

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 449**

51 Int. Cl.:

**A61M 15/00** (2006.01)

**A61K 38/57** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2007 E 07706125 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1981572**

54 Título: **Administración pulmonar de un inhibidor de proteinasa alfa-1**

30 Prioridad:

**09.02.2006 US 771465 P**

**16.02.2006 US 773654 P**

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

**01.04.2013**

73 Titular/es:

**KAMADA LTD. (50.0%)**

**7 SAPIR STREET, KIRYAT WEIZMANN SCIENCE  
PARK**

**74140 NESS-ZIONA, IL y**

**PARI PHARMA GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BAUER, SHABTAI;**

**KELLER, MANFRED y**

**KNOCH, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 399 449 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).

**ADMINISTRACIÓN PULMONAR DE UN INHIBIDOR DE PROTEINASA ALFA-1****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención está relacionada con un sistema y métodos para tratar enfermedades pulmonares y consiste de la administración de una composición líquida lista para utilizar, que consta de un inhibidor de proteinasa alfa-1 (API) en forma de aerosol en un nebulizador. Las composiciones de API están adaptadas para optimizar la liberación del ingrediente activo a los pulmones.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION****El inhibidor de Proteinasa Alfa-1 y la enfermedad pulmonar**

[0002] El inhibidor de proteinasa alfa-1 (API), también conocido como Alfa 1-antitripsina (A1AT, AAT), e inhibidor de serina-proteasa, es una proteína derivada del plasma que pertenece a la familia de inhibidores de la serina-proteinasa. Es una glicoproteína con un peso molecular medio de 50.000 daltones, producida por el hígado y secretado al sistema circulatorio. La proteína es una cadena polipeptídica individual, a la que se enlazan de manera no covalente varias unidades de oligosacáridos. El API desempeña un rol de control en la destrucción de tejidos por parte de serina-proteasas endógenas, y es el inhibidor de serina-proteasa en el plasma sanguíneo. El API inhibe, inter alia, tripsina, quimotripsina, varios tipos de elastasas, colagenasa de la piel, renina, urokinasa y proteasas de linfocitos polimorfonucleares.

[0003] El API tiene actualmente un uso terapéutico en el tratamiento del enfisema pulmonar en pacientes con deficiencia genética de API, también conocida como Deficiencia de Antitripsina-1 Alfa o Enfisema Congénito. El uso de API purificado ha sido aprobado como terapia de reemplazo (también conocida como "terapia de aumento") en esos pacientes. El papel endógeno del API consiste en regular la actividad de la elastasa de neutrófilos, que rompe las proteínas extrañas presentes en el pulmón. En ausencia de cantidades suficientes del API, la elastasa rompe el tejido pulmonar, lo que con el tiempo se convierte en daño crónico del tejido pulmonar y enfisema.

[0004] También se ha propuesto el uso del API como tratamiento para pacientes de fibrosis quística (FQ), que padecen infecciones endobronquiales y sinusitis recurrentes. La mayor causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes de FQ se relacionan con enfermedades pulmonares. Los pacientes de FQ transportan una mutación en el gen CFTR (siglas en inglés regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística), que da lugar a un malfuncionamiento de la proteína CFTR, agua defectuosa y transporte de sal, seguido de espesas secreciones en el pulmón.

[0005] El defecto en la membrana causado por la mutación en el CFTR conduce a una inflamación e infección pulmonar crónica. En individuos normales, la elastasa secretada por los neutrófilos en respuesta a la infección queda neutralizada por el API. Se sabe que el API penetra en el tejido pulmonar y ejerce su actividad en este tejido. En pacientes con FQ, no obstante, la libre respuesta inflamatoria satura el equilibrio normal proteasa (elastasa)/antiproteasa (API). El ciclo anormal se autoperpetúa de forma destructiva y conduce a la acumulación de elastasa en el pulmón, y a la larga, a daños en el tejido, destrucción de la arquitectura pulmonar, disfunción pulmonar severa y, por último, a la muerte. El API adicional puede reducir los efectos perjudiciales asociados con cantidades excesivas de elastasa. La solicitud internacional WO 2005/027821 a uno de los solicitantes de la presente invención enseña una composición novedosa de inhibidor de proteinasa alfa-1 (API) purificado, estable y activo para administración intravenosa e inhalación, así como el proceso para su preparación. Esa solicitud muestra una formulación en aerosol que consta de entre el 10% y el 20% de API.

[0006] US-A-5618 786 muestra el tratamiento de enfermedades pulmonares mediante nebulizadores ultrasónicos que contienen API.

[0007] Actualmente, el API se administra por vía intravenosa. Por ejemplo, las marcas Aralast®, Zemaira® y Prolastin® del Inhibidor de Proteinasa Alfa-1 son formulaciones intravenosas indicadas para la terapia de aumento en pacientes con deficiencia congénita de API con enfisema clínicamente evidente. Se pretende obtener una formulación de API para una administración eficaz en la inhalación, y aún no está disponible en el mercado debido a problemas para lograr la cantidad adecuada, así como la dispersión y la actividad de la proteína. La solicitud internacional WO2005048985 revela composiciones que constan de API, que a su vez constan de un carbohidrato estabilizador, un surfactante y un antioxidante para estabilizar el API para su uso terapéutico, donde la composición se formula preferiblemente para ser administrada mediante la inhalación.

**Liberación pulmonar de composiciones farmacéuticas**

[0008] La solicitud internacional WO 01/34232 para algunos de los solicitantes de la presente invención revela un nebulizador de inhalación que administra una cantidad mayor de aerosol durante la inhalación a la vez que minimiza

tanto la pérdida de aerosol durante la exhalación como el medicamento residual en el depósito del nebulizador. El nebulizador incluye un generador de aerosol que atomiza el líquido a través de un diafragma vibrante en partículas que se liberan de forma eficaz en los pulmones. Este nebulizador se comercializa actualmente con el nombre de eFlow®. Los nebulizadores clásicos de chorro y ultrasónicos tienen el inconveniente de desnaturalizar

5 potencialmente el agente activo debido al aumento de las fuerzas de corte (nebulizadores de chorro y ultrasónicos) y la temperatura (nebulizadores ultrasónicos). eFlow® incorpora un mecanismo de aerosolización "ligero" que minimiza la exposición del medicamento a los esfuerzos de corte mediante la reducción de los esfuerzos de corte y el tiempo de residencia en los campos de corte y no calienta la formulación del líquido.

10 Las solicitudes internacionales WO 03/026832; WO 2004/014569; WO 2004/052436 y la Patente de EE.UU. 5.518.179 revela más aspectos de la tecnología de eFlow®. El uso del nebulizador revelado en WO 01/34232 queda ejemplificado con una solución de salbutamol/sulfato y una suspensión de budesonida. La antitripsina Alfa está listada como agente activo potencial para su uso con ese nebulizador.

15 **[0009]** La Patente de EE.UU. núm. 6.655.379 revela un método y dispositivo para la liberación pulmonar de una formulación de agente activo donde la frecuencia de flujo inspiratorio de la formulación del agente activo es menor de 17 litros/min. La formulación del agente activo puede administrarse como polvos secos, en forma nebulizada, o en forma de partículas aerosolizadas con adición de un propelente.

Esa invención queda ejemplificada en conjugación con el polvo de insulina inhalable.

20 **[0010]** Existe, por tanto, una necesidad insatisfecha de aerosoles inhalables para una liberación pulmonar conveniente y eficaz de API en una forma activa.

#### RESUMEN DE LA INVENCÓN

25 **[0011]** La presente invención está relacionada con un sistema y métodos para tratar enfermedades pulmonares en un sujeto que lo precise. El sistema y métodos ofrecen la administración al sujeto de una composición que consta de API en forma de aerosol. El aerosol se produce al nebulizar la composición de API en un nebulizador eléctrico. En particular, el nebulizador es el nebulizador electrónico eFlow®, según revela la solicitud internacional WO 01/34232 y la composición de API es una solución lista para usarse que consta de API activo y altamente puro, según se revela

30 en la solicitud internacional WO 2005/027821.

**[0012]** La presente invención revela un sistema de inhalación que administra grandes cantidades de API activo en la ubicación deseada de los tejidos pulmonares, activando así un tratamiento eficaz para enfermedades pulmonares.

35 **[0013]** La invención se basa en parte del inesperado descubrimiento de que la liberación pulmonar de una composición que conste de menos del 10% (peso/volumen) de API nebulizado en el nebulizador eFlow® es eficaz y eficiente. La composición de API es una composición líquida esterilizada, preferiblemente lista para usarse, que consta de API activo, altamente puro. La presente invención muestra ahora que la actividad del API tras la nebulización sigue siendo por encima del 90% de la actividad antes de la nebulización y, debido a la alta pureza de

40 la composición, no existen pruebas de que se formen dímeros, oligómeros o agregados en el aerosol del API como resultado del proceso de nebulización. Además, la mayoría de las gotículas de aerosol tienen un tamaño inferior a 5 µm y, más específicamente, entre 1 y 4 µm, posibilitando la máxima respuesta en regiones pulmonares periféricas. Afortunadamente, utilizar el sistema de la presente invención reduce el tiempo de inhalación debido a su alta frecuencia de salida de líquido y a la liberación eficaz de API activo en el pulmón.

45 **[0014]** Además, la alta pureza y la alta actividad del API en combinación con las características únicas del nebulizador, incluyendo un principio de aerosolización de membrana vibratoria "suave" que produce baja fuerza de corte en las moléculas de proteína, aseguran una alta eficacia y seguridad. La formulación líquida y estable, lista para usarse, compuesta de API altamente puro, activo, es conveniente y aporta una precisión mejorada en la dosificación en comparación con productos liofilizados.

50 **[0015]** A pesar de los considerables esfuerzos de desarrollo durante la última década, aún no han aparecido otras formas satisfactorias de API inhalado. La combinación de un dispositivo eficiente y de rápida liberación, con alta pureza, con una formulación de API altamente puro, estable y activo, en forma líquida y lista para usarse, empaquetada en viales de dosis predeterminados, ofrece además una aceptación y cumplimiento mejorados por

55 parte de pacientes si se compara con la administración intravenosa y los intentos anteriores con terapias de API inhalado.

60 **[0016]** Del mismo modo, en cierto modo, la presente invención aporta un sistema para el tratamiento de enfermedades pulmonares que consta de:

- 65
- a) Una composición farmacéutica que se compone de un inhibidor de proteinasa alfa-1 purificado, estable y activo, producido por el hígado y secretado al sistema circulatorio en forma de una solución estéril lista para usarse, donde el inhibidor de proteinasa alfa-1 purificado y estable es puro al menos en un 90%, y
  - b) Un nebulizador de inhalación que consta de

- 5
- 10
- 15
- i. Un generador en aerosol que se compone de: un contenedor de almacenamiento líquido que contiene la composición farmacéutica en líquido; un diafragma con un primer lado y un segundo lado opuesto, donde el diafragma tiene diversas aperturas que se amplían a través de él, desde el primer lado al segundo, donde el primero está conectado al contenedor de almacenamiento líquido, de tal modo que el líquido que llena el depósito entra en contacto con el primer lado del diafragma; y un generador de vibración capaz de hacer vibrar el diafragma de tal modo que el líquido que llena el contenedor de líquido sea atomizado en el segundo lado del diafragma a través de las aperturas en el mismo;
  - ii. Una cámara de mezclado, en la que el generador de aerosol expulsa el mencionado aerosol, y está en contacto con el segundo lado del diafragma;
  - iii. Una válvula de inhalación que se abre para permitir la entrada de aire ambiental en la cámara de mezclado durante una fase de inhalación y se cierra para impedir el escape de ese aerosol desde la cámara de mezclado durante la fase de exhalación; y
  - iv. Una válvula de exhalación que se abre para permitir la descarga del aire respiratorio de un paciente al exterior durante la fase de exhalación y se cierra para impedir la entrada de aire ambiental durante la fase de inhalación;

20 Donde el nebulizador de inhalación nebuliza la composición farmacéutica para formar una composición de aerosol y donde al menos del 90% del inhibidor de proteinasa alfa-1 puro y nebulizado se encuentra en forma activa.

[0017] Según algunas realizaciones, la composición líquida se embala en dosis unitarias preesterilizadas.

25 [0018] En una realización, el API de la composición farmacéutica se purifica desde una mezcla parcialmente purificada de proteínas mediante un proceso consistente en la cromatografía de diversas resinas de intercambio iónico, según revela la solicitud internacional WO 2005/027821 a uno de los solicitantes de la presente invención. Según se revela en esa invención, es preferible purificar el API en la composición farmacéutica desde una mezcla parcialmente purificada de proteínas mediante un proceso consistente en la cromatografía de al menos dos resinas de intercambio aniónico y al menos una resina de intercambio catiónico.

30 [0019] En una realización, la concentración de API en la composición farmacéutica es menos del 10% (peso por volumen; p/v). En algunas realizaciones, la concentración de API se encuentra entre el 1% hasta casi el 5%, por lo general, el 2%. En otra realización, el pH de la composición farmacéutica se encuentra entre el 6,5-7,5. En realizaciones adicionales, la composición farmacéutica carece de un estabilizador de proteínas.

35 [0020] El AAT purificado es al menos un 90% puro. Según las realizaciones preferidas, el AAT purificado es al menos puro en un 95%, preferentemente puro en un 99%. Al menos el 90% del API se encuentra en su forma activa.

40 [0021] En otra realización, el diámetro de masa mediana de la distribución de la gotícula del aerosol es inferior a 5  $\mu\text{m}$ ; preferentemente, el diámetro de masa mediana de las gotículas del aerosol se encuentra entre 1  $\mu\text{m}$  y 4  $\mu\text{m}$ , por lo general, entre 2,0  $\mu\text{m}$  y 3,0  $\mu\text{m}$ , y más específicamente, entre 2,5  $\mu\text{m}$  y 3,3  $\mu\text{m}$ . Además, se ha hallado una distribución con un tamaño muy estrecho del tamaño de las gotículas (reflejado por unas desviaciones estándares geométricas, DEG, extraordinariamente bajas) que permiten la liberación dirigida del medicamento hasta lo profundo de los pulmones. Según una realización, la DEG es inferior a 2,0. Según otra realización, el DEG es inferior a 1,7.

45 [0022] Según otra realización, al menos una fracción del 50%, preferentemente el 60%, y más preferentemente el 70%, y más de la dosis nominal cargada de API se disuelve en gotículas con un diámetro de aproximadamente 1,1  $\mu\text{m}$  hasta 4,7  $\mu\text{m}$ .

50 [0023] Según otro aspecto, la presente invención ofrece el uso de una composición farmacéutica que se compone de inhibidor de proteinasa alfa-1 (API) purificado, estable y activo, producido por el hígado y secretado al sistema circulatorio en forma de una solución estéril lista para usarse, donde el inhibidor de proteinasa alfa-1 es puro como mínimo al 90%; y b) un nebulizador de inhalación que consta de

- 55
- 60
- 65
- i. un generador de aerosol que consiste en: un contenedor de almacenamiento de líquido, que consta de una composición farmacéutica líquida; un diafragma con un primer lado y un segundo lado opuesto, donde el diafragma tiene diversas aperturas que se amplían a través de él, desde el primer lado al segundo, donde el primero está conectado al contenedor de almacenamiento líquido, de tal modo que el líquido que llena el depósito entra en contacto con el primer lado del diafragma; y un generador de vibración capaz de hacer vibrar el diafragma de tal modo que el líquido que llena el contenedor de líquido sea atomizado en el segundo lado del diafragma a través de las aperturas en el mismo;
  - ii. Una cámara de mezclado, en la que el generador de aerosol expulsa el mencionado aerosol, y está en contacto con el segundo lado del diafragma;
  - iii. Una válvula de inhalación que se abre para permitir la entrada de aire ambiental en la cámara de mezclado durante una fase de inhalación y se cierra para impedir el escape de ese aerosol desde la cámara de mezclado durante la fase de exhalación; y

- iv. Una válvula de exhalación que se abre para permitir la descarga del aire respiratorio de un paciente al exterior durante la fase de exhalación y se cierra para impedir la entrada de aire ambiental durante la fase de inhalación;

5 para la preparación de un sistema que consta de esa composición farmacéutica y ese nebulizador, donde la composición farmacéutica se nebuliza mediante el nebulizador de inhalación para formar la composición de aerosol, para administrarla al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición de aerosol compuesta del inhibidor de proteinasa alfa-1, donde al menos, el 90% del inhibidor de proteinasa alfa-1 puro se encuentra en su forma activa.

10 **[0024]** En una realización, al menos el 50% de la dosis nominal cargada de API puede administrarse al sujeto, preferentemente el 60% y más preferentemente el 70% o más del API se administra al sujeto. Según la realización preferida actualmente, los tejidos pulmonares del sujeto absorben el API.

15 **[0025]** Según algunas realizaciones, la enfermedad o afección pulmonar se elige del grupo comprendido por enfisema, incluyendo el enfisema hereditario, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquiectasia (dilatación crónica de los bronquios), enfermedades y desórdenes fibróticas pulmonares incluyendo fibrosis quística, fibrosis pulmonar intersticial y sarcoidosis, tuberculosis y enfermedades pulmonares secundarias del VIH.

20 **[0026]** Se requiere que el API equilibre el exceso de concentración de elastasa de neutrófilos presente durante los episodios de inflamación y estrés que ocurren en las enfermedades pulmonares en la fase de exacerbación. Las altas cantidades de API activo que pueden administrarse al tejido pulmonar mediante el sistema y método de la presente invención lo hace muy apropiado para tratar las enfermedades pulmonares en la fase de exacerbación.

25 **[0027]** Según algunas realizaciones, el sistema y/o método se utiliza para tratar una enfermedad pulmonar en una fase de exacerbación aguda de la misma. Según una realización, la enfermedad se selecciona del grupo comprendido por enfisema, incluyendo el enfisema hereditario, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquiectasia, otras enfermedades parenquimatosas o fibróticas pulmonares incluyendo fibrosis quística, fibrosis pulmonar intersticial y sarcoidosis, tuberculosis y enfermedades pulmonares secundarias del VIH.

30 **[0028]** En una realización, un sujeto se refiere a un sujeto humano. El sujeto humano puede ser un adulto, un niño o un bebé.

35 **[0029]** Éstas y otras realizaciones de la presente invención se harán patentes en conjunción con la descripción y reivindicaciones siguientes.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40 **[0030]** La FIG. 1 muestra el perfil de administración del medicamento tras la simulación de la respiración con API.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 **[0031]** La presente invención revela un sistema y métodos para tratar una enfermedad pulmonar en un sujeto con ciertas necesidades, y consisten en la administración de una composición farmacéutica líquida lista para usarse, que consiste en un inhibidor de proteinasa alfa-1 (API) purificado, estable y activo, en forma de un aerosol, y producido mediante la nebulización de la composición de API, en particular, mediante la nebulización de la composición del API mediante un nebulizador eFlow®.

50 **[0032]** La vía de inhalación para el tratamiento de enfermedades respiratorias posee varias ventajas sobre otras vías de administración, específicamente la administración IV: la administración de la inhalación se dirige a la ubicación objetivo, de tal modo que se da una absorción sistémica desdeñable y se minimizan los efectos secundarios; requiere menos dosis terapéuticas, por lo que hay más producto disponible; aporta un rápido alivio de los síntomas y se prevé buena tolerancia; es una forma más adecuada para los pacientes, por lo que se espera una mejor adherencia; y reduce los costes de tratamiento como resultado de un uso eficiente de un medicamento caro que emplea API purificado y estable con un nebulizador altamente eficaz como es eFlow®.

55 **[0033]** En principio, un sistema terapéutico eficaz para la administración pulmonar del inhibidor de proteinasa alfa-1 aerosolizado mostrará las siguientes propiedades:

- 60
1. Las gotículas del aerosol retienen una alta actividad del inhibidor de proteinasa alfa-1: se pretende una actividad superior al 90%;
  2. La nebulización no aumenta la dimerización, oligomerización o agregación del API;
  3. El tamaño de la gotícula mediana del aerosol es inferior a 5 µm.
  4. La fracción respirable es de al menos el 80%.
- 65

5. Un momentum balístico muy bajo caracterizado por que menos del 2% del medicamento disuelto o dispersado en las gotículas del aerosol pueden quedar atrapadas en un puerto de inducción (p.ej., orofaringe artificial) de un impactador en cascada;
6. Tiempo de tratamiento individual y corto de unos 10 minutos o menos.

**[0034]** La presente invención aporta un sistema que consiste en API puro liberado a través del nebulizador eFlow®, que muestra, entre otras cosas, las propiedades ventajosas antes mencionadas. Además, la presente invención aporta una composición líquida que consta de API en una concentración inferior al 10% p/v, preferiblemente una composición líquida lista para usarse.

**[0035]** La alta actividad y pureza de la composición API en combinación con el mecanismo de aerosolización de membrana vibratoria suave asegura la administración de API altamente activo. La formulación líquida y estable lista para usarse es apropiada para su utilización y obvia el problema de la preparación de dosis y la precisión de la dosificación.

### Definiciones

**[0036]** Para mejor comprensión de esta invención e aportan los siguientes términos y definiciones:

**[0037]** Según se utiliza aquí, el término “Inhibidor de Proteinasa Alfa-1” (API), también conocido con “alfa-1 antitripsina” (AAT), hace referencia a una glicoproteína producida por el hígado y secretada al sistema circulatorio. El API pertenece a la familia del inhibidor de serina proteinasa (Serpina) de inhibidores proteolíticos. Esta glicoproteína consiste en una cadena de polipeptídicos que contienen un residuo de cisteína y un 12-13% de carbohidratos de todo el peso molecular. API posee tres ubicaciones de N-glicosilación en los residuos de asparagina 46, 83 y 247, que están ocupados por mezclas de glicanos bi y triantenarios complejos. Esto da lugar a múltiples isoformas de API, teniendo el punto isoeléctrico entre 4,0 y 5,0. Los monosacáridos del glicano incluyen N-acetilglucosamina, manosa, galactosa, fucosa y ácido siálico. El API sirve como seudopstrato para la elastasa; la elastasa ataca el bucle del centro reactivo de la molécula de API partiendo el vínculo entre los residuos de metionina<sub>358</sub> – serina<sub>359</sub> para formar un complejo API-elastasa.

**[0038]** El término “glicoproteína”, según se utiliza aquí, hace referencia a una proteína o péptido covalentemente vinculado a un carbohidrato. El carbohidrato puede ser monomérico o estar compuesto de oligosacáridos.

**[0039]** El término nebulizador “eFlow®” hace referencia al nebulizador revelado en la solicitud internacional WO 01/34232. El término “nebulizador de inhalación” se refiere a un nebulizador que consta de los elementos básicos del nebulizador eFlow® y a cualquier nebulizador equivalente. Los términos “administración pulmonar” y “administración respiratoria” se refieren a la administración de API a un paciente mediante inhalación a través de la boca y a los pulmones.

**[0040]** Los términos “tratar” y “tratando” incluye prevenir, aliviar, mejorar, detener, limitar, ralentizar o revertir la progresión, o reducir la severidad de las condiciones patológicas aquí descritas. De este modo, esos métodos incluyen tanto una administración terapéutica médica (aguda) y/o (prevención) profiláctica según convenga.

**[0041]** Los términos “fibrosis quística” o “FQ” se refieren a una afección recesivo autosomático heredado causado por mutaciones en el gen que codifica el canal de cloro del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

**[0042]** El término “enfisema” hace referencia a una condición patológica de los pulmones en la que disminuye la función respiratoria y a menudo existe dificultad al respirar debido a un aumento anormal del tamaño de los espacios aéreos, causado por una expansión irreversible de los alveolos y/o por la destrucción de las paredes alveolares por la elastasa de neutrófilos.

**[0043]** El término “EPOC” o “enfermedad pulmonar obstructiva crónica” se refiere a una enfermedad pulmonar caracterizada por la obstrucción del flujo de aire que afecta a la respiración normal. EPOC es la cuarta causa de muerte en Estados Unidos, con 120.000 fallecidos en 2002. Fumar es el principal factor de riesgo para EPOC, donde aproximadamente entre el 80 y el 90% de muertes está causada por EPOC.

**[0044]** El término “bronquiectasia” hace referencia a un desorden congénito o adquirido asociado con la dilatación anormal de los bronquios, con destrucción de la pared bronquial e inflamación transmural. La conclusión funcional más importante de la anatomía de las vías aéreas daña gravemente el despeje de las secreciones del árbol bronquial.

**[0045]** “Tuberculosis” o “TB” hace referencia a la enfermedad causada por la bacteria Mycobacterium tuberculosis. Se trata de una infección que se transporta por el aire, crónica y bacteriana.

5 [0046] Según se indica aquí, el término “exacerbación” hace referencia a un aumento en la severidad de los síntomas durante el curso de una enfermedad que se asocia, en la mayoría de los casos, con un empeoramiento de la calidad de vida. Las exacerbaciones son muy frecuentes en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas y, más específicamente, en pacientes deficientes de API. Por definición, las exacerbaciones son simplemente un empeoramiento y/o aumento de los síntomas.

**Enfisema y deficiencia de API**

10 [0047] El enfisema es una condición patológica de los pulmones marcada por un aumento anormal en el tamaño de los espacios de aire, dando como resultado respiración extenuante y un aumento en la susceptibilidad a la infección. Puede estar causado por un enfisema hereditario o deficiencia (AAT) irreversible; se trata de un desorden genético que aumenta el riesgo de desarrollar diversas enfermedades incluyendo enfisema pulmonar y cirrosis hepática. Está causado por una mutación en el gen que codifica API, el mayor inhibidor de proteinasa sérico (serpina) del cuerpo. Este gen está ubicado en el brazo largo del cromosoma 14 del genoma humano. La deficiencia genética puede dar lugar a una enfermedad hepática que pone en riesgo la vida de niños y adultos o dar lugar a enfermedades pulmonares en adultos. En su forma clásica, una mutación heredada del gen de API causa la formación de API anormal dentro de los hepatocitos del hígado. El hígado es la mayor fuente de API en circulación y este problema de transporte da lugar a bajos niveles de API en la sangre y los tejidos. Existen varias mutaciones del gen de API, la mayoría de las cuales están asociadas con la deficiencia de API en circulación. También se han identificado los genotipos que dan lugar a la producción de una proteína disfuncional como un inhibidor de elastasa y que causan un aumento en el riesgo de enfisema, pero que son liberados a la circulación en niveles normales. También se ha estimado que sólo en Estados Unidos hay aproximadamente 100.000 individuos gravemente deficientes y alrededor de 25 millones de portadores de al menos un gen deficiente de API, y se ha sugerido una cifra similar entre la población europea (Sandhaus 2004, supra). El modelo clásico de patogénesis de proteinasa del enfisema congénito estaba basado en un fallo del cuerpo a la hora de neutralizar la actividad enzimática relacionada con la elastasa, liberada desde los leucocitos polimorfonucleares atraídos a los alveolos durante las infecciones. Basándose en la naturaleza del factor desencadenante y en que la fisiología celular de API como un inhibidor de elastasa, se ha sugerido recientemente que API también funciona como un reactante de fase aguda.

30 **Fibrosis quística**

[0048] Según otra realización, el método de la presente invención se utiliza para tratar enfermedades pulmonares y desórdenes relacionados con la fibrosis quística.

35 [0049] El fallo en la membrana causado por la mutación CFTR da lugar a una inflamación e infección crónica pulmonar. Una infección respiratoria crónica leve provoca una respuesta persistente e inflamatorio en las vías respiratorias, dando lugar a una enfermedad obstructiva crónica. A medida que disminuyen las reservas pulmonares, los pacientes de FQ se vuelven proclives a episodios de exacerbación, caracterizada por un empeoramiento en los síntomas de la infección respiratoria, en particular, por *Pseudomonas aeruginosa*, acompañada de un de una disminución en la función pulmonar.

40 [0050] La pérdida de la función pulmonar es una causa principal de muerte en pacientes que padecen fibrosis quística. Los pacientes con Volumen Expiratorio Forzado en un segundo (VEF1) inferior al 30% de su valor pronosticado cuentan con índice de mortalidad en 2 años superior al 50%. El índice de mortalidad actual es de 1,2 decesos por 100 pacientes y año; la edad media de supervivencia está en los 32 años. De los fallecimientos cuyo caso fue especificado, el 94% se debió a insuficiencia cardiorespiratoria. Ésta se caracteriza por un aumento de disnea, hipoxemia y elevación del PCO<sub>2</sub> arterial. Durante su vida, los pacientes de FQ tienen restringidas sus actividades diarias debido a la reducción de la función pulmonar y a las continuas infecciones pulmonares como resultado de su condición.

45 [0051] Uno de los efectos secundarios más importantes de las infecciones crónicas asociadas con la FQ es la presencia crónica de neutrófilos fagocíticos en los pulmones en respuesta a las infecciones bacterianas y la liberación de varios quimioattractivos. Estos leucocitos secretan elastasa, que tiene el potencial de destruir el tejido elástico del pulmón. Además, se ha demostrado que los neutrófilos de pacientes con FQ se encuentran en un estado de receptividad creciente y tienden a desagregarse más rápidamente, liberando la elastasa que destruye tejidos. De este modo, los pacientes de FQ se encuentran en un estado de respuesta inflamatoria libre, lo que acaba con el equilibrio normal de proteasa (elastasa)/antiproteasa (API), dando lugar a la acumulación de elastasa en el pulmón y finalmente a daños en los tejidos.

50 [0052] Estudios anteriores han mostrado que gran parte del daño pulmonar en la FQ resulta de la presencia de elastasa no neutralizada y otras proteasas. El ciclo anormal se autoperpetúa de forma destructiva y se autoexpande: el aumento de elastasa da lugar a la inclusión de más neutrófilos en el pulmón que secretan proteasas adicionales. Este ciclo satura además el equilibrio normal habitual proteasa (elastasa)/antiproteasa dando lugar a la destrucción de la arquitectura pulmonar, una disfunción pulmonar severa y, en último lugar, la muerte. Se ha sugerido que el suplemento de API adicional puede reducir los efectos nocivos asociados con cantidades excesivas de elastasa.

5 [0053] Preferentemente, se administra API a pacientes de FQ mediante la inhalación. Se ha demostrado previamente (McElvaney et al, 1991) que la alfa-antitripsina aerosolizada administrada a pacientes de fibrosis quística suprimió la elastasa de neutrófilos en el fluido de revestimiento epitelial (ELF) respiratorio, restauró la capacidad de la elastasa anti-neutrófilos en el ELF y revertió el efecto inhibitor del ELF sobre la capacidad de los neutrófilos de combatir de forma eficaz las infecciones por Pseudomonas. Además, las composiciones en aerosol con API activo pueden producirse rápidamente utilizando el sistema de la presente invención.

### **Bronquiectasia**

10 [0054] La bronquiectasia es una dilatación anormal de los bronquios próximos de medio tamaño (>2mm de diámetro) causada por la destrucción de los componentes musculares y elásticos de las paredes bronquiales. Puede ser congénita o adquirida.

15 [0055] La bronquiectasia congénita suele afectar a bebés y niños y resulta de la parada en el desarrollo del árbol bronquial. Las formas adquiridas más comunes se dan en adultos y niños mayores y dan lugar a agresiones infecciosas, deficiencia en el drenaje, obstrucción de las vías respiratorias y/o fallo en la defensa inmune. Este último puede ir intercalado por citosinas inflamatorias, óxido nítrico y proteasas neutrofilicas. Además, el tejido alveolar peribronquial puede resultar dañado, dando lugar a fibrosis peribronquial difusa.

20 [0056] El resultado es una dilatación bronquial anormal con destrucción de la pared bronquial e inflamación transmural. La conclusión funcional más importante sobre la alteración de las vías respiratorias es que se afecta gravemente la liberación de secreciones del árbol bronquial.

### **Tuberculosis**

25 [0057] La tuberculosis (TB) ha vuelto a emerger recientemente como un problema de salud pública. La mayoría de personas infectadas con *Micobacterium tuberculosis* portan las bacterias sin síntomas pero muchos de ellas desarrollan la enfermedad TB activa. Cada año, 8 millones de personas desarrollan la TB activa en el mundo y 3 millones fallecen.

30 [0058] Los casos de TB descendieron rápidamente en las décadas de 1940 y 1950, cuando se introdujeron las primeras terapias antibióticas efectivas para TB. En 1985, el número de casos activos de TB en Estados Unidos empezó a subir de nuevo. En ello influyeron muchos aspectos, a menudo interrelacionados. Resurgir de TB. Por ejemplo, las personas con VIH/SIDA son particularmente vulnerables a la TB activa.

35 [0059] El problema de la resistencia multimedicamento de *M. tuberculosis* es otro factor en el resurgir de la enfermedad. La TB resistente a múltiples medicamentos (MDR-TB) es mucho más difícil de curar. El tratamiento de MDR-TB suele requerir el uso de medicamentos especiales para TB que pueden producir graves efectos secundarios. Para curar la MDR-TB, los pacientes han de tomar varios antibióticos, al menos tres, a los que responderá la bacteria, cada día durante unos dos años. No obstante, a pesar de este tratamiento, el 40% de pacientes de MDR-TB fallecerá, que viene a ser lo mismo que para pacientes con TB estándar que no reciban tratamiento. Estos pacientes precisan una terapia paliativa.

### **Preparación de API**

45 [0060] Según un aspecto de la presente invención, se ofrece una composición estable purificada de API. Preferentemente, se ofrece una composición líquida purificada y estable de API. La solicitud internacional WO 2005/027821, para uno de los solicitantes de la presente invención, aporta composiciones farmacéuticas consistentes en API purificado, estable y activo en forma de una solución estéril lista para usarse. Esa solicitud internacional también aporta un proceso, que combina la eliminación de sustancias contaminantes (p.ej., lípidos, lipoproteínas y otras proteínas) y la separación del API activo del inactivo mediante etapas de cromatografía secuencial. El proceso reveló que la invención es conveniente para producción de API a gran escala.

50 [0061] La mezcla de proteínas de la que se purifica el API es, preferentemente, una pasta de la fracción IV-1 de Cohn, pero puede incluir otras fracciones de Cohn, de forma separada o en combinación; plasma sanguíneo humano, fracciones de plasma o cualquier preparación de proteína que contenga API. Por ejemplo, se puede aplicar el proceso a la purificación de API recombinante humano desde la leche de animales transgénicos.

55 [0062] En esa solicitud, la mezcla de proteínas consistentes en API se dispersa en un medio acuoso, preferiblemente agua, en una proporción de entre 20 a 35 litros por 1kg de fuente material, preferiblemente pasta a base de fracción IV-1 de Cohn. El pH de la dispersión se ajusta a un pH entre 8,0 hasta casi 9,5. El ajuste del pH estabiliza el API y promueve la disolución del API en la dispersión, incrementando así el rendimiento de la producción. La dispersión puede tener lugar a temperatura elevada, entre 30°C y 40°C, para aumentar la solubilidad del API.

60

65

- 5 [0063] Una ventaja particular de ese proceso consiste en la eliminación de contaminantes o subproductos que, de otro modo, comprometen la eficacia de los procesos de purificación de API. En particular, las preparaciones de pasta de fracción IV-1 de Cohn contienen una cantidad significativa de lipoproteína Apo A-1, que posee el efecto de comprometer la columna de flujo y la capacidad durante la purificación. Otra proteína no deseada como la albúmina y la transferrina también se encuentran presentes en la preparación de la pasta. Eliminar una porción de esos contaminantes según la invención revelada en WO 2005/027821 se realiza en dos pasos: (a) quitar los lípidos y las lipoproteínas contaminantes mediante un agente de eliminación de lípidos y (b) precipitar una porción de la proteína contaminante de la dispersión acuosa que contiene el API. La eliminación de las proteínas contaminantes, sin pérdida de API, posibilita una reducción significativa a escala de equipo, p. ej., tamaño de columna.
- 10 [0064] El precipitado que forma puede separarse por medios convencionales como el centrifugado o el filtrado, y luego se descarta. El supernatante está preparado para la purificación, por ejemplo, una resina de intercambio aniónico. El API se eluye de la columna. Se trata la solución para reducir su contenido de agua y cambiar la composición iónica por medios convencionales, como la diafiltración, ultrafiltración, liofilización, etc., o alguna combinación de ellas.
- 15 [0065] Según una realización, el residuo con contenido de API obtenido tras la primera cromatografía de intercambio aniónico se concentra mediante ultrafiltración. La fracción retenida es diafiltrada contra el agua pura para lograr conductividad de entre el 3,5 al 4,5 mS/cm.
- 20 [0066] Para purificar la solución que contiene API obtenida tras la primera cromatografía de intercambio aniónico, se carga la solución en una resina de intercambio de catión con el mismo tipo de búfer utilizado en el paso del intercambio aniónico, con un pH y conductividad apropiados para permitir que el API pase y se lave a través del flujo del búfer, a la vez que las sustancias contaminantes se retienen en la resina de intercambio catiónico.
- 25 [0067] La solución obtenida que contiene API tras la cromatografía de intercambio catiónico puede tratarse para reducir su contenido de agua. Según una realización, la solución se concentra por ultrafiltración.
- 30 [0068] También se utiliza la cromatografía de intercambio iónico para separar el API activo del API inactivo. La invención implica otros métodos para separar el API activo de otras sustancias contaminantes, incluyendo compuestos de disolvente/detergente utilizados para la inactivación vírica. Esa preparación se logra mediante la segunda cromatografía de intercambio aniónico. El API eluido de la segunda cromatografía de intercambio aniónico no sólo es altamente activo, sino también altamente puro.
- 35 [0069] A lo largo del proceso de esa invención, sólo se utiliza un tipo de búfer, con ajuste de pH y conductividad según se requiere en los distintos pasos del proceso. Los términos "un tipo", "mismo tipo" o "tipo individual" de búfer se utilizan indistintamente, y hacen referencia a un búfer con una especie aniónica específica.
- 40 [0070] Según una realización, el búfer es cualquier combinación de ácido/sal apropiada que suministra capacidad de búfer aceptable en la serie de pH requerido a lo largo del proceso de purificación de API. Preferentemente, el búfer utilizado en el proceso es un búfer sin base de citrato, y más preferentemente, el anión del búfer es acetato.
- 45 [0071] Según una realización, el proceso de esa invención comprende además pasos de eliminación vírica y/o inactivación vírica. Los métodos para la eliminación e inactivación víricas son bien conocidos.
- 50 [0072] Un método para la eliminación vírica es la filtración, preferiblemente la nanofiltración, que elimina tanto los virus encapsulados como los no encapsulados. Según una realización, el paso de eliminación vírica conlleva la filtración. Según otra realización, el paso de eliminación del virus se realiza después de la cromatografía de intercambio de catión. Por lo general, la solución de canalización del intercambio catiónico que contiene API se concentra y luego se nanofiltrar.
- 55 [0073] Según una realización, el método de inactivación vírica empleado conlleva un tratamiento con disolvente/detergente (S/D). Es preferible realizar el paso de inactivación vírica antes de cargar la solución en la segunda resina de intercambio aniónico. Según una realización, el detergente utilizado es polisorbato y el disolvente es Tri-n-butil fosfato (TnBP). Según otra realización, el polisorbato es polisorbato 80. Según una realización, al polisorbato 80 puede añadirse entre el 0,8% y el 1,3% de volumen por peso (v/p) de la mezcla resultante y al TnBP puede añadirse entre el 0,2% y el 0,4% de peso por volumen de la mezcla resultante.
- 60 [0074] La solución que contiene el API activo y purificado, obtenida tras la segunda cromatografía de intercambio aniónico puede procesarse nuevamente para obtener una composición farmacéutica para uso terapéutico, diagnóstico, etc. Para preparar el producto para administración terapéutica, el proceso implica los pasos de cambiar la composición iónica de la solución que contiene el API activo y purificado para contener un ión compatible fisiológicamente y esterilizar la solución resultante. El API purificado obtenido por el proceso de esa invención es altamente estable.

[0075] La composición farmacéutica revelada en WO 2005/0278 y utilizada con el sistema y métodos de la presente invención lleva al menos un 90% de API puro, generalmente un 95%, y más aún un 99%. Al menos el 90% del API se encuentra en su forma activa.

## 5 **Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento**

10 [0076] El término "composición farmacéutica" no se utiliza aquí en su sentido más amplio para incluir preparaciones que contienen una composición de proteína según se utiliza esta invención para objetivos terapéuticos. La composición farmacéutica para usos terapéuticos debe contener una cantidad de API terapéutica, p.ej., la cantidad necesaria para medidas sanitarias preventivas o curativas.

15 [0077] Según se utiliza aquí, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" hace referencia a una cantidad de proteína o formulación o composición proteínica que es efectiva para tratar una condición en un organismo vivo al que se le administra durante algún periodo de tiempo.

[0078] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden facturarse mediante procesos bien conocidos, p. ej., procesos de mezclado, disolución, granulación, molido, pulverización, grageado, emulsionado o liofilizado.

20 [0079] Las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención pueden formularse de modo convencional utilizando uno o más diluentes o portadores aceptables que constan de excipientes y auxiliares, que facilitan el procesado de los compuestos activos en las preparaciones, que pueden usarse farmacológicamente. Una formulación adecuada depende de la vía de administración elegida. Según algunas realizaciones elegidas actualmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención están formuladas en una forma adecuada para su inhalación.

30 [0080] Las composiciones farmacéuticas con contenido de API desveladas en WO 2005/027821 a uno de los solicitantes de la presente invención posee ciertas ventajas sobre preparaciones con contenido de API hasta la fecha, ya que el API es altamente estable también cuando la composición se mantiene en forma líquida. Por tanto, no es necesario liofilizar la preparación de API para un almacenamiento estable en forma de polvo. Por consiguiente, no es necesario restablecer el polvo a un líquido antes de su uso para administración parental o para inhalación. Según ciertas realizaciones, la composición farmacéutica líquida lista para usarse se emplea con el sistema de la presente invención. La composición farmacéutica líquida puede embalarse en viales de dosis unitarios esterilizados con 0,25-10ml hechos de vidrio o materiales poliméricos o rellenos en viales de polietileno o cualquier material polímero adecuado fabricados, por ejemplo, mediante un proceso Blow-Fill-Seal, utilizado generalmente para soluciones de inhalación listas para usarse, con contenidos de volumen que van de los 0,25 a los 5ml.

40 [0081] Según se describe aquí, API se utiliza para el tratamiento de enfermedades pulmonares. Cuando se administra por vía intravenosa, la mayoría del API nunca llega al pulmón. Se ha estimado que sólo el 2% de la dosis administrada por vía intravenosa llega al pulmón (Hubbard & Crystal, 1990).

45 [0082] Por tanto, la administración de API por inhalación puede ser más beneficiosa ya que llega directamente al tracto respiratorio inferior. La presente invención revela ahora que la inhalación requiere dosis terapéuticas inferiores de API y, de ese modo, el escaso suministro de API derivado de plasma humano estaría disponible para el tratamiento de más pacientes. Esta vía de administración también puede resultar más efectiva a la hora de neutralizar la elastasa de neutrófilos, y así, el sistema y métodos de la presente invención son muy adecuados para el tratamiento de enfermedades pulmonares en periodos de exacerbación. Además, la administración por inhalación es más simple y menos estresante para el paciente que la vía intravenosa, y reduciría la carga del sistema sanitario local (al requerir menos aporte clínico).

50 [0083] Las formulaciones de composiciones farmacéuticas para la administración por vía de inhalación son bien conocidas en este campo. En general, para la administración por inhalación, los ingredientes activos se liberan en forma de pulverizador desde un inhalador de dosis presurizada y medida con la utilización de un propelente adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono, en polvo administrado utilizando un inhalador de polvo seco o en forma de líquido acuoso empleando un nebulizador. Los nebulizadores para la administración de aerosol líquido se pueden categorizar en nebulizadores de chorro que funcionan con un flujo de aire presurizado que utiliza un compresor portátil o un suministro de aire central en un hospital, nebulizadores ultrasónicos que incorporan un piezocristal para aportar la energía que genera la salida del aerosol de la fuente ultrasónica, y los novedosos nebulizadores electrónicos, basados en el principio de una membrana vibratoria perforada, como el nebulizador eFlow®. Todos los principios de nebulización implican que la solución acuosa se exponga a esfuerzos de corte, que pueden afectar negativamente a la delicada naturaleza de proteínas como API. No obstante, la presente invención revela ahora que el principio de membrana vibratoria incorporado en el nebulizador eFlow® puede retener la integridad de la estructura proteínica de API y, de ese modo, se adapta mejor a la administración pulmonar de API.

65

5 [0084] Sorprendentemente, la presente invención revela ahora que utilizar el nebulizador eFlow® para aerosolizar la formulación de API altamente purificado y estable (80 mg/4ml), aproximadamente el 70% de la dosis nominal cargada puede administrarse a través de la boquilla basada en un patrón de respiración sinusoidal simulado (inhala: exhala = 1:1), aplicando 15 respiraciones/min y un volumen tidal de 500ml. Alrededor del 60% de la dosis nebulizada se disuelve en gotículas de 5 µm o menos, lo que indica que esas gotículas pueden depositarse en los pulmones. La eficacia global del sistema de la presente invención es superior a los sistemas de inhalación conocidos hasta la fecha, como por ejemplo, el sistema de gestión de inhalación "Akita", asociado con un nebulizador PARI LC STAR. En oposición a los sistemas actuales propuestos, el residuo de medicamento es sólo el 15% o menos, donde en un nebulizador de chorro como el LC STAR utilizado en combinación con Akita, el residuo es al menos el 40% o más de la dosis cargada, dando lugar a una dosis liberada inferior en gotículas de 5 µm o menos en comparación con el sistema de la presente invención. Esta característica novedosa permite una administración del medicamento más eficaz y económica cuando se utiliza eFlow® en combinación con API.

15 [0085] Las condiciones de funcionamiento para la administración de una dosis de inhalación adecuada varía según el tipo de dispositivo empleado. Para algunos sistemas de administración en aerosol, como los nebulizadores, la frecuencia de administración y período de funcionamiento puede dictarse principalmente por la cantidad de composición activa (API según la presente invención) por volumen de unidad en el aerosol. Por lo general, cuanto más alta es la concentración de la proteína en la solución del nebulizador, más corto es el período de funcionamiento. Algunos dispositivos como los inhaladores de dosis medidas pueden producir mayores concentraciones de aerosol que otros, por lo que podrán funcionar en períodos más cortos para ofrecer el resultado esperado. La presente invención desvela ahora que administrar la composición con menos del 10%, preferiblemente menos del 5%, de API altamente purificado y estable, nebulizado en el nebulizador eFlow® es altamente eficaz y efectiva en el tratamiento de enfermedades pulmonares.

25 [0086] Según una realización, el sistema y/o método de la presente invención se utiliza para tratar el enfisema pulmonar. Se sabe que los pacientes con deficiencia de API tienen un bajo nivel de API y una alta carga de neutrófilos en sus tractos respiratorios inferiores. Esta observación apoya la hipótesis de que una deficiencia de API predispone al paciente al enfisema por la alteración del equilibrio entre la elastasa de neutrófilos y la elastasa anti-neutrófilos en el tracto respiratorio inferior. Mientras que las personas normales tienen una pantalla de elastasa anti-neutrófilos adecuada para proteger el tracto respiratorio inferior, las personas con deficiencia de API no cuentan con ella, permitiendo que la elastasa de neutrófilos destruya el tejido pulmonar. De este modo, aportándole al paciente API exógeno en la dosis y ubicación adecuada para su deficiencia de API endógena, podrá superar los efectos perjudiciales de esa deficiencia.

35 [0087] Los principios de la invención pueden entenderse mejor con referencia a los ejemplos no excluyentes siguientes:

#### EJEMPLOS

40 [0088] Abreviaturas: Se utilizarán las siguientes abreviaturas.

ACI: Impactador en cascada Andersen

45 Pérdida de aerosol: cantidad de medicamento hallado en los filtros expiratorios en un experimento de simulación de respiración (mg o %), p. ej., pérdidas de medicamento al entorno.

API: Inhibidor de proteasa alfa-1

50 Residuo de medicamento: Masa de medicamento (mg) retenida en el nebulizador después de la nebulización.

DEG: Desviación estándar geométrica, medida de la distribución del tamaño de gotícula.

55 DMM: Diámetro medio de masa, calculado desde la distribución del tamaño de gotícula determinado por medidas de difracción láser (µm).

DAMM: Diámetro aerodinámico medio de masa, calculado desde la distribución de tamaño de gotícula determinado por las medidas de impacto de cascada (µm).

60 ING: Impactador farmacéutico de nueva generación.

RF: Fracción respirable, porcentaje de masa de aerosol con tamaño de gotículas ≤5µm.

h.r.: Humedad relativa.

65 **Ejemplo 1: Absorción de API de solución de API nebulizada con nebulizador eFlow®**

**Introducción**

5 **[0089]** El estudio descrito aquí examinó las características de nebulización de la solución de inhibidor de proteasa alfa-1 (API) cuando fue nebulizado con el nebulizador electrónico eFlow® (PARI GmbH, Alemania, una empresa especializada en administración nasal y pulmonar de medicamentos).

10 **[0090]** La serie de experimentos se llevaron a cabo utilizando una formulación líquida del inhibidor de proteinasa alfa-1 (API), también disponible para inyección (Kamada Ltd, Israel). El inhalador electrónico eFlow® utilizado es un sistema de nebulizador electrónico basado en un principio de membrana vibratoria, según muestra la solicitud de patente internacional WO 01/34232. eFlow® está diseñado para mejorar la eficacia en la administración y la utilización del medicamento aerosolizado. Esto se logra mediante una tecnología de membrana vibratoria que genera un aerosol con una distribución de tamaño de gotícula muy estrecho, expresado por una pequeña DEG en comparación con nebulizadores a chorro (1,7 contra 2,1) (Balcke, et al., 2004). La configuración única del nebulizador eFlow® da lugar a una reducción en el porcentaje de gotículas gruesas y aumento del porcentaje de muchas gotículas finas, y de este modo facilita una mejor dirección del ingrediente farmacéutico activo, particularmente API, al pulmón. Esto resulta especialmente importante para medicamentos caros de disponibilidad limitada, como el inhibidor de proteasa alfa-1.

20 **[0091]** Este estudio está diseñado para responder a las cuestiones:

1. ¿La nebulización del eFlow® retiene la actividad de la proteína API?
2. ¿Qué cantidad de API se transporta en gotículas menores de 5 µm (dosis respirable in vitro)?
3. ¿Puede lograrse un tamaño de gotícula deseado de 2,5-3,5 µm?
- 25 4. ¿Qué cantidad de API alcanza la boca de un paciente cuando se le administra una dosis de 80mg/4ml?
5. ¿Cuánto tiempo hace falta para cada sesión de nebulización?

30 **[0092]** El funcionamiento de la administración de los nebulizadores depende del patrón de flujo de aire de la respiración normal de un paciente; por tanto, se utilizó un simulador de respiración para determinar la dosis de medicamento administrada y el tiempo requerido para nebulizar toda la cantidad de composición de medicamento, en particular, una composición líquida de medicamento. Se examinó una maniobra de respiración estandarizada para determinar la dosis administrada, el residuo de medicamento en el dispositivo y la pérdida de aerosol durante la exhalación (recogida en los filtros de "exhalación" para asegurar la recuperación de la cantidad de medicamento). Se llevó a cabo un ensayo utilizando un patrón de respiración con inhalación reducida y un tiempo de exhalación prolongado, que imita el patrón de respiración de un paciente con enfisema.

**Materiales****[0093]**

40 Nebulizadores electrónicos eFlow® (PARI, Cabeal núm. 42008, 42012 y 42013)

Unidades de control (PARI, Núm. Serie DBHSAB0043, DBH5AB0029 y DBH5AB0067)

45 Solución de API 2% (Kamada, Lote A y Lote B)

Almohadillas de filtrado (PARI, 041B0523) y cajas de filtro con válvula de exhalación para filtros expiratorios (PARI)

50 Simulador de respiración (PARI, consistente en Controlador Movtec 1ª MSK, N/S 97442-2 y bomba de desplazamiento positivo N/S 230501 0500 con software PARI COMPAS v. 1.0)

Impactador en cascada Andersen (Copley Scientific, N/S 3429)

Impactador farmacéutico de nueva generación (Copley Scientific, ING-0169)

55 Paquete de software para análisis de impactador: CITDAS (Copley Scientific, Ver. 2,00)

Búfer de extracción: se preparó el búfer de extracción mediante la disolución de 0,57g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O y 1,46 NaCl en agua "Milli-Q" y ajustar el pH a 6,9 a 7,7. El volumen de solución se completó con agua "Milli-Q" para un volumen final de 500ml.

**Métodos****Contenido de API y actividad**

65 **[0094]** Para examinar el contenido del medicamento de API en las formulaciones y testar las muestras obtenidas de la simulación de respiración y las medidas de impactación en cascada se recogieron muestras de las almohadillas

de filtrado. Éstas se extrajeron con búfer fosfato y el API extraído fue analizado para conocer todo su contenido proteínico, la actividad de API y el contenido de monómeros de API. Se determinó la actividad de API midiendo el alcance de la inhibición de la actividad proteolítica de la elastasa pancreática porcina en el sustrato succinil-alanina-alanina-alanina-p-nitroanilida. El grado de inhibición de la actividad proteolítica inducido por API se obtiene al calcular el ratio del índice de reacción con la elastasa pancreática porcina no inhibida (sin API en el medio de reacción) para el índice de reacción en presencia de API. La actividad se expresa en mg de API/ml. Se examinó la presencia de dímeros/oligómeros mediante la exclusión por tamaño HPLC, realizada con Zorbax GF-250 Columna GPC.

10 **Distribución del tamaño de las gotículas del aerosol**

15 [0095] A. La evaluación de la distribución de tamaño de gotícula geométrica por difracción láser (Malvern MasterSizerX): se conectó el nebulizador eFlow® a través de una cámara de acoplamiento que permite la entrada de aire acondicionado a través del nebulizador. Las condiciones del test (T=23 ±1°C, r.h. = 50±5%, índice de flujo=20L/min) se controlaron y monitorizaron. Se calculó una distribución del tamaño de gotícula a partir de 5 intervalos de medida individuales de 2000 barridos cada 10 segundos. La evaluación de los datos de la difracción láser se llevó a cabo según la Teoría de Mie, eligiendo el modelo de presentación 2QAA suministrado con el software Malvern.

20 [0096] B. Se investigó la distribución de tamaño de gotícula aerodinámica mediante métodos con impactador en cascada. Se emplearon dos métodos distintos. El Impactador en cascada Andersen (ACI) es un tipo de impactador tradicional, que se ha utilizado para caracterizar una amplia gama de diversos aerosoles. El impactador farmacéutico de nueva generación (ING) es un nuevo tipo de impactador, que ha sido diseñado especialmente para la caracterización de aerosoles farmacéuticos (Marple, et al., 2003a, 2003b, 2004) y ha sido presentado recientemente en la Farmacopea Europea.

25 [0097] Se prepararon dos muestras de control (API no aerosolizado) para rellenar con unos 0,5g de API tubos de polipropileno (PP) y ajustar el peso con el búfer de extracción a unos 13g. Todas las muestras se almacenaron a temperaturas de entre 2°C hasta 8°C hasta el análisis.

30 [0098] Las muestras se analizaron utilizando el ensayo de actividad con API antes descrito y evaluado con respecto al patrón de distribución de tamaño de gotícula, diámetro aerodinámico medio de masa, desviación estándar geométrica y fracción respirable (<5µm) utilizando el pack de software CITDAS.

35 **Determinación de la dosis de API administrado mediante la simulación de respiración**

40 [0099] Se utilizó un aparato de simulación de respiración para describir el funcionamiento de la administración del medicamento del sistema API/eFlow® en condiciones de respiración simulada. Se cargó el nebulizador con una dosis de 80mg/4ml y se conectó al simulador de respiración, que genera el patrón de respiración humana deseado.

45 [0100] Las pruebas se realizaron según el siguiente protocolo: el nebulizador se conectó a una bomba de desplazamiento positivo (simulador de respiración PARI) imitando el patrón de respiración estándar de un adulto (500ml de volumen tidal, 15 respiraciones/minuto, índice de inhalación:exhalación 1:1, patrón S, Tabla 1). De forma alternativa se emplearon dos patrones modificados, que se utilizan como modelos para patrones de respiración afectada o pacientes de enfisema (E1 y E2, Tabla 1).

50 [0101] Se instalaron filtros que recogen el aerosol inhalado y exhalado (filtros de "inhalación" y "exhalación", respectivamente) entre el nebulizador y la bomba a través de una pieza en forma de Y. El nebulizador se rellenó con 4ml de formulación de API para inhalación y funcionó hasta que toda la solución fue nebulizada (período de nebulización). Se interrumpió la nebulización a intervalos de 3 minutos para cambiar los filtros saturados. El aerosol (que contenía el API como sustancia farmacológica) se recogió en los filtros.

55 [0102] Las medidas de API depositado en los filtros durante el curso de la nebulización se utilizaron para calcular la dosis de API administrado, que es la cantidad de aerosol que inhalaría el paciente a través de la boquilla, además de la cantidad de API aerosolizado perdido durante la exhalación.

**Tabla 1. Patrones de respiración utilizados para experimentos de simulación de respiración**

	S	E1	E2
Volumen tidal (ml)	500	450	425
Inhalación(es)	2,0	1,0	0,9
Exhalación(es)	2,0	2,5	3,0

[0103] Se cambiaron los filtros de inhalación tras 3 y 6 minutos y después del fin de la nebulización. Se extrajeron las proteínas de los filtros mediante la colocación de los filtros en un probetas de polipropileno (PP) y se añadieron 30g de búfer de extracción. Se agitaron las probetas a 250rpm durante 30 min., y la solución se separó de los filtros mediante la decantación en otras probetas PP. La cantidad de API restante como residuo dentro del nebulizador se midió enjuagando el nebulizador con 15g de búfer de extracción.

[104] El valor de la dosis respirable in vitro se basa en la dosis administrada teniendo en cuenta la fracción de gotículas que se encuentran en la gama de tamaño respirable, p.ej., en la gama de <5µm. La dosis respirable in vitro se calculó multiplicando la dosis administrada y la fracción respirable determinada durante la descripción del tamaño de gotículas del aerosol.

## **Resultados y discusión**

### **Actividad del API tras la nebulización**

[105] Se investigaron dos lotes distintos de formulación de API. La Tabla 2 resume las descripciones de API antes (del control) y después de (la prueba de) nebulización.

**Tabla 2. Descripción del API tras la nebulización de dos lotes distintos**

	Lote A		Lote B	
	Control	Test	Control	Test
Actividad específica (%)	0,97	0,87	1,09	1,03
Monómero (%)	94,3	96,4	98,3	98,0
Dímero + Oligómero (%)	5,6	3,6	1,5	1,8
Agregados (%)	0,1	0,0	0,0	0,0

[0106] Los resultados de los tests sobre la actividad de API muestran que se retuvo el 90,0% de la actividad específica de API en el lote A y el 94,5% de la actividad específica en el lote B. No hubo aumento en la cantidad de dímeros y oligómeros ni formación de agregados.

### **Tests de simulación de respiración**

[0107] Se llevaron a cabo experimentos de simulación de respiración realizados con API utilizando inhaladores electrónicos eFlow®. Cada dispositivo fue testado por duplicado (n=6). Se empleó un volumen de relleno de 4,0ml con una cantidad nominal de 80mg de API. La simulación de respiración muestra que la dosis cargada distribuida durante la inhalación, p.ej., cuánto API se administra al paciente a través de la boquilla, cuánto se pierde durante la exhalación y cuánto se queda en el nebulizador. Los resultados de la distribución de medicamento se resumen en la Tabla 3. Los datos muestran los mg de API activo según determina el ensaño de actividad antes descrito. La tabla también incluye el período de nebulización además de las cantidades relativas de API en porcentaje de la dosis cargada total. El perfil de administración del medicamento muestra una distribución lineal en el tiempo y un tiempo medio de nebulización de 9 ±0,1 min (Figura 1).

**Tabla 3. Datos de distribución de API determinados por la simulación de respiración (n=6)**

	API (actividad)	
	medio	±SD
Dosis administrada (mg)	65,3	3,2
Residuo de medicamento (mg)	14,4	3,6
Pérdida de aerosol (mg)	13,9	2,5
Período de nebulización (min)	9,0	1,0
Dosis administrada(%)	70,0	3,2
Residuo de medicamento (%)	15,4	3,9
Pérdida de aerosol (%)	14,9	2,6

[0108] Para testar si la dosis administrada resulta afectada por el patrón de respiración, se realizaron experimentos adicionales utilizando patrones de respiración diseñados para representar un paciente cuya respiración está afectada por enfisema, patrones E1 y E2 (véase tabla 1). Se realizaron estos tests por duplicado para cada patrón. Los resultados se resumen en la Tabla 4, donde el patrón E1 se utilizó para el ensayo 1 y 2, y el patrón E2 para el 3 y el 4.

**Tabla 4: Datos de distribución de API tras la nebulización con patrón de respiración enfisematoso**

	API (actividad)					
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 3	Promedio	±SD
Dosis administrada (mg)	48,2	46,5	47,1	47,0	47,2	0,6
Residuo de medicamento (mg)	13,2	12,7	15,2	16,9	14,5	1,7
Pérdida de aerosol (mg)	16,2	17,2	12,1	0,0*	11,4	6,8
Período de nebulización (min)	10,1	10,2	7,9	7,9	9,0	1,1
Dosis administrada (%)	57,1	55,2	55,9	55,5	55,9	0,7
Residuo de medicamento (%)	15,6	15,1	18,1	19,9	17,2	1,9
Pérdida de aerosol (%)	19,1	20,4	14,3	0,0 <sup>†</sup>	13,5	8,1

• No se detectó API en el filtro: considerado debido a un error durante la extracción del filtro.

[0109] Los experimentos adicionales muestran valores de dosis administradas que van del 55% al 57% de la dosis cargada. Parece no haber diferencia en los valores de dosis administrada entre los dos patrones. Por tanto, los valores medios se calcularon a partir de todos los ensayos. Las series de simulaciones de respiración muestran que alrededor del 70% de la dosis cargada puede administrarse a través de la boquilla del nebulizador con un patrón de respiración que refleja un paciente con respiración normal y alrededor del 56% puede aún administrarse para un patrón de respiración gravemente afectado.

#### Distribución del tamaño de gotícula

[0110] Los perfiles de distribución del tamaño de gotícula para el API nebulizado mediante el eFlow® se evaluaron mediante dos métodos de impactación en cascada distintos y mediante difracción láser según se describe aquí: todos los tests de impactación se realizaron con 4ml de solución de API (20mg/ml) nebulizado por tres dispositivos eFlow®, cada uno por duplicado (n=6).

#### Impactación en cascada Andersen (ACI)

[0111] La distribución del tamaño de gotícula aerodinámica se analizó utilizando un impactador en cascada Andersen (ACI) ajustado con un USP-garganta (Copley Scientific Instruments, Nottingham, Reino Unido). Se equilibró el ACI a 18°C utilizando un baño de agua. Las condiciones ambientales se controlaron a 23°C y 50% de humedad relativa. El nebulizador se rellenó con 4ml de formulación y conectado al USP-garganta. El índice de flujo de aire a través del nebulizador y el impactador se estableció en 28,3L/min. El nebulizador se utilizó hasta que la nebulización se completó. Entonces se desmontó el ACI, se enjuagaron las bandejas y el USP-garganta con 10ml de búfer fosfato. El contenido de medicamento se analizó para cada etapa del impactador y del USP-garganta de forma separada. El diámetro aerodinámico medio de masa (DAMM) se calculó según los métodos USP, utilizando el pack de software CILDAS (Copley Scientific Instruments, Nottingham, Reino Unido).

[0112] El impactador se utilizó con su índice de flujo de calibración de 28,3L/min a 22°C±2°C y a 50%±5% de humedad relativa (h.r.) según una configuración de test publicada (Keller et al., 2002; Jaurnig, et al., 2004). Se extrajeron las proteínas de las bandejas de API con 10ml de búfer de extracción durante 30min. La entrada de ACI se enjuagó con 10g y el nebulizador con 15g de búfer de extracción (se registró el peso). La distribución del tamaño de gotícula tras la nebulización de 80mg/4ml de API mediante tres dispositivos eFlow® (cada uno por duplicado, n=6) quedan resumidos en la tabla 5.

**Tabla 5: Distribución del tamaño de gotícula tras nebulización de 80mg/4ml de API con ACI**

	Depósito (mg)						Promedio [mg]
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	
ACI 28,3L/min 22°C, 50% h.r.							
Puerto de inducción ACI (garganta artificial)	0,1	0	0	0	0	0	0,0
Etapas 0 (<10,0 µm)	0,7	0,8	0,5	0,5	0,8	0,4	0,6
Etapas 1 (<9,0 µm)	2,9	2,6	1,4	2,4	3,1	1,5	2,3
Etapas 2 (<5,8 µm)	5,3	5,7	4,5	6,8	6,2	4,6	5,5
Etapas 3 (<4,7 µm)	23,6	27	25,7	25	22,4	25,4	24,9
Etapas 4 (<3,30 µm)	22,4	25,4	31,8	23,5	21,9	31,6	26,1
Etapas 5 (<2,10 µm)	4,6	7,2	7	4,1	8,2	6,7	6,3
Etapas 0 (<1,10 µm)	0,3	0,4	0,3	0,2	0,5	0,4	0,4
Etapas 0 (<0,65 µm)	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0	0,1
Filtro (<0,43 µm)	0	0	0	0	0	0	0,0

[0113] Se hace patente tras los datos de ACI de la tabla superior que el momento balístico del aerosol es desdeñable, ya que no se pierde medicamento en el puerto de inducción-ACI, que actúa como una garganta artificial. La mayor parte del medicamento (alrededor de 5,77 mg o el 72,1%) de la dosis normal se encuentra contenida en gotículas de 1,1-4,7 µm permitiendo un buen depósito en la profundidad de los pulmones de API en la periferia pulmonar, que es la localización objetivo para que la actividad de API aporte un efecto terapéutico óptimo.

**Impactador de nueva generación (ING)**

[0114] Se analizó la distribución de tamaño de gotícula aerodinámica utilizando un Impactador de Nueva Generación (ING) ajustado con una USP-garganta (Copley Scientific Instruments, Nottingham, Reino Unido). Se rellenó el eFlow® con 4ml de formulación de API y conectado al USP-garganta. Se utilizó el nebulizador hasta que se completó la nebulización, y luego se desmontó el ING. Se analizaron por separado el contenido de API para cada etapa del impactador y el USP-garganta. El diámetro aerodinámico medio de masa (DAMM) se calculó según los métodos de la Farmacopea de Estados Unidos, utilizando el paquete de software CITDAS (Copley Scientific Instruments, Nottingham, Reino Unido).

[0115] Se utilizó el ING a un flujo de 15± 0,5 l/min a 22°C ±2°C y con el 50%± 5% de humedad relativa (h.r.). Las tazas de ING se pesaron antes y después de la carga. Se extrajo el API en cada etapa individual con 10ml de búfer de extracción durante 30 min. Se enjuagó la entrada de ING con 20g y el nebulizador con 15g de búfer de extracción (se registró el peso). La distribución del tamaño de gotícula tras la nebulización de 80mg/4ml de API en tres dispositivos Flow (cada uno por duplicado, n=6) quedan resumidos en la tabla 6.

**Tabla 6: Nebulización de 80mg/ 4ml de API con ING**

ING 15L/min 22°C, 50% h.r.	Depósito (mg)						Promedio
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	[mg]
Puerto de inducción	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
Etapa 1 (<14,1 µm)	1,2	1	1	1,1	1,1	0,9	1,1
Etapa 2 (<8,61 µm)	1	1	8	1,1	0,8	0,8	2,1
Etapa 3 (<5,36 µm)	5,4	5,2	3,5	6	4,2	3,4	4,6
Etapa 4 (<3,30 µm)	24,4	21,7	20,5	24,5	23,4	19,4	22,3
Etapa 5 (<2,08 µm)	31,3	27,5	34,6	28,5	34,7	37,1	32,3
Etapa 6 (<1,36 µm)	5,9	5,8	7,6	8,2	7,7	8,8	7,3
Etapa 7 (<0,98 µm)	0,2	0,6	0,7	0,8	0,9	0,8	0,5
MOC (<0,37 µm)	0,2	0,5	0,5	0,6	0,5	0,7	0,5

[0116] Resulta patente tras los datos del ING, que el momento balístico del aerosol es desdeñable, puesto que sólo 0,2 mg (p.ej., 0,25%) de la dosis nominal se pierde y capturada en el puerto de inducción-ING que actúa como una garganta natural. La mayor parte del medicamento (alrededor de 61,9mg o el 77,4%) de la dosis nominal está contenida en gotículas de alrededor de 1,36-3,3µm. Estos resultados apoyan los resultados obtenidos con los impactadores en cascada, mostrando que administrar API mediante inhalación utilizando el nebulizador eFlow® resulta altamente efectivo para dirigir el API a los alveolos pulmonares, donde más se precisa su actividad.

**Difracción láser**

[0117] La distribución de tamaño de gotícula geométrica se describió mediante un difractómetro Mastersizer X (Malvern Instruments, Herrenberg, Alemania). Se controlaron las condiciones ambientales a 23°C y un 50% de humedad relativa. El índice de flujo de aire a través del nebulizador y el difractómetro se estableció en 20l/min. El diámetro medio de masa (DMM) se calculó según la teoría de Mie seleccionando el modelo de presentación 2QAA suministrado con el software Malvern.

[0118] La Tabla 7 muestra una comparación de los parámetros de distribución de tamaño tras la nebulización de API derivado por difracción láser o impactación en cascada con impactadores ING y ACI.

**Tabla 7: Parámetros de distribución de tamaño de gotícula tras nebulización de API derivado por difracción láser o impactación en cascada con impactadores ING y ACI (n=6)**

	Difracción láser		ING		ACI	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
DMM/DAMM (µm)	3,1	0,1	3,1	0,1	3,3	0,1
DEG	1,5	0,0	1,5	0,1	1,4	0,1
RF (5µm) (%)	87,9	2,2	87,4	2,7	90,3	2,6

[0119] Según resulta de la Tabla 7, los resultados obtenidos por la difracción láser, ING y ACI son similares. La descripción de la distribución del tamaño de gotículas del aerosol a través de tres métodos distintos muestra un tamaño de diámetro medio de masa de entre 3,1  $\mu\text{m}$  hasta 3,3  $\mu\text{m}$  y una fracción respirable de gotículas por debajo de 5  $\mu\text{m}$  entre el 87% y el 90% de solución de API y el nebulizador electrónico eFlow®. Al multiplicar estos valores con la dosis administrada hallada en las medidas de simulación de respiración (véase Tabla 4), las series de fracción respirable se encuentran entre 57-59 mg por inhalación. Además, se han hallado desviaciones estándares geométricas (DEG) sorprendentemente bajas, lo que indica una distribución de tamaño de gotícula muy estrecho, permitiendo la administración dirigida del medicamento a lo profundo de los pulmones.

#### **Dosis respirable, administración de medicamento e índice de administración de medicamento respirable**

[0120] El valor de la dosis respirable in vitro deriva de la dosis administrada determinada en el experimento de simulación de respiración y la fracción respirable, p.ej., la proporción del medicamento API dispuesto en gotículas con un tamaño de  $<5\mu\text{m}$ . La evaluación de la fracción respirable mediante tres métodos distintos de calibrado de gotículas arrojó resultados muy similares (entre el 87,4 y el 90,3%) con una media de  $88,5 \pm 2,15\%$  entre todos los métodos. Se utiliza este valor para el cálculo de la dosis respirable. El índice de administración de medicamento y la administración de medicamento respirable se obtienen dividiendo las respectivas dosis entre el período de nebulización. La Tabla 9 resume los datos para  $n=6$ .

**Tabla 9: Dosis respirable, índice de administración de medicamento e índice de administración de medicamento respirable**

	Promedio	$\pm$ SD
Dosis respirable ( $\text{mg}<5\mu\text{m}$ )	57,8	2,90
Dosis respirable (% de cantidad cargada $<5\mu\text{m}$ )	61,9	2,79
Índice de administración de medicamento ( $\text{mg}/\text{min}$ )	7,4	0,98
Índice de administración de medicamento respirable ( $\text{mg}<5\mu\text{m} / \text{min}$ )	6,5	0,74

#### **Resumen y conclusión**

[0121] El presente estudio in vitro investigó la nebulización de la solución de Inhibidor de Proteínasa Alfa-1 (API) en combinación con el novedoso nebulizador electrónico eFlow®.

[0122] El fármaco proteico no resultó dañado de forma significativa por el proceso de nebulización. La actividad de API en los dos lotes testados tras la nebulización con eFlow® fue de entre el 90,0% hasta el 94,5% de la actividad original.

[0123] La distribución de tamaño de gotícula obtenida del eFlow® fue investigada mediante impactación en cascada y difracción láser. La impactación en cascada se realizó utilizando el Impactador Farmacéutico de Nueva Generación y el Impactador en Cascada Andersen. La difracción láser se realizó utilizando un Mastersizer X de Malvern. La serie objetivo del tamaño de gotícula se encontraba entre 1  $\mu\text{m}$  y 4  $\mu\text{m}$ . La descripción mediante tres métodos arrojó un tamaño de gotícula medio, DMM o DAMM, entre 3,1  $\mu\text{m}$  y 3,3  $\mu\text{m}$ , alcanzando el objetivo deseado, y una fracción respirable del 87% al 90%. La DEG, que indica la dispersión de la distribución del tamaño de gotículas, que rozaba el 1,5, lo que representa una distribución de tamaño muy estrecha.

[0124] Los tests con simulación de respiración in vitro se realizaron para evaluar el periodo de tratamiento y la administración de API, utilizando un patrón de respiración estandarizado que representa a un paciente adulto. El volumen de solución de API rellenado en el eFlow® fue 4,0 ml (equivalente a una dosis normal de 80 mg). El período de nebulización fue de  $9,0 \pm 0,1$  min. Una cantidad de aproximadamente 65 mg (70%) de API activo puede administrarse a través de la boquilla del nebulizador. Al combinar esto con las fracciones respirables determinados por la distribución de tamaño de gotícula, se puede calcular una dosis respirable in vitro de unos 58 mg (62%). Los tests adicionales con un patrón de respiración diseñado para representar un paciente con un grave enfisema aún arrojaron una dosis administrada in vitro de 47 mg (56%).

[0125] El estudio in vitro mencionado ha mostrado que la nebulización de API mediante eFlow® produce un aerosol apropiado para llegar a los pulmones de los pacientes. La inhalación de API nebulizado con eFlow® administra las moléculas de medicamento directamente a la localización de acción y reduce la cantidad requerida del caro y escaso medicamento. La inhalación de API puede ayudar a ofrecer una terapia sencilla, eficaz y rápida y puede hacer que más pacientes con enfermedades pulmonares reciban tratamiento.

[0126] La presente descripción de las realizaciones específicas revelarán completamente la naturaleza general de la invención que otros pueden, mediante la aplicación del conocimiento actual, modificarla rápidamente y/o adaptarla para distintas aplicaciones de las realizaciones específicas sin una experimentación indebida. Las adaptaciones y

modificaciones deben ser entendidas dentro del significado y alcance de las realizaciones reveladas. También se entiende que la fraseología o terminología aquí empleada se utiliza como descripción y no como limitación. Los medios, materiales y etapas para llevar a cabo los sistemas, métodos y funciones revelados puede implicar diversas formas sin apartarse de la invención.

5

### Referencias

#### [0127]

- 10 Balcke, A., A. Bucholski, R. Waldner, M. Knoch, y M. Keller, Características de funcionamiento de solución de sodio colistimetato (Colistina) nebulizado por nebulizadores en chorro comparados con novedoso inhalador electrónico (eFlow®), 27ª Conferencia Europea sobre Fibrosis Quística, Birmingham, Reino Unido, 13-17 de junio de 2004.
- 15 Hubbard RC, Crystal RG. Estrategias para terapia con aerosol de deficiencia de alfa1 antitripsina por vía de aerosol. Lung 168 Suppl:565-78, 1990.
- Jauernig, J., S. Ohl, M. Knoch, y M. Keller, Efectos de montaje de ensayo, formulación y tipo de nebulizador sobre características de gotículas aerodinámicas. Procesos de Administración de Medicamento Respiratorio IX. Palm Desert, California, EE.UU., 609-612, 2004.
- 20 Keller, M., J. Jauernig, F.-C. Lintz, y M. Knoch, Nanosuspensiones de nebulizador: Importantes interacciones entre dispositivo y formulación. Procesos de Administración de Medicamento Respiratorio VIII, Tuscon, EE.UU., 12-16 de mayo, 197-206, 2002.
- 25 Knoch, M., y M. Keller: El nebulizador electrónico personalizado: una nueva categoría de sistemas de administración de medicamento mediante aerosol líquido. Opinión experta en administración de medicamento 2(2):377-390 2005.
- Marple, V. A., D.L. Roberts, F.J. Romay, N.C. Miller, K.G. Truman, M. Van Oort, B. Olsson, M.J. Holroyd, J.P. Mitchel y D. Hochrainer: Impactador farmacéutico de nueva generación (Testeado de nuevo impactador para inhalador farmacéutico). Parte I: Diseño. J. Aerosol Med. Vol. 16, Núm. 3, 2003ª, p. 283-299.
- 30 Marple, V.A., B.A. Olson, K. Santhanakrishnan, J.P. Mitchell, S.C. Murray y B.L. Hudson-Curtis: Impactador farmacéutico de nueva generación (Testeado de nuevo impactador para inhalador farmacéutico). Parte II: Calibración conservada. J. Aerosol Med. Vol. 16, Núm. 3, 2003b, p. 301-324.
- 35 Marple, V.A., B.A. Olson, K. Santhanakrishnan, D.L. Roberts, J.P. Mitchell y B.L. Hudson-Curtis: Impactador farmacéutico de nueva generación: Testeado de nuevo impactador para inhalador farmacéutico). Parte III: Ampliación de calibración conservada a 15L/min. Journal of Aerosol Medicine, 17, 4, 2004, p. 335-343.
- 40 McElvaney N.G., R.C. Hubbard, P. Birrer, M.S. Chernick, D.B. Caplan, M.M. Frank y R.G. Crystal. Tratamiento con Alfa1 antitripsina para fibrosis quística. Lancet. 1991. 337(8738):392-4.

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

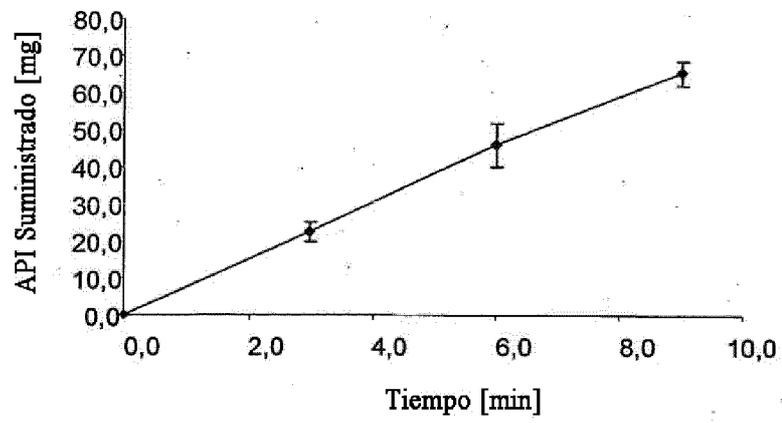
- 5 1. Un sistema para el tratamiento de enfermedades pulmonares consistente en:
- 5 a. Una composición farmacéutica que conste de inhibidor de proteinasa alfa1 activo, estable y purificado producido por el hígado y secretado al sistema circulatorio en una solución estéril lista para utilizar, donde el inhibidor de proteinasa alfa1 es puro en el 90%; y
- 10 b. Un nebulizador de inhalación consistente en:
- 15 i. Un generador de aerosol que conste de: un contenedor de almacenamiento líquido que contiene la composición farmacéutica; un diafragma con un primer lado y un segundo lado opuesto, donde el diafragma tiene diversas aperturas desde el primer al segundo lado, y cuyo primer lado está conectado al contenedor de almacenamiento líquido de tal modo que el líquido que lo rellena entra en contacto con el primer lado del diafragma; y un generador de vibración capaz de hacer vibrar el diafragma de tal modo que el líquido del contenedor se atomiza en el segundo lado del diafragma a través de las aperturas del mismo;
- 20 ii. Una cámara de mezclado en la que el generador de aerosol expulsa el aerosol, y la cámara de mezclado está en contacto con el segundo lado del diafragma;
- 20 iii. Una válvula de inhalación que se abre para permitir la entrada de aire ambiental en la cámara de mezclado durante una fase de inhalación y se cierra para impedir el escape del aerosol de la cámara de mezclado durante una fase de exhalación; y
- 25 iv. Una válvula de exhalación que se abre para permitir la descarga del aire respiratorio de un paciente al exterior durante la fase de exhalación y se cierra para impedir la entrada de aire ambiental durante la fase de inhalación;
- 25 donde la composición farmacéutica se nebuliza mediante el nebulizador de inhalación para formar una composición de aerosol y donde al menos el 90% del inhibidor de proteinasa alfa-1 nebulizado y puro se encuentra en su forma activa.
- 30 2. El sistema según la reivindicación 1,
- 35 donde el inhibidor de proteinasa alfa1 se purifica desde una mezcla impura de proteínas mediante un proceso que incluye la elución de diversas resinas de intercambio iónico, preferiblemente donde el inhibidor de proteinasa alfa1 se purifica de una mezcla impura de proteínas mediante un proceso que incluye la elución de al menos dos resinas de intercambio aniónico y al menos una resina de intercambio catiónico; o donde el pH de la composición farmacéutica se encuentra entre 6,5-7,5; o donde la concentración del inhibidor de proteinasa alfa-1 estable y purificado es inferior al 10% p/v, preferiblemente donde la concentración del inhibidor de proteinasa alfa1 estable y purificado se encuentra entre el 1% y el 5%, y más preferiblemente donde la concentración del inhibidor de proteinasa alfa1 estable y purificado ronde el 2%.
- 40 3. El sistema según la reivindicación 1,
- 45 donde el inhibidor de proteinasa alfa1 estable y purificado es puro en al menos el 95%; o donde el inhibidor de proteinasa alfa1 estable y purificado es puro en al menos el 99%.
- 50 4. El sistema según la reivindicación 1, donde el diámetro medio de masa de las gotículas del aerosol producido por el nebulizador de inhalación es inferior a 5µm; o donde el diámetro medio de masa de las gotículas de aerosol se encuentra entre 1,0µm y 4,0µm; o donde el diámetro medio de masa de las gotículas de aerosol se encuentra entre 2,0µm y 3,5µm; o donde el diámetro medio de masa de las gotículas de aerosol se encuentra entre 2,5µm y 3,3µm.
- 55 5. El sistema según la reivindicación 4, donde la desviación estándar geométrica (DEG) es inferior a 2,0; o donde la desviación estándar geométrica (DEG) es inferior a 1,7.
- 60 6. El sistema según la reivindicación 1, donde al menos el 60% del API se disuelve en gotículas de aerosol inferiores a 5µm.
- 65 7. El sistema según la reivindicación 1, donde la enfermedad pulmonar es seleccionada de entre el grupo que incluye enfisema; enfermedad pulmonar obstructivo crónico (COPD); bronquiectasia; tuberculosis, enfermedades y afecciones parenquimáticas o asociadas con las fibras, incluyendo fibrosis quística, fibrosis pulmonar intersticial y sarcoidosis; y enfermedades pulmonares secundarias del VIH, preferiblemente donde el enfisema es enfisema hereditario, o preferiblemente donde enfermedades pulmonares parenquimáticas o asociadas con las fibras es la fibrosis quística.
8. La utilización de composición farmacéutica consistente en inhibidor de proteinasa alfa1 (API) activo, estable y purificado, producido por el hígado y secretado al sistema circulatorio en forma de solución estéril lista

para usarse, donde el inhibidor de proteínasa alfa1 estable es puro en al menos el 90%; y b) un nebulizador de inhalación consistente en

- 5
- 10
- 15
- 20
- i. Un generador de aerosol que conste de: un contenedor de almacenamiento líquido que contiene la composición farmacéutica; un diafragma con un primer lado y un segundo lado opuesto, donde el diafragma tiene diversas aperturas desde el primer al segundo lado, y cuyo primer lado está conectado al contenedor de almacenamiento líquido de tal modo que el líquido que lo rellena entra en contacto con el primer lado del diafragma; y un generador de vibración capaz de hacer vibrar el diafragma de tal modo que el líquido del contenedor se atomiza en el segundo lado del diafragma a través de las aperturas del mismo;
  - ii. Una cámara de mezclado en la que el generador de aerosol expulsa el aerosol, y la cámara de mezclado está en contacto con el segundo lado del diafragma;
  - iii. Una válvula de inhalación que se abre para permitir la entrada de aire ambiental en la cámara de mezclado durante una fase de inhalación y se cierra para impedir el escape del aerosol de la cámara de mezclado durante una fase de exhalación; y
  - iv. Una válvula de exhalación que se abre para permitir la descarga del aire respiratorio de un paciente al exterior durante la fase de exhalación y se cierra para impedir la entrada de aire ambiental durante la fase de inhalación;

para la preparación de un sistema que conste de esa composición farmacéutica y el nebulizador mencionado donde la composición farmacéutica se nebuliza por el nebulizador de inhalación para formar una composición de aerosol, para administrar a un sujeto una cantidad terapéutica efectiva de la composición de aerosol de inhibidor de proteínasa alfa1, donde al menos, el 90% del inhibidor de proteínasa alfa1 puro nebulizado se encuentra en su forma activa.

- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
9. La utilización según la reivindicación 8, donde el sistema se utiliza para tratar una enfermedad pulmonar en fase de exacerbación aguda.
  10. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, donde la enfermedad pulmonar se selecciona de un grupo que incluye enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), bronquiectasia, tuberculosis, enfermedades y afecciones parenquimáticas o asociadas con las fibras incluyendo la fibrosis quística, la fibrosis pulmonar intersticial y sarcoidosis, así como las enfermedades pulmonares secundarias del VIH.
  11. La utilización según la reivindicación 10, donde el enfisema es enfisema hereditario; o donde la enfermedad pulmonar parenquimática o asociada con las fibras es la fibrosis quística.
  12. La utilización según la reivindicación 11 donde al menos el 50% del API se administra al sujeto; o donde al menos el 60% del API se administra al sujeto; o donde al menos el 70% del API se administra al sujeto.
  13. La utilización de la reivindicación 12, donde el API es absorbido por los tejidos pulmonares del sujeto.
  14. La utilización según la reivindicación 8, donde el sujeto es un sujeto humano.



**FIGURA 1**