulmón de rata tras la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación 8:2 de fosfomicina:tobramicina y una solución 24,9 mg/ml de fosfomicina sola. Las ratas se expusieron a antibiótico aerosolizado durante 1 hora, dos veces al día durante 3 días.

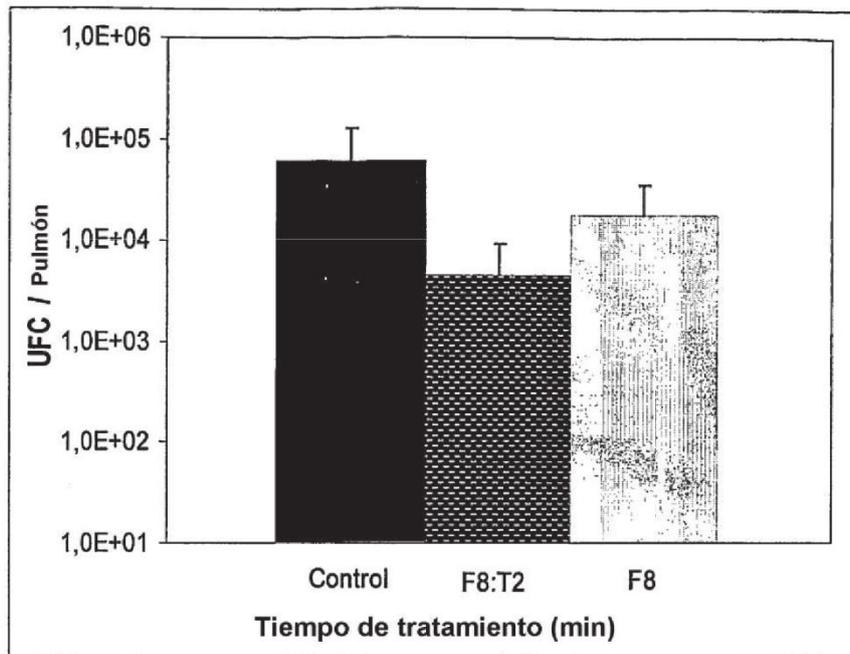


Figura 20. Eliminación de *P. aeruginosa* en pulmón de rata tras la administración de aerosol de una solución 31,1 mg/ml de una combinación 8:2 de fosfomicina:tobramicina y una solución 6,2 mg/ml de tobramicina sola. Las ratas se expusieron a antibiótico aerosolizado durante 1 hora, dos veces al día durante 3 días

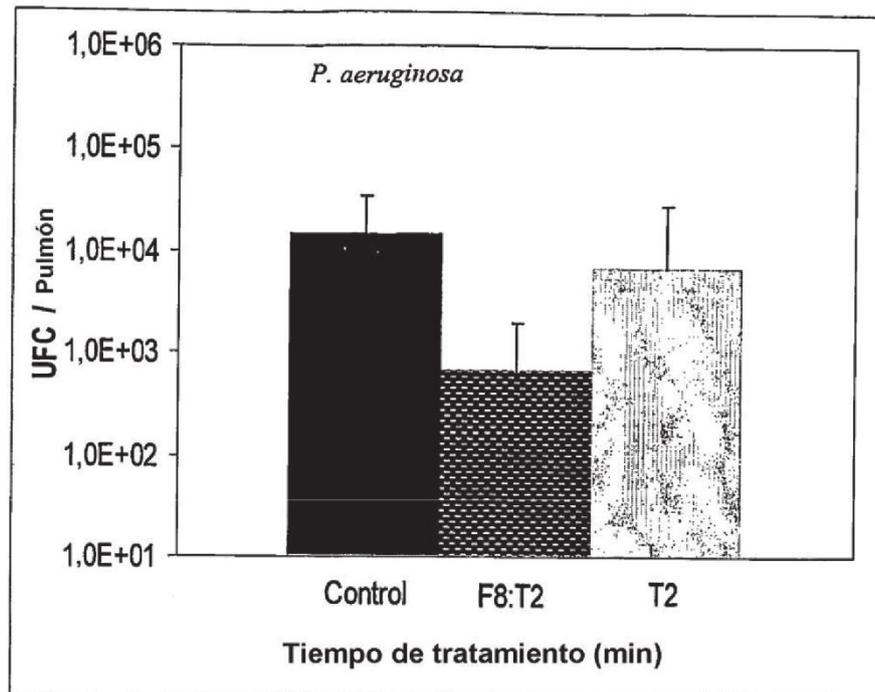


Figura 21. Eliminación de *P. aeruginosa* en pulmón de rata tras la administración de aerosol de unas soluciones 60 mg/ml y de 90 mg/ml de una combinación 8:2 de fosfomicina:tobramicina. Las ratas se expusieron a antibiótico aerosolizado durante 1 hora, dos veces al día durante 3 días

