

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 197**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2008 E 08780367 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2124898**

54 Título: **Administración mejorada de composiciones de fármacos inmunosupresores para la administración por vía pulmonar**

30 Prioridad:

10.01.2007 US 884383 P

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

16.12.2013

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM (100.0%)
201 West Seventh Street
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**WILLIAMS, ROBERT, O., III;
JOHNSTON, KEITH, P.;
SINWAT, PRAPASRI;
MCCONVILLE, JASON, T.;
TALBERT, ROBERT;
PETERS, JAY;
WATTS, ALAN, B. y
ROGERS, TRUE, L.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 435 197 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

Administración mejorada de composiciones de fármacos inmunosupresores para la administración por vía pulmonar

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, al campo de la administración por vía pulmonar y, más particularmente, a composiciones y procedimientos de fabricación de composiciones de fármacos inmunosupresores para la administración por vía pulmonar.

Antecedentes de la invención

Sin limitar el ámbito de la invención, sus antecedentes se describen en conexión con la administración por vía pulmonar.

10 El tratamiento de los trasplantes de órganos sólidos, especialmente los trasplantes de pulmón, con los fármacos inmunosupresores disponibles actualmente es limitado debido a la escasa penetración en el pulmón después de la administración oral o intravenosa, asociada con efectos adversos considerables después de un tratamiento a largo plazo. A pesar del desarrollo de formulaciones orales para cada uno de estos fármacos, la biodisponibilidad sistémica baja y variable, los efectos secundarios considerables y una ventana terapéutica estrecha han limitado su uso y eficacia.

15 Se han desarrollado formulaciones de ciclosporina por vía pulmonar disolviendo ciclosporina en disolventes tales como etanol o propilenglicol. Sin embargo, los resultados con estos disolventes fueron insatisfactorios debido a las propiedades irritantes de estos disolventes. Se requería una anestesia de las vías respiratorias con lidocaína antes de la dosificación en aerosol. De manera más importante, la nebulización se complicaba debido a la precipitación de ciclosporina dentro de la cámara de nebulización. Además, la ciclosporina es muy tóxica y no ha tenido un efecto significativo en el aumento de la supervivencia del trasplante a largo plazo. Dada la actividad inmunosupresora mejorada del tacrolimus (de 10 a 100 veces más potente que la ciclosporina), es evidente que la mejora en el suministro de tacrolimus sin necesidad de usar disolventes irritantes conducirá a menores tasas de infección usando un tratamiento de profilaxis y de menor coste con una terapia más eficaz.

Sumario de la invención

25 La presente invención se refiere a las composiciones farmacéuticas mejoradas que incluyen nanopartículas de tacrolimus que se disuelven rápidamente que se suministran mediante administración por vía pulmonar. Más particularmente, las composiciones realizadas mediante tecnología de congelación rápida son adecuadas como una nanopartícula respirable con una tasa de disolución rápida, alta área superficial, alta potencia (50-75% de potencia) y capaz de superar la pobre biodisponibilidad de los fármacos. Las composiciones de la presente invención son partículas amorfas y nanoestructuradas, altamente porosas, con altas tasas de disolución de fármaco y gran área superficial que permiten un tratamiento eficaz del rechazo de órganos debido a una biodisponibilidad mejorada del fármaco. Las composiciones presentadas superan las biodisponibilidades bajas y variables de fármacos eficaces tanto para una administración local como para una administración sistémica en el pulmón.

35 Más particularmente, la presente invención incluye composiciones y procedimientos para la administración por vía pulmonar de un agregado de tacrolimus, nanoestructurado, sustancialmente amorfo, que se disuelve rápidamente, de alta potencia, y una matriz estabilizante que incluye, opcionalmente, un agente tensioactivo polimérico o no polimérico, un sacárido polimérico o no polimérico o ambos, en el que el agregado tiene un área superficial mayor que 5 m²/g, según se mide mediante análisis BET y que exhibe sobresaturación durante al menos 0,5 horas cuando se añade de 11 a 15 veces la solubilidad cristalina acuosa de tacrolimus al fluido pulmonar simulado. El fluido pulmonar simulado puede incluir 100 ml de fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% p/v de L- α -dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) mantenido a 37°C y agitado con una velocidad de paleta de 100 rpm en un aparato de disolución de pequeño volumen. Generalmente, la composición de la presente invención exhibirá una disolución de fármaco superior a aproximadamente el 80% en aproximadamente 1 hora cuando una cantidad equivalente a aproximadamente 0,59 veces la solubilidad cristalina acuosa de tacrolimus es añadida a 100 ml de fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% p/v de DPPC mantenido a 37°C y agitado con una velocidad de paleta de 50 rpm en un aparato de disolución de pequeño volumen.

45 Por ejemplo, la sobresaturación de tacrolimus puede ser durante al menos 1, 2, 3 ó 4 horas y el agregado nanoestructurado puede mostrar una solubilidad mayor que la solubilidad cristalina en el fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% p/v de DPPC mantenido a 37°C y agitado con una velocidad de paleta de 100 rpm en un aparato de disolución de pequeño volumen. El agregado proporcionará generalmente una deposición pulmonar de más de aproximadamente 0,10 µg/g de peso de tejido pulmonar húmedo entero cuando se administra mediante nebulización a un ratón con un peso entre 16 g y 32 g usando el aparato pre-clínico de dosificación para roedores. En un ejemplo, el agregado nanoestructurado tiene un área superficial mayor de aproximadamente 5, 10, 20 ó 30 m²/g. El agregado nanoestructurado puede ser proporcionado también para una liberación inmediata, liberación prolongada, liberación pulsante, liberación retardada, liberación controlada y sus combinaciones.

En un ejemplo, la composición puede formularse como una dispersión para nebulización que es preparada mezclando el agregado nanoestructurado que contiene tacrolimus con un vehículo acuoso y nebulizada mediante un nebulizador, un nebulizador de chorro de aire, un nebulizador ultrasónico o un nebulizador de micro-bomba. Generalmente, la fracción respirable de las gotitas nebulizadas es mayor que aproximadamente el 40, 50, 60, 70 ú 80%, tal como se mide mediante un impactador de cascada de 8 etapas, no viable, a un caudal de aire de 28,3 l/min. La composición puede ser adaptada de manera adecuada para la administración usando un dispositivo de administración de dosis medida, un dispositivo de inhalación de polvo seco o un dispositivo de inhalación de dosis medida presurizada.

El agregado nanoestructurado sustancialmente amorfo puede prepararse mediante uno o más de los procedimientos siguientes: aerosol congelador, congelación en líquido, congelación por pulverización en vapor, congelación ultra-rápida o secado por pulverización. Por ejemplo, el agregado nanoestructurado sustancialmente amorfo se prepara mediante precipitación con disolvente, precipitación con antidisolvente, precipitación continua o precipitación evaporativa en solución acuosa. En otro procedimiento, el tacrolimus es disuelto en disolvente o una mezcla de co-disolventes capaz de disolver todos los componentes de la composición junto con un excipiente farmacéutico estabilizante, en el que un polvo seco resultante, que tiene presente tacrolimus en partículas individuales entre el 5% y el 99% en peso, es producido tras la congelación por pulverización en líquido o tras congelación ultra-rápida, seguido de liofilización. El tacrolimus puede ser combinado con cualquier excipiente estabilizante farmacéutico, por ejemplo, un hidrato de carbono, sal orgánica, aminoácido, péptido, o proteína que produce un polvo tras la congelación por pulverización en líquido o congelación ultra-rápida. Los ejemplos no limitativos de excipientes farmacéuticos estabilizantes incluyen un hidrato de carbono seleccionado de entre el grupo que consiste en manitol, rafinosa, lactosa, maltodextrina, trehalosa y sus combinaciones. El agregado puede incluir uno o más dominios de nanopartículas altamente humectables y/o agregados nanoestructurados que se humedecen rápidamente y se disuelven en una solución acuosa.

La presente invención incluye también un procedimiento de preparación de una composición pulmonar mezclando tacrolimus con un agente tensioactivo, un estabilizador o una combinación de un agente tensioactivo y una matriz estabilizadora y congelando ultra-rápidamente el tacrolimus y el tensioactivo/matriz estabilizadora en una nanopartícula amorfa, de alta potencia, que se disuelve rápidamente, mediante congelación por pulverización en congelación líquida o ultra-rápida, en el que la nanopartícula tiene un área superficial mayor de $5 \text{ m}^2/\text{g}$, según se mide mediante análisis BET y que exhibe sobresaturación durante al menos 0,5 horas cuando se añade 15 veces la solubilidad cristalina acuosa del tacrolimus al fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% p/v de DPPC. Por ejemplo, el agregado de la presente invención muestra una solubilidad de más de aproximadamente 2 veces la solubilidad de tacrolimus cristalino. La composición pulmonar puede ser proporcionada para una liberación inmediata, liberación prolongada, liberación pulsante, liberación retardada, liberación controlada y sus combinaciones. El tacrolimus puede ser disuelto en un disolvente junto con un excipiente farmacéutico estabilizador, en el que un polvo seco que tiene tacrolimus presente en las partículas individuales a entre el 5% y el 99% en peso es producido tras una congelación por pulverización en líquido o congelación ultra-rápida.

Todavía otra realización de la presente invención es una nanopartícula de alta área superficial que es una nanopartícula de tacrolimus agregada amorfa dentro de una matriz tensioactivo/estabilizador adaptada para la administración por vía pulmonar con un área superficial mayor que $5 \text{ m}^2/\text{g}$ según se mide mediante análisis BET y exhibe sobresaturación durante al menos 0,5 horas cuando se añade 15 veces la solubilidad cristalina acuosa de tacrolimus a fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% p/v de DPPC.

Otra realización de la presente invención incluye composiciones y procedimientos para reducir el rechazo del trasplante en un sujeto mezclando tacrolimus con un agente tensioactivo, una matriz estabilizadora o una combinación de un agente tensioactivo y una matriz estabilizadora; y congelando ultra-rápidamente el tacrolimus y el agente tensioactivo/la matriz estabilizadora en una nanopartícula amorfa, de disolución rápida, de alta potencia, mediante congelación por pulverización en líquido o congelación ultra-rápida para formar una nanopartícula de tacrolimus; en la que la nanopartícula de tacrolimus comprende un área superficial mayor que $5 \text{ m}^2/\text{g}$ según se mide mediante análisis BET y que exhibe sobresaturación durante al menos 0,5 horas cuando se añaden de 11 a 15 veces la solubilidad cristalina acuosa del tacrolimus a fluido pulmonar simulado modificado; y tratando el sujeto con una cantidad eficaz de la composición de nanopartículas de tacrolimus para prevenir el rechazo de trasplante. En un aspecto, la nanopartícula de tacrolimus está adaptada para la administración por vía pulmonar. En otro aspecto, la nanopartícula de tacrolimus se proporciona para prevenir el rechazo de trasplante de pulmón. En otro aspecto, la nanopartícula de tacrolimus se proporciona a entre 0,1 mg/ml y 100 mg/ml.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de las características y ventajas de la presente invención, se hace referencia ahora a la descripción detallada de la invención junto con las figuras adjuntas, en las que:

Las Figuras 1A y 1B son imágenes SEM de nanopartículas que incluyen tacrolimus (TAC):Lactosa (1:1) en dos aumentos diferentes;

Las Figuras 2A y 2B son imágenes SEM de nanopartículas que contienen tacrolimus (TAC):Poloxámero 407 (4:1);

La Figura 3 es una imagen SEM de polvos TAC cristalinos a granel;

La Figura 4 muestra los patrones de difracción de rayos X de las formulaciones TAC URF en comparación con TAC no procesado;

5 La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de disolución. El ensayo de disolución se realizó bajo condiciones de inmersión usando un aparato USP tipo 2 (VanKel VK6010 Dissolution Tester con un calentador/circulador Vanderkamp VK650); el medio de disolución era 900 ml de fluido pulmonar simulado modificado que contenía el 0,02% de DPPC mantenido a 37°C y agitado a 100 rpm; los patrones de disolución se determinaron en réplicas de 6;

10 La Figura 6 es un gráfico que muestra los patrones de disolución bajo inmersión (■) composición TAC URF amorfa:lactosa (1:1), (▲) solo composición TAC URF cristalina y (●) TAC cristalina no procesada. El medio de disolución era fluido pulmonar simulado modificado que contenía 0,02% de DPPC, a 100 rpm y 37°C (solubilidad de equilibrio de TAC en este medio ~ 6,8 µg/ml).

Los patrones de disolución se determinaron en réplicas de 3;

15 La Figura 7 es un gráfico que muestra los patrones de disolución sobresaturada para (□) composición TAC URF amorfa:lactosa (1:1); (■) solo composición TAC URF cristalina y (---) solubilidad de equilibrio de TAC en el medio de disolución (6,8 µg/ml). El medio de disolución era fluido pulmonar simulado (Simulated Lung Fluid, SLF) modificado que contenía 0,02% de DPPC, a 100 rpm y 37°C. Los patrones de disolución se determinaron en réplicas de 3; C es la concentración medida de TAC en un punto de tiempo determinado y Ceq es la concentración de equilibrio de TAC;

20 La Figura 8 es un gráfico que muestra una comparación de la concentración pulmonar media (µg TAC/g de tejido) frente a patrones de tiempo en ratones de las formulaciones URF. (□) composición TAC URF amorfa:lactosa (1:1) y (■) solo composición TAC URF cristalina;

La Figura 9 es un gráfico que muestra una comparación de los patrones promedio de concentración TAC en sangre entera de las formulaciones URF después de una única administración por inhalación. (□) composición TAC URF amorfa:lactosa (1:1) y (■) solo composición TAC URF cristalina;

25 Figura 10A: Histología de tejido pulmonar a partir de grupo activo TAC:LAC, día 7, Figura 10B: Histología de tejido pulmonar a partir de Grupo activo TAC:LAC, día 14, Figura 10C: Histología de tejido pulmonar del grupo de control solo LAC, día 7, y Figura 10D : Histología de tejido pulmonar de grupo de control solo LAC, día 14 (Notas sobre la histología: a: espacios alveolares; b: capilares, c: tejido linfático, y d: arteriolas con las células rojas de la sangre presentes; (aumento 20X)).

30 Descripción detallada de la invención

Aunque la producción y el uso de diversas realizaciones de la presente invención se exponen detalladamente a continuación, debería apreciarse que la presente invención proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que pueden ser materializados en una amplia diversidad de contextos específicos. Las realizaciones específicas expuestas en la presente memoria son meramente ilustrativas de modos específicos de realización y uso de la invención y no limitan el

35 Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación, se definen una serie de términos. Los términos definidos en la presente memoria tienen los significados comprendidos normalmente por una persona con conocimientos ordinarios en las áreas pertinentes a la presente invención. Los términos tales como "un", "una", "el" y "la" no pretenden hacer referencia solamente a una entidad singular, sino que incluyen la clase general de la cual puede usarse un ejemplo específico con propósitos ilustrativos. La terminología en la presente memoria se usa para describir realizaciones específicas de la invención, pero su uso no limita la invención, excepto tal como se indica en las reivindicaciones.

40 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "análisis BET" se refiere a un procedimiento para medir el área superficial de la superficie expuesta de una muestra sólida a escala molecular. Típicamente, la teoría BET (Brunauer, Emmet y Teller) se usa para determinar el área de sólidos. Normalmente, las muestras se preparan calentando y evacuando o haciendo fluir simultáneamente gas sobre la muestra para eliminar las impurezas liberadas. A continuación, las muestras preparadas se enfrían con nitrógeno líquido y se analizan midiendo el volumen de gas (típicamente N₂ o Kr) adsorbido a presiones específicas. Frecuentemente, se usa criptón cuando se espera que la superficie medida sea menor de 2 m²/g (típicamente, muestras farmacéuticas y materiales orgánicos naturales). La persona con conocimientos ordinarios en la materia reconocerá que pueden usarse diversos tipos de instrumentos para medir el área superficial, lo

45 que dependerá de la extensión de la superficie o el gas requerido para conseguir los mejores resultados. Los ejemplos de equipos que pueden ser usados incluyen ASAP 2020 y ASAP 2405 Kr, Tristar 3000, Gemini 2380 y Flowsorb 2310.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% p/v de DPPC" se refiere a la composición indicada en la Tabla 1 de la referencia Davies, N. M. y Feddah, M. R. (2003) A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products. International Journal of Pharmaceutics, 255, 175-187. Tal como se observa en la Tabla 1 de Davies, et al., la composición incluye: iones de calcio, iones de magnesio, iones de potasio, iones de sodio, bicarbonato, iones de cloruro, iones de citrato, iones de acetato, iones de fosfato, iones de sulfato y DPPC. El pH oscila entre 7,3 y 7,4.
- Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "que exhibe sobresaturación" se refiere a una solución que contiene más tacrolimus disuelto del que podría ser disuelto por el fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% p/v de DPPC en comparación con el tacrolimus cristalino.
- 10 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "humedece rápidamente" se refiere a la capacidad de los agregados nanoestructurados de ser humectados por el fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% p/v de DPPC o fluidos pulmonares *in vivo* a la temperatura corporal (37°C).
- Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "peso del tejido de pulmón completo húmedo" se refiere al peso total del pulmón de un ratón.
- 15 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "vehículo farmacéutico" se refiere a los componentes inactivos de la composición farmacéutica.
- Tal como se usa en la presente memoria, el término "tensioactivo" hace referencia a una sustancia que reduce la tensión superficial de un líquido, causando, de esta manera, que se extienda más fácilmente sobre una superficie sólida. Los ejemplos de tensioactivos para su uso con la presente invención incluyen todos los tensioactivos adecuados para la administración a los pulmones, incluyendo sales de sodio de colato, desoxicolato, glicocolato y otras sales biliares; Span 85, lauril-beta-D-maltósido, ácido palmítico, trioleato de glicerol, ácido linoleico, DPPC alcohol oleico, ácido oleico, oleato de sodio y oleato de etilo.
- 20 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "aparato de dosificación pre-clínica para roedores" se refiere al aparato descrito por J. T. McConville, P. Sinswat, J. Tam, K. P. Johnston y R. O. Williams III, In vitro and in vivo validation of a high-concentration pre-clinical rodent dosing apparatus for inhalation, Proceedings of the American Association of Pharmaceutical Scientists, San Antonio, TX, Octubre, 2006, cuyas partes relevantes se incorporan a la presente memoria, por referencia.
- 25 La tecnología hace uso de excipientes existentes usados, todos ellos seleccionados de la lista GRAS aprobada por la FDA (<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/GRAS/grasindx.htm>), su uso está aprobado por la FDA (<http://www.fda.gov/cder/drug/iig/default.htm>) o son de origen natural en los tejidos de mamíferos. Se usan frecuentemente en comprimidos orales o preparaciones parenterales e indican niveles de toxicidad mínima. Estos se usan en conjunción con el ingrediente activo para formar una forma de dosificación estable, con dimensiones del orden de nanómetro.
- 30 Es importante que el producto de fármaco procesado contenga nanopartículas estabilizadas con alta área superficial para obtener altas tasas de disolución. Pueden usarse otras tecnologías de procesamiento, tales como procedimientos de congelación rápida, anti-disolvente y de precipitación.
- 35 Se encontró también que el TAC tiene la capacidad de revertir el rechazo en curso. Posteriormente, numerosos estudios han confirmado la eficacia del TAC como terapia primaria en una diversidad de trasplantes de órganos sólidos. De manera importante, la actividad inmunosupresora mejorada del TAC se consigue sin un mayor riesgo de infección o malignidad. Aunque muchos estudios revelaron que el TAC puede tener actividades inmunosupresoras superiores en comparación con la ciclosporina, la absorción errática desde el tracto gastrointestinal tras la administración oral ha limitado el potencial clínico del fármaco.
- 40 La biodisponibilidad oral media de este fármaco es de aproximadamente el 25% en pacientes adultos. El alto costo de la terapia de rechazo asociada con el tacrolimus es de aproximadamente \$34.200 en el primer año. Las composiciones de la presente invención compuestas de agregados porosos de partículas pequeñas con altas tasas de disolución de fármaco y alta área superficial permiten un tratamiento eficaz del rechazo de órganos debido a una mayor biodisponibilidad del fármaco.
- 45

Tabla 1. Análisis de área superficial

Formulaciones	Área superficial específica [m ² /g]
---------------	---

Polvos TAC en bruto	0,533
TAC:lactosa (1:1)	44,28
TAC:poloxámero 407 (4:1)	40,07

Morfología de partículas. SEM - Las muestras de polvo se recubrieron por deposición con oro-paladio durante 35 segundos y se observaron usando un microscopio electrónico Hitachi S-4500 de barrido de emisión de campo.

SEM indica la presencia de pequeñas partículas de agregados porosos

- 5 Difracción de rayos X. El patrón de difracción de rayos X de los polvos se analizó usando un difractómetro de rayos x Philips 1710, con un objetivo de cobre y filtro de níquel (Philips Electronic Instruments, Inc., Mahwah, Nueva Jersey). El polvo estabilizado se midió desde 10 a 40 grados 2-theta usando un tamaño de paso de 0.05 grados 2-theta y un tiempo de permanencia de un segundo. No pueden identificarse picos correspondientes a tacrolimus.
- 10 Disolución de las formulaciones orales (n = 6). Se realizó un ensayo de disolución sobre las muestras de polvo usando un aparato USP Tipo 2 (VanKel VK6010 Dissolution Tester con un calentador/circulador Vanderkamp VK650A). Se añadió un equivalente de 4 mg de tacrolimus a 900 ml de fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% de medio de disolución DPPC y agitado a 100 rpm. El medio de disolución se mantuvo a $37,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Se retiraron muestras de cinco mililitros en los puntos de tiempo de 10, 20, 30, 60 y 120 minutos, se filtraron usando un filtro GPH Acrodisc de $0,45 \mu\text{m}$ y se analizaron usando un cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10 (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón). Una fase móvil de acetonitrilo:agua 70:30 a 1 ml/min eluyó el pico TAC a los 6 minutos. Para las formulaciones preparadas para la Figura 5,
- 15 la absorbancia de tacrolimus se midió a $\lambda = 220 \text{ nm}$.

Tabla 2. Datos de Impactador de cascada Anderson – Nebulizador de microbomba Aeroneb® Professional.

Formulaciones	Dosis total emitida ($\mu\text{g}/\text{min}$)	Fracción respirable [%]	MMAC(GSD)(μm)
TAC:Lactosa (1:1)	5.082	74,6	2,57 (2,24)
TAC:Poloxámero 407 (4:1)	4.917	71,1	2,75 (1,86)
MMAD = diámetro de masa media aerodinámico			
GSD = Desviación estándar geométrica			

- 20 Se consiguió un buen rendimiento de aerosolización. Más del 70% de las fracciones respirables están indicadas para todas las formulaciones usando el nebulizador Aeroneb® Professional. Los diámetros de masa media aerodinámicos entre 1 y $5 \mu\text{m}$ están indicados también para todas las formulaciones, usando este nebulizador.

- 25 En este estudio pretende producir agregados nanoestructurados de tacrolimus (TAC) destinados a la administración por vía pulmonar usando congelación ultra-rápida (URF), e investigar las características fisicoquímicas y farmacocinéticas de los agregados nanoestructurados que contienen nanopartículas amorfas o cristalinas de TAC. Se investigaron dos formulaciones URF para la administración por vía pulmonar, y se compararon con TAC en bruto, no procesado; estas fueron: TAC y lactosa (relación 1:1; URF-TAC:LAC) y solo TAC (URF-TAC). El TAC y el excipiente soluble en agua, es decir, lactosa, se disolvieron en acetonitrilo y agua, respectivamente. Se mezclaron dos soluciones para obtener la relación 60:40 del sistema co-disolvente orgánico/acuoso resultante que se congeló, a continuación, sobre el sustrato criogénico. A continuación, el co-disolvente se congeló sobre el sustrato criogénico URF y las composiciones congeladas
- 30 se recogieron y se liofilizaron para formar el polvo seco para la nebulización. Los resultados *in vitro* revelaron propiedades fisicoquímicas similares para ambas formulaciones URF. El análisis BET mostró áreas superficiales altas de $29,3 \text{ m}^2/\text{g}$ y $25,9 \text{ m}^2/\text{g}$ para el URF-TAC:LAC y URF-TAC, respectivamente, y $0,53 \text{ m}^2/\text{g}$ para el TAC no procesado, respectivamente. Una microscopía electrónica de barrido (SEM) mostró agregados nanoestructurados que contenían nanopartículas de TAC. La disolución del TAC fue del 83,6% en 1 hora para URF-TAC:LAC, en comparación con el 80,5% para URF-TAC y el 30% disuelto para el TAC no procesado, respectivamente. Los datos del impactador de cascada indicaron tamaños de partícula aerodinámicas similares de 2-3 μm , y la fracción de partículas finas entre el 70-75% para URF-TAC:LAC y URF-TAC. Los resultados de difracción de rayos X (DRX) indicaron que URF-TAC era cristalina, mientras que URF-TAC:LAC era amorfa. Los patrones de disolución sobresaturada estaban de acuerdo con estos resultados. URF-TAC:LAC mostró la capacidad de sobresaturarse en el medio de disolución a aproximadamente 11 veces la solubilidad cristalina de equilibrio.
- 35 Se realizaron estudios *in vivo* en ratones dispersando las formulaciones URF en agua desionizada y nebulizando las
- 40

formulaciones URF dispersadas usando un aparato dosificador, solo para su uso en la nariz, especialmente diseñado. Los patrones farmacocinéticos obtenidos mostraron $AUC_{(0-24)}$ comparable, mayor C_{max} y menor T_{max} para URF-TAC:LAC en comparación con URF-TAC. Por lo tanto, las formulaciones pulmonares que se disuelven rápidamente, que contienen agregados nanoestructurados de TAC amorfo o cristalino, fueron desarrolladas usando la tecnología URF. Las formulaciones procesadas mediante URF demostraron ser suministradas efectivamente como una dispersión acuosa de nanopartículas TAC mediante nebulización, con un rendimiento *in vivo* similar, al mostrar un grado comparable de absorción del fármaco.

El tacrolimus (TAC) es un agente inmunosupresor ampliamente usado, aislado de *Streptomyces tsukubaensis*. Ha demostrado ser un potente inmunosupresor en medicina de trasplantes para el tratamiento del rechazo de órganos y diferentes enfermedades inmunológicas, tales como fibrosis pulmonar y asma bronquial [1-3]. El TAC se introdujo por primera vez como terapia de rescate cuando la terapia de ciclosporina A (CsA) no pudo prevenir el rechazo del injerto. Tiene un mecanismo de acción similar al de la CsA, pero su actividad inmunosupresora es de 10 a 100 veces más potente que la CsA [4,5]. En la actualidad, el TAC está disponible tanto en una forma de dosificación intravenosa como en una forma de dosificación oral (conocida comercialmente como Prograf®). Sin embargo, estas formas de dosificación disponibles en la actualidad del fármaco son mal toleradas y proporcionan una biodisponibilidad variable y/o baja [6]. Las formulaciones orales de TAC presentan un desafío considerable, ya que los fármacos son prácticamente insolubles en agua y metabolizan ampliamente a partir tanto del metabolismo CYP3A4 como del transporte de eflujo de p-glicoproteína dentro del epitelio intestinal [7]. La biodisponibilidad oral de TAC varía del 4% al 93% [8]. La absorción ineficaz o irregular del fármaco es principalmente el resultado de una absorción incompleta desde el tracto gastrointestinal y el metabolismo de primer paso, que está sujeto a una considerable variación interindividual [8].

La presente invención se centra en un sistema de suministro de fármacos por vía pulmonar basado en nanopartículas de TAC con el fin de superar los problemas indicados anteriormente para mejorar la biodisponibilidad. Los aspectos atractivos de las nanopartículas de fármacos inhalados incluyen: rápida disolución de las nanopartículas en el pulmón y prevención del metabolismo hepático de primer paso (lo cual es especialmente útil para un fármaco que es sometido a un extenso metabolismo en el hígado) [9,11]. Además, las nanopartículas inhaladas pueden aumentar las concentraciones locales de fármacos en el pulmón para un posible uso terapéutico en el trasplante de pulmón y enfermedades pulmonares. Frecuentemente, el tratamiento de los receptores de trasplantes de pulmón es limitado debido a la escasa penetración del fármaco en el pulmón después de la administración oral o intravenosa [12]. El fármaco en aerosol tendrá acceso directo al injerto en el trasplante de pulmón, ofreciendo la posibilidad de niveles de fármaco mucho más altos [13]. Sin embargo, una desventaja importante de la administración por vía pulmonar para fármacos tales como TAC son las limitaciones en los niveles y los tipos de excipientes que se consideran seguros para su uso en formulaciones pulmonares. Aunque muchos agentes tensioactivos o polímeros, tales como ciclodextrinas, poloxámeros, polietilenglicoles (PEG) y glicerol, han sido estudiados en formulaciones pulmonares para ayudar a la solubilización de los fármacos en muchos estudios de investigación [14-16], estos excipientes no han sido aprobados todavía para su uso comercial por la FDA debido a la potencial toxicidad en el pulmón. Diversos estudios clínicos han demostrado la administración efectiva por vía pulmonar de soluciones de CsA en etanol o propilenglicol antes del uso de aerosol en los modelos de trasplante de pulmón [17-19]. Sin embargo, los disolventes han producido resultados que han demostrado ser insatisfactorios debido a las propiedades irritantes de estos disolventes para las vías respiratorias. Además, el uso de altos niveles de etanol o propilenglicol en las formulaciones destinadas para la administración por vía pulmonar todavía debe ser estudiado ampliamente en los seres humanos. Recientemente, la tecnología de liposomas se ha investigado como una alternativa no irritante para la administración por vía pulmonar de CsA, pero la formulación tenía poca capacidad de carga de fármaco y, de esta manera, requería un largo periodo de nebulización [20].

Se investigaron formulaciones pulmonares que contenían TAC, fabricadas mediante congelación ultrarrápida (URF), sin la inclusión de agentes tensioactivos o excipientes poliméricos. La tecnología URF es un procedimiento criogénico continuo, escalable, que produce agregados nanoestructurados con alta área superficial que resultan en altas tasas mejoradas de disolución del fármaco. Anteriormente, se informó acerca de la congelación mediante pulverización en líquido (SFL) [21-26]. Las rápidas velocidades de congelación obtenidas con el procedimiento SFL condujeron a la producción de agregados nanoestructurados amorfos compuestos de partículas primarias, que varían de 100 a 200 nm, con altas áreas superficiales, alta humectabilidad y tasas de disolución significativamente mejoradas. El procedimiento URF proporciona partículas con propiedades similares a las producidas mediante SFL. En URF, una solución de la sustancia activa y el excipiente en un disolvente orgánico o co-disolvente acuoso adecuado se aplica a la superficie de un sustrato sólido criogénico. El aerosol se congela instantáneamente, entre 50 ms y 1 s, sobre la superficie del sustrato sólido criogénico de una manera continua [27,28]. Los polvos URF exhiben propiedades deseables para mejorar la biodisponibilidad, tales como área superficial elevada, mayores tasas de disolución del fármaco y carácter amorfo.

Los agregados nanoestructurados compuestos de nanopartículas de TAC primarias, amorfas o cristalinas, producidos mediante el procedimiento URF, son adecuados para su administración por vía pulmonar mediante nebulización, resultando en altas concentraciones en pulmón y en sangre. La hipótesis es que la alta área superficial y la rápida velocidad de disolución obtenidas a partir de los agregados nanoestructurados de TAC promueven una alta absorción

sistémica del fármaco a través de los pulmones, mientras que todavía mantienen un tiempo de residencia en el pulmón deseable para la potencial terapia local. Las propiedades fisicoquímicas pertinentes (por ejemplo, área superficial, disolución, cristalinidad) de los agregados nanoestructurados de TAC se caracterizaron con el fin de comprender cómo influyen en la absorción del fármaco *in vivo* después de la nebulización de una dosis única de las dispersiones de partículas.

El TAC fue proporcionado amablemente por The Dow Chemical Company (Midland, MI). La lactosa, hexahidrato de cloruro de magnesio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de sodio dibásico anhidro, sulfato de sodio anhidro, cloruro de calcio dihidrato, acetato de sodio trihidrato, bicarbonato de sodio y citrato de sodio dihidrato de eran de grado analítico y se adquirieron de Spectrum Chemicals (Gardena, CA). La dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) se adquirió de Sigma-Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI). El acetonitrilo (ACN) de grado cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se adquirió de EM Industries, Inc. (Gibbstown, NJ). El nitrógeno líquido se obtuvo de Boc Gases (Murray Hill, NJ). El agua desionizada se preparó mediante un sistema de purificación Milli-Q de Millipore (Molsheim, Francia).

Preparación ejemplar de las formulaciones URF. Las formulaciones de TAC fueron procesadas usando URF. Dos formulaciones URF consideradas para la administración por vía pulmonar fueron TAC:lactosa en una relación 1:1 (URF-TACI:LAC) y solo TAC (URF-TAC). Las composiciones se prepararon disolviendo TAC y excipiente hidrófilo (si existe) en una relación 1:1 y el 0,75% de sólidos en una mezcla 60/40 de acetonitrilo y agua. La solución de fármaco se aplicó a la superficie del sustrato sólido, que se enfría usando un sustrato criogénico mantenido a -50°C. A continuación, se recogieron las composiciones congeladas y el disolvente se eliminó mediante liofilización usando un liofilizador VirTis Advantage Tray (VirTis Company Inc., Gardiner, Nueva York). Las recetas de liofilización usadas en este estudio se describen en el Apéndice A. Los polvos secos se almacenaron a temperatura ambiente bajo vacío.

Caracterización *in vitro* de polvos para administración por vía pulmonar. Difracción de rayos X del polvo (DRX). Los patrones de DRX de los polvos se analizaron usando un difractómetro de rayos X Philips 1710 con un objetivo de cobre y filtro de níquel (Philips Electronic Instruments, Inc., Mahwah, Nueva Jersey). Cada muestra se midió de 5 a 45 grados 2 θ usando un tamaño de paso de 0,05 grados 2 θ y un tiempo de permanencia de un segundo.

Análisis BET de área superficial específica. El área superficial específica se midió usando un instrumento Nova 2000 v.6.11 (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL). Un peso conocido de polvo se añadió a una celda de muestra Quantachrome de 12 mm y se desgasificó durante un mínimo de 3 horas. A continuación, los datos registrados se analizaron según la teoría BET usando el software NOVA v. 2.13 mejorado de reducción de datos.

Microscopía electrónica de barrido (SEM). Se usó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Hitachi S-4500 (Hitachi High-Technologies Corp., Tokio, Japón) para obtener micrografías SEM de las muestras de polvo. Las muestras fueron montadas en la cinta conductora y fueron revestidas mediante deposición usando un revestidor de pulverización catódica modelo K575 (Emitech Products, Inc. Houston, TX) con oro/paladio durante 30 segundos. Se usó un voltaje de aceleración de 5-15 kV para observar las imágenes.

Ensayo de disolución en condiciones por debajo de la solubilidad de equilibrio. El ensayo de disolución en condiciones por debajo de la solubilidad de equilibrio se realizó sobre las muestras de polvo URF usando un aparato de disolución de tipo 2 United States Pharmacopeia (USP) 27 (Vankel VK6010 Dissolution Tester con un calentador/circulador Vanderkamp VK650A, Varian, Inc. Palo Alto, CA). Las muestras de polvo (0,4 mg TAC) equivalentes a aproximadamente el 59% de la solubilidad en equilibrio (6,8 μ g/ml) se añadieron a 100 ml de fluido pulmonar simulado (SLF) modificado con 0,02% de DPPC como medio de disolución [29]. El medio de disolución se mantuvo a 37,0 $\pm$ 0,2°C y se agitó a una velocidad constante de 100 rpm. Las muestras (1 ml) se retiraron en los puntos de tiempo 10, 20, 30, 60 y 120 minutos, se filtraron usando un filtro Acrodisc GHP de 0,45 μ m (VWR, Inc. Westchester, PA), y se analizaron usando un cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10 (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) equipado con una columna Altech ODS-2, 5 μ m C₁₈ (Altech Associates, Deerfield, IL). La fase móvil consistía en una mezcla 70:30 (v/v) de ACN:agua, usando un caudal de 1 ml/min. El máximo de absorbancia se midió a la longitud de onda λ_{max} = 214 nm.

Comportamiento de disolución en la formación de soluciones sobresaturadas. Los patrones de disolución sobresaturada fueron generados según el procedimiento descrito anteriormente, excepto que se usó el aparato de disolución de pequeño volumen equipado con un mecanismo de agitación con palas. Cada formulación del fármaco se pesó, de manera que correspondía a aproximadamente 15 veces la solubilidad cristalina acuosa de TAC en 100 ml del fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% de DPPC. La velocidad de las palas y la temperatura del baño se mantuvieron a 100 rpm y 37°C, respectivamente. Se retiró una alícuota (1 ml) del recipiente de pequeño volumen a los 10, 20, 30, y 60 minutos, a continuación, a las 2, 4 y 24 horas. Cada alícuota se filtró a través de un filtro de nylon de 0,2 μ m, y una alícuota de 0,5 ml de cada solución filtrada se mezcló inmediatamente con 1 ml de acetonitrilo (para asegurar que no se produjera recristalización del fármaco disuelto previamente a 37°C). Las muestras se analizaron para determinar la concentración de TAC usando el mismo procedimiento HPLC descrito anteriormente. Todos los estudios se realizaron por triplicado.

Rendimiento *in vitro* de aerosol. Las características de deposición *in vitro* de las formulaciones TAC dispersadas y

nebulizadas fueron investigadas usando un impactador de cascada no-viable de 8 etapas (Thermo-Electron Corp., Symma, GA, EE.UU.). El comportamiento de aerosolización se describió en términos de la dosis total emitida (TED), fracciones de partículas finas (FPFs), diámetros de masa media aerodinámicos (MMAD) y la desviación estándar geométrica (GSD). El impactador de cascada se ensambló y operó según el procedimiento USP 601 para evaluar el fármaco suministrado. Los polvos se dispersaron en agua (10 mg/ml) y se nebulizaron usando un nebulizador con microbomba Aeroneb® Profesional (Nektar Inc., San Carlos, CA) durante 10 minutos a un caudal de aire de 28,3 l/min. El caudal se mantuvo mediante una bomba de vacío (Emerson Electric Co., St. Louis, MO, EE.UU.) y se calibró con un medidor de flujo de masa TSI (Modelo 4000, TSI Inc., St. Paul, MN, EE.UU.). La masa depositada en cada una de las etapas se recogió y se analizó mediante HPLC, tal como se describe en la presente memoria. Cada estudio se repitió por triplicado.

Estudios *in vivo* en ratones. Administración por vía pulmonar de las formulaciones URF. La dosificación pulmonar de las formulaciones URF se realizó en ratones ICR macho sanos (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianápolis, IN). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Internacional sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación (IACUC) en la Universidad de Texas en Austin, y todos los animales se mantuvieron según Asociación Americana para la Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio. Los ratones se aclimataron y acondicionaron previamente en el tubo de retención (Battelle, Inc., Columbus, OH) durante 10-15 minutos/día durante al menos 2 días antes de la dosificación. Un pre-acondicionamiento apropiado es esencial para reducir el estrés de los ratones, así como para mantener una tasa de respiración uniforme para los animales. Se usó un aparato de dosificación mediante inhalación para animales pequeños para administrar las dosis a los ratones para este estudio. El aparato dosificador incluye un tubo hueco de pequeño volumen, con dimensiones de 20 x 4,5 cm (espesor nominal de pared de 0,4 cm) con cuatro orificios adaptadores de 1,75 cm perforados a intervalos de 7 cm (2 orificios a lo largo de cada lado). Los orificios adaptadores se construyeron para aceptar los tubos de retención de roedores desde la unidad de ensayo de toxicología Battelle.

Los polvos procesados mediante URF se volvieron a dispersar en agua (10 mg/ml) seguido por sonicación durante 1 minuto antes de la dosificación. La nebulización de 3 ml de las dispersiones se realizó usando un nebulizador de microbomba Aeroneb Professional durante un período de dosificación de 10 minutos. Después de la dosificación pulmonar, los ratones fueron retirados del aparato de dosificación y descansaron durante 15 minutos. Se sacrificaron dos ratones en cada punto de tiempo mediante narcosis con CO₂ (0,5, 1, 2, 3, 6, 12, 24 y 48 horas). Se obtuvo sangre entera (alícuotas de 1 ml) mediante punción cardíaca y se analizó según el procedimiento ELISA estándar que se describe más adelante en la presente memoria. Además, se realizó una necropsia de cada ratón para extraer tejido pulmonar. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el ensayo. Las concentraciones de TAC en el tejido pulmonar se determinaron usando un ensayo HPLC según se ha descrito anteriormente.

Ensayo inmunoenzimático unido a enzimas (ELISA) para el análisis de las concentraciones de TAC en la sangre. La determinación de TAC en la sangre entera se realizó usando el kit de ensayo PRO-Trac™ II FK 506 ELISA (Diasorin Inc., Stillwater, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Específicamente, 50 µl de muestra de sangre entera o estándares se colocaron en un tubo cónico de polipropileno de 1,5 ml. El reactivo de digestión fue reconstituido y se añadieron 300 µl a todos los tubos. Los tubos se sometieron a agitación vorticial durante 30 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, estos tubos se colocaron en un bloque de calentamiento de aluminio por el que circulaba un baño de agua a 75°C durante 15 minutos, para detener la proteólisis. Después de una agitación vorticial, los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente a 1.800 xg durante 10 minutos. El sobrenadante (100 µl) se transfirió a pocillos de la placa de microtitulación, por duplicado, desde cada tubo centrifugado. Se añadió anticuerpo monoclonal anti-FK506 de captura (50 µl) a cada pocillo, y la placa se agitó a temperatura ambiente a 700 rpm durante 30 minutos. A continuación, se añadió conjugado de peroxidasa de rábano picante y TAC (50 µL) a cada pocillo, y la placa se agitó a temperatura ambiente a 700 rpm durante 60 minutos adicionales. La placa se lavó, antes de la adición de 200 µL de cromógeno. A continuación, la placa se agitó a 700 rpm durante otros 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción posterior en cada pocillo de la placa se terminó mediante la adición de 100 µl de solución de parada. La absorbancia de cada pocillo se leyó a las longitudes de onda duales de 450 y 630 nm. Los datos se representaron gráficamente según un programa de ajuste de curva logística de cuatro parámetros (4PL).

Extracción en fase sólida y análisis de fármacos de los tejidos pulmonares usando HPLC. La extracción del pulmón se realizó usando extracción en fase sólida para obtener los niveles de TAC usando HPLC de fase inversa. El peso total del pulmón se registró individualmente para cada ratón. Los tejidos pulmonares se homogeneizaron usando un homogeneizador rotor-estator Polytron (VWR Scientific Corporation, West Chester, PA) durante 40 segundos en 1 ml de solución salina normal. A continuación, las muestras de pulmón homogeneizadas se mezclaron con 0,5 ml de solución 0,4 N de heptahidrato de sulfato de cinc en la mezcla de la solución metanol/agua (70:30) y mezclado vorticial durante 30 segundos. Se añadió acetonitrilo (1 ml) a las muestras homogeneizadas antes de un mezclado vorticial adicional durante 1,5 minutos, seguido por centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos para obtener un sobrenadante transparente. A continuación, el sobrenadante se recogió en un vial limpio que contenía 1 ml de agua purificada. Mientras, se preacondicionaron cartuchos C18 para extracción en fase sólida (Supelco Inc., Bellefonte, PA). En primer lugar, estas columnas fueron tratadas previamente con 2 ml de acetonitrilo, seguido de 1 ml de metanol y, a continuación, se lavaron

con 1 ml de agua antes de cargar el sobrenadante a través de la columna. La muestra se transfirió y se extrajo lentamente a través de la columna reduciendo el vacío. La columna se lavó de nuevo pasando la mezcla de 1,5 ml de solución de metanol/agua (70:30), seguido de 0,5 ml de n-hexano y se dejó secar bajo vacío. La muestra se eluyó finalmente con 2 ml de acetonitrilo (0,5 ml x 4). El material eluido se evaporó bajo una corriente de nitrógeno seco y, a continuación, se reconstituyó con 250 µl de fase móvil usando el ensayo de HPLC descrito anteriormente (a continuación). Los datos se expresaron como µg TAC/gramo húmedo de tejido pulmonar analizado.

Farmacocinética y análisis estadístico. Se investigó la concentración en el tejido de pulmón en función del tiempo usando un modelo no compartimental, mientras que la concentración en sangre entera en función del tiempo se evaluó usando un análisis compartimental a partir de la administración extravascular (a través del compartimento pulmonar). Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando WinNonlin versión 4.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). El perfil farmacocinético de TAC se caracterizó por la concentración máxima (C_{max}), tiempo para C_{max} (T_{max}), vida media ($T_{1/2}$) y área-bajo-curva (ABC) entre 0-24 horas. El ABC se calculó usando la regla trapezoidal; C_{max} y T_{max} se determinaron a partir de los patrones de concentración-tiempo; $T_{1/2}$ se calculó usando la constante de tasa de eliminación (K_{e1}); K_{e1} se obtuvo a partir de los patrones de concentración-tiempo.

Caracterización *in vitro* de formulaciones URF. Las propiedades físico-químicas de los polvos de TAC producidos mediante URF se investigaron y compararon con el TAC no procesado. Los patrones de DRX de las formulaciones URF y el TAC no procesado se muestran en la Figura 4. El difractograma de URF-TAC era similar al del TAC no procesado, lo que indica un alto grado de cristalinidad. Sin embargo, el patrón de DRX de URF-TAC:LAC confirmó que esta composición era amorfa. Esto sugiere que la lactosa inhibió la cristalización de TAC. Es bien conocido que los azúcares, tales como lactosa, pueden ser usados para estabilizar fármacos amorfos, péptidos y proteínas durante el secado y posterior almacenamiento [30,31]. Se ha demostrado que la adición de azúcares prolonga la vida útil de los sistemas amorfos mediante la prevención de la cristalización. Además, la lactosa se considera generalmente como segura (GRAS) para su uso como excipiente en los sistemas de inhalación [32]. Esto es debido a sus propiedades no tóxicas y degradables después de la administración [33].

Las micrografías SEM de las dos formulaciones URF procesadas mostradas en la Figura 5 revelan diferencias claras en la morfología. La morfología de URF-TAC:LAC (Figura 5a-5b) mostró agregados nanoestructurados altamente porosos. La micrografía de alto aumento en la Figura 5b reveló que los agregados estaban compuestos de nanobastones interconectados ramificados con un diámetro de aproximadamente 100-200 nm. URF-TAC (Figura 5c-5d) aparecía como agregados más densos compuestos de partículas primarias submicrónicas. En contraste, la micrografía SEM del TAC no procesado indicó una placa de cristal densa y grande, irregular, que medía entre 50-100 µm de tamaño (Figura 5e). En consecuencia, las áreas superficiales obtenidas por las formulaciones procesadas mediante URF (URF-TAC:LAC y URF-TAC era de 25,9 y 29,3 m²/g, respectivamente) eran considerablemente mayores ($p < 0,05$) que la del fármaco no procesado (0,53 m²/g). Este resultado es corroborado por los agregados nanoestructurados porosos de los polvos URF observados mediante SEM.

El rendimiento *in vitro* de aerosol medido mediante impactación de cascada para dispersiones acuosas preparadas a partir de polvos procesados mediante URF se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3: Propiedades fisicoquímicas de composiciones de polvo de TAC preparadas mediante el procedimiento URF y características administración mediante aerosol de dispersiones acuosas de composiciones de polvo de URF mediante nebulización.

Formulaciones	Estado físico del fármaco	Área superficial (m ² /g)	TED (µg/min)	%FPF	MMAD (µm)	GSD
URF-TAC:LAC	Amorfo	29,3	5.082	74,6	2,57	2,24
URF-TAC	Cristalino	25,9	4.823	70,2	2,86	1,97
TED: dosis total emitida.						
MMAD: diámetros de masa media aerodinámicos.						

(Cont.)

GSD: desviación estándar geométrica.

PPF: fracción de partículas finas, como porcentaje de la dosis de carga total < 4,7 µm.

La comparación de los datos sugiere propiedades aerodinámicas similares de las partículas de fármaco aerosolizadas a partir de las dos formulaciones URF. El DMMA era de 2,86 y 2,57 µm por URF-TAC:LAC y URF-TAC, respectivamente, y el GSD era menor de 2,2 (Tabla 3). Puede concluirse que las gotas de aerosol contienen agregados de nanopartículas que se encuentran en el rango respirable mediante nebulización. El tamaño de partícula aerodinámico es el parámetro más importante en la determinación de la deposición del fármaco en los pulmones y debe tenerse en cuenta al desarrollar formulaciones para la administración por vía pulmonar [34]. Las partículas o gotitas aerosolizadas con un MMAD que varía entre 1 y 5 µm son adecuadas para una deposición pulmonar profunda, en el sitio de los alvéolos, donde puede tener lugar el máximo de absorción [35]. Las propiedades óptimas de aerosolización de ambas formulaciones URF se reflejan también en el alto %PPF que varía del 70% al 75%, que ilustra un suministro pulmonar eficaz de las partículas de fármaco. La TED era sólo ligeramente superior para URF-TAC:LAC (5.082 µg/min) en comparación con la de URF-TAC (4.823 µg/min). Estos valores no eran significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Los patrones de disolución *in vitro* del TAC en el medio SLF bajo condiciones de inmersión se muestran en la Figura 6. Las tasas de disolución para ambos polvos procesados mediante URF aumentaron significativamente ($p < 0,05$) en comparación con el TAC no procesado. Los agregados nanoestructurados de los polvos procesados mediante URF fueron capaces de humedecerse y disolverse rápidamente al entrar en contacto con el SLF que contenía el 0,02% de DPPC, aunque las formulaciones no contenían ningún agente tensioactivo. Para URF-TAC:LAC (es decir, agregados nanoestructurados amorfos), la disolución de TAC era del 72% en 30 minutos, en comparación con el 67% para URF-TAC (es decir, agregados nanoestructurados cristalinos) y el 30% para el TAC no procesado, respectivamente. La mejora es atribuida, más probablemente, a la alta porosidad y área superficial mejorada de los polvos procesados mediante URF.

También se llevó a cabo la disolución de TAC en condiciones sobresaturadas en los mismos medios. Los patrones de disolución sobresaturada de las formulaciones procesadas mediante URF que contenían 15 veces la solubilidad en equilibrio de TAC se comparan en la Figura 7. La concentración obtenida para URF-TAC:LAC excede la solubilidad de equilibrio de TAC, que corresponde a un alto grado de sobresaturación en el SLF que contiene DPPC sin la presencia de agentes tensioactivos o polímeros en la formulación. El nivel de sobresaturación correspondía a aproximadamente 11 veces la solubilidad en equilibrio. Esto era debido a la fase de alta energía de las partículas TAC amorfas. La concentración máxima se produjo en 1 hora y, a continuación, se redujo a aproximadamente 3 veces la solubilidad de equilibrio durante las siguientes 4 horas. No se observó un patrón de disolución de sobresaturación para URF-TAC debido a su naturaleza cristalina.

Estudios pulmonares *in vivo*. Los estudios farmacocinéticos de absorción se llevaron a cabo en ratones. El modelo murino ha sido muy eficaz para los estudios de inhalación a pequeña escala [36]. Los patrones de concentración de tejido pulmonar-tiempo después de una dosis única de inhalación se muestran en la Figura 8, mientras que los parámetros farmacocinéticos correspondientes se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Parámetros farmacocinéticos *in vivo* para las concentraciones de tejido pulmonar de las formulaciones URF.

Formulaciones	C _{max} (µg/g)	T _{max} (horas)	K _{el} (horas ⁻¹)	T _{1/2} (horas)	AUC ₍₀₋₂₄₎ (µg.hr/g)
URF-TAC	10,86±1,07	3	0,0346	20,02	111,19±20,16
URF-TAC:LAC	14,09±1,50	2	0,0334	20,75	122,42±6,19
C _{max} : concentración máxima T _{max} : tiempo para C _{max} K _{el} : constante de eliminación T _{1/2} : vida media AUC ₍₀₋₂₄₎ : área-bajo-curva entre 0-24 horas					

El valor C_{max} de URF-TAC:LAC era significativamente mayor (14,09 $\mu\text{g/g}$) en comparación con URF-TAC (10,86 $\mu\text{g/g}$), mientras que T_{max} fue significativamente menor ($p < 0,05$) durante 2 horas. Tal vez, esto podría ser el resultado de una mayor concentración disuelta, tal como se observa en los resultados *in vitro* de sobresaturación. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los valores AUC (0-24 h) entre las dos formulaciones URF ($p > 0,05$). Los resultados indicaron que la naturaleza amorfa de las partículas afecta a la velocidad de absorción del fármaco. El TAC en URF-TAC:LAC fue eliminado según un patrón bifásico con una fase de distribución y una fase de eliminación. Se encontró también el patrón de eliminación similar en URF-TAC. Los valores de K_{el} no fueron significativamente diferentes entre las dos formulaciones URF ($p > 0,05$). La concentración decreciente de TAC en el pulmón para ambas formulaciones URF es una consecuencia de la distribución y el transporte de fármaco en la circulación sistémica, así como la eliminación de partículas desde el pulmón. Se puede observar claramente que la transferencia de los agregados nanoestructurados (amorfos o cristalinos) desde el pulmón a la circulación sistémica era probablemente de una manera sostenida después de 6 horas. Los niveles medidos para ambas formulaciones URF a las 48 horas estaban por debajo del límite de cuantificación del ensayo (determinado para ser de 1 $\mu\text{g/g}$).

La farmacocinética sistémica *in vivo* de la absorción del fármaco desde los pulmones se investigó en ratones. La Figura 9 muestra una comparación de los patrones de concentración media en sangre entera-tiempo de cada formulación, y los parámetros farmacocinéticos calculados después de la administración por vía pulmonar se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Parámetros farmacocinéticos *in vivo* para las concentraciones de sangre entera de las formulaciones URF después de la administración por vía pulmonar.

Formulaciones	C_{max} (ng/g)	T_{max} (horas)	K_{el} (horas ⁻¹)	$T_{1/2}$ (horas)	AUC ₍₀₋₂₄₎ (ng.hr/ml)
URF-TAC	300,67±27,04	3	0,123	5,63	1324,35±318,07
URF.TAC:LAC	402,11±35,99	2	0,115	6,02	1235,66±65,86
C_{max} : concentración máxima T_{max} : tiempo para C_{max} K_{el} : constante de eliminación $T_{1/2}$: vida media AUC ₍₀₋₂₄₎ : área-bajo-curva entre 0-24 horas					

El patrón de concentración en sangre entera de cada formulación tiene un patrón de absorción similar, por ejemplo, T_{max} , en comparación con los patrones de concentración en pulmón (Figura 8). Sin embargo, ambas formulaciones URF demostraron concentraciones de TAC sustancialmente más bajas en la sangre de lo que se observó en el tejido pulmonar. Los patrones de sangre entera después de la dosificación pulmonar de URF-TAC:LAC y URF-TAC tenían concentraciones de pico de 402,11 ng/ml a las 2 horas y 300,67 ng/ml a las 3 h, respectivamente, antes de que las concentraciones disminuyeran. El valor AUC₍₀₋₂₄₎ (1235,66 ng.hr/ml) de URF-TAC:LAC procesada mediante URF era ligeramente menor que el de URF-TAC (1324,35 ng.hr/ml), aunque no hay diferencia estadística ($p > 0,05$). Los niveles de TAC disminuyeron rápidamente para URF-TAC:LAC con el último punto de tiempo con niveles detectables que se producen a las 24 h, mientras que URF-TAC se redujo de una manera similar, pero más lenta (sin diferencia significativa en los valores K_{el} ($p > 0,05$)). Las concentraciones de TAC en sangre entera estaban por debajo del límite de cuantificación para ambas formulaciones a las 48 horas. Las concentraciones sistémicas y pulmonares observadas después de la nebulización de ambas formulaciones URF en ratones sugieren que puede conseguirse una exposición pulmonar y sistémica sustancial a TAC en agregados nanoestructurados amorfos o agregados nanoestructurados cristalinos producidos mediante URF. La observación de que tanto las partículas amorfas como las cristalinas produjeron concentraciones sistémicas altas puede sugerir que el área superficial alta era un factor importante. La alta sobresaturación, como resultado de la administración de partículas amorfas en URF-TAC:LAC, estaba correlacionada con las tasas de absorción más rápidas tanto en la sangre como en el tejido pulmonar en comparación con las partículas cristalinas en URF-TAC. El uso del estado sobresaturado en los pulmones aún no ha sido estudiado con anterioridad. Sin embargo, se ha demostrado que mejora la absorción transdérmica y oral de fármacos poco solubles [37-39]. Los datos *in vivo* reportados por Yamashita et al. [37] mostraron una alta y prolongada absorción sistémica del TAC después de la administración oral de dispersiones sólidas amorfas con HPMC en perros beagle. En el estudio de Yamashita et al., la dispersión sólida de TAC con HPMC se preparó mediante evaporación del disolvente y se demostró también que se sobresaturaba en HCl 0,1 N hasta 25 veces en 2 horas, y este nivel se mantuvo durante más de 24 horas. En el estudio de los presentes inventores, la sobresaturación de TAC a partir de URF-TAC:LAC no mostró ningún efecto sobre el grado de absorción del fármaco tanto

en el tejido pulmonar como en la circulación sistémica. Esto puede explicarse por el hecho de que la sobresaturación se produjo durante un corto período de tiempo durante la fase de absorción y, a continuación, la concentración de TAC se redujo rápidamente en la fase de eliminación.

Los agregados nanoestructurados de alta área superficial que contenían nanopartículas amorfas o cristalinas de TAC fueron producidos mediante el procedimiento URF y mostraron ser eficaces pulverizados en una dispersión acuosa mediante nebulización. La inclusión de lactosa impidió la cristalización de TAC y resultó en polvo amorfo. URF-TAC:LAC (es decir, los agregados nanoestructurados amorfos) demostró la capacidad de sobresaturarse en SLF en comparación con URF-TAC (es decir, agregados nanoestructurados cristalinos). Las dispersiones de formulaciones URF nebulizadas exhibieron altas concentraciones pulmonares y sistémicas. El valor $AUC_{(0-24)}$ de las formulaciones URF, que refleja la cantidad total de fármaco absorbido en el período de tiempo de 24 h, no era significativamente diferente ($p > 0.05$) para ninguno de los patrones pulmonares o sanguíneos. Los resultados indican que la alta absorción de fármaco en el tejido pulmonar y la sangre después de la administración por vía pulmonar era debida principalmente a la gran área superficial de los agregados nanoestructurados a partir de ambas formulaciones. La capacidad para conseguir una alta solubilidad en los pulmones resultó en un mayor valor C_{max} y un menor valor T_{max} en base a los resultados de los estudios *in vivo*. Los presentes inventores han demostrado que las nanopartículas de TAC pueden ser administradas con éxito a los pulmones sin el uso de polímeros o surfactantes.

Ejemplo 1. Se produjo una formulación de tacrolimus (TAC) usando TAC y lactosa (LAC) en una relación 1:1. La formulación TAC: LAC 1:1 se preparó usando el procedimiento de congelación ultrarrápida (URF). Las composiciones se prepararon disolviendo TAC y LAC en una relación 1:1 y el 0,75% de sólidos en una mezcla 60/40 de acetonitrilo y agua. La solución de fármaco y excipiente se aplicó a la superficie de un sustrato sólido, que se enfrió usando un sustrato criogénico mantenido a -50°C . A continuación, se recogieron las composiciones congeladas y el disolvente se eliminó mediante liofilización usando un liofilizador VirTis Advantage (VirTis Company, Inc. Gardiner, Nueva York). Los polvos secos se almacenaron a temperatura ambiente bajo vacío.

Ejemplo 2. La composición en el Ejemplo 1 fue caracterizada usando difracción de rayos X (DRX) de los polvos. Los patrones de DRX de los polvos se analizaron usando un difractómetro de rayos X Philips 1710 con un objetivo de cobre y filtro de níquel (Philips Electronic Instruments, Mahwah, Nueva Jersey). Cada muestra se midió entre 5 y 45 grados 2θ usando un tamaño de paso de 0,05 grados 2θ y un tiempo de permanencia de un segundo. La composición es amorfa.

Ejemplo 3. La composición en el Ejemplo 1 fue caracterizada usando un análisis de área superficial específica BET. El área superficial específica se midió usando un instrumento Nova 2000 v 6.11 (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL). Se añadió un peso conocido de polvo a una celda de muestras Quantachrome de 12 mm y se desgasificó durante un mínimo de 3 horas. A continuación, los datos registrados se analizaron según la teoría BET usando el software NOVA v. 2.13 mejorado de reducción de datos. Los resultados mostraron que la composición tenía un área superficial específica BET de $25,9 \text{ m}^2/\text{g}$, en comparación con $0,53 \text{ m}^2/\text{g}$ para el TAC no procesado.

Ejemplo 4. La composición en el Ejemplo 1 fue caracterizada usando microscopía electrónica de barrido (SEM) con el fin de visualizar la morfología de las partículas producidas. Se usó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Hitachi S-4500 (Hitachi High-Technologies Corp., Tokio, Japón) para obtener micrografías SEM de las muestras de polvo. Las muestras se montaron en la cinta conductora y se revistieron mediante deposición usando un revestidor de pulverización catódica K575 (Emitech Products, Inc. Houston, TX) con oro/paladio durante 30 segundos. Se usó un voltaje de aceleración de 5-15 kV para observar las imágenes. Los resultados de la caracterización SEM de los polvos mostraron agregados nanoestructurados altamente porosos de TAC/LAC. La micrografía de alto aumento reveló que los agregados estaban compuestos de nanopartículas interconectadas con un diámetro de aproximadamente 100-200 nm.

Ejemplo 5. La composición en el Ejemplo 1 se ensayó para determinar sus características de disolución en condiciones de inmersión (definidas en la presente memoria como el 59% de la solubilidad de equilibrio en el medio de disolución) por debajo de la solubilidad de equilibrio de TAC. El ensayo de disolución en condiciones por debajo de la solubilidad de equilibrio se realizó sobre la formulación TAC:LAC usando un aparato de disolución de tipo 2 United States Pharmacopoeia (USP) 27 (Vankel VK6010 Dissolution Tester con un calentador/circulador Vanderkamp VK650A, Varian, Inc. Palo Alto, CA). Las muestras de polvo (0,4 mg de TAC) equivalentes a aproximadamente el 59% de la solubilidad en equilibrio ($6,8 \mu\text{g}/\text{ml}$) se añadieron a 100 ml de fluido pulmonar simulado modificado (SLF) con 0,02% de DPPC como medio de disolución. El medio de disolución se mantuvo a $37,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y se agitó a una velocidad constante de 100 rpm. Se retiraron muestras (1 ml) en los puntos de tiempo 10, 20, 30, 60, y 120 minutos, se filtraron usando un filtro Acrodisc GHP de $0,45 \mu\text{m}$ (WVR, Inc. Westchester, PA), y se analizaron usando un cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10 (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) equipado con una columna C18 Altech ODS-2, $5 \mu\text{m}$ (Altech Associates, Deerfield, IL). La fase móvil consistió en una mezcla 70:30 (v/v) de ACN:agua, usando un caudal de 1 ml/min. La absorbancia máxima se midió a la longitud de onda $\lambda = 214 \text{ nm}$. Los resultados del ensayo de disolución por debajo de la solubilidad de equilibrio se muestran en la Tabla 6:

Tiempo (min)	% de tacrolimus disuelto
0	0
10	41
20	59
30	73
60	82
120	94

Ejemplo 6. La composición en el Ejemplo 1 se ensayó para determinar sus características de disolución en condiciones sobresaturadas. Los patrones de disolución sobresaturada se generaron según el procedimiento descrito en el Ejemplo 5, usando el aparato de disolución de pequeño volumen equipado con un mecanismo de agitación de paletas. La formulación del fármaco se pesó de manera que correspondía a aproximadamente 15 veces la solubilidad cristalina acuosa de TAC en 100 ml del fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% de DPPC. La velocidad de la pala y la temperatura del baño se mantuvieron a 100 rpm y 37,0°C, respectivamente. Se retiró una alícuota (1 ml) del recipiente de pequeño volumen a los 10, 20, 30 y 60 minutos, a continuación, a las 2, 4 y 24 horas. Cada alícuota se filtró a través de un filtro de nylon de 0,2, μ m y una alícuota de 0,5 ml de cada solución se mezcló inmediatamente con 1 ml de acetonitrilo (para asegurar que no se produce re-cristalización del fármaco disuelto previamente a 37°C). Las muestras se analizaron para determinar la concentración de TAC usando el mismo procedimiento HPLC descrito en el Ejemplo 5. Los resultados para los ensayos de disolución sobresaturada se muestran a continuación, la Tabla 7.

Tabla 7.

Tiempo (min)	Conc. Relativa de TAC (C/Ceq)
0	0
10	5,3
20	6,9
30	9,7
60	10,6
120	6,7
240	3,1
1440	1,1

Ejemplo 7. La composición en el Ejemplo 1 se ensayó para determinar su rendimiento *in vivo* en ratones, usando la administración por vía pulmonar de la composición en el Ejemplo 1. La dosificación pulmonar de la formulación se realizó en ratones ICR sanos (Harlan Sprague Dawley, Indianápolis, IN). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Internacional sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación (IACUC) de la Universidad de Texas en Austin, y todos los animales se mantuvieron según Asociación Americana para la Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio. Los ratones se aclimataron en los tubos de retención (Battelle, Columbus, OH) durante 10-15 min/día durante 2 días antes de la dosificación. Se usó un aparato de dosificación de pequeños animales para la inhalación para administrar la dosis a los ratones para el estudio. El aparato de dosificación fue diseñado para albergar hasta 4 ratones por cada punto de tiempo de dosificación. El aparato de dosificación consistía en un tubo hueco de pequeño volumen con unas dimensiones de 20 X 4,5 cm con cuatro orificios adaptadores de 1,75 cm perforados a intervalos de 7 cm, con el fin de aceptar los tubos de retención de roedores desde la unidad de ensayo de toxicología Battelle. La composición del Ejemplo 1 se volvió a dispersar en agua (10 mg/ml) seguido por sonicación durante 1 minuto antes de la dosificación para preparar la suspensión de nebulización. La nebulización de 3 ml de la suspensión preparada se realizó usando un nebulizador de microbomba Aeroneb® Profesional durante 10 minutos. Después de la dosificación pulmonar, los ratones fueron retirados del aparato de dosificación y descansaron durante 15 minutos. Se sacrificaron dos ratones en cada punto

de tiempo mediante narcosis con CO₂ (0,5, 1, 2, 3, 6, 12, 24 y 48 horas). La sangre entera (alícuotas de 1 ml) se obtuvo mediante punción cardiaca y se analizó usando un PRO-Trac II FK 506 ELISA, siguiendo el procedimiento detallado en la literatura del kit de ensayo PRO-Trac II FK 506 ELISA (Diasorin, Inc. Stillwater, OK). Además, se realizó la necropsia de cada ratón para extraer tejido pulmonar. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta que se ensayaron. La concentración de TAC en el tejido pulmonar se determinó usando el procedimiento HPLC descrito en el Ejemplo 5. Los resultados para las concentraciones de TAC en sangre y tejido pulmonar se muestran en las Tablas 8 y 9:

Tabla 8. Concentraciones de TAC en sangre entera después de la administración por vía pulmonar:

Tiempo (hr)	Conc. TAC en Ratón 1 (ng/ml sangre)	Conc. TAC en Ratón 2 (ng/ml sangre)	Conc. Promedio de TAC (ng/ml sangre)
0	0	0	0
0,5	33,68	16,22	24,95, SD=8,73
1	254,97	281,42	268,20, SD=13,22
2	427,56	376,65	402,11, SD=25,45
3	155,70	86,72	121,21, SD=31,50
6	49,56	86,65	68,11, SD=18,55
12	26,25	11,13	18,68, SD=7,56
24	5,88	8,05	6,97, SD=1,09
48	N/A	N/A	N/A

Tabla 9. Concentraciones de TAC en tejido pulmonar después de la administración por vía pulmonar

Tiempo (hr)	Conc. TAC en Ratón 1 (µg/g peso pulmón)	Conc. TAC en Ratón 2 (µg/g peso pulmón)	Conc. Promedio de TAC (µg/g peso pulmón)
0	0	9	0
0,5	7,31	9,05	8,06, SD=0,99
1	11,41	12,27	10,10, SD=2,09
2	13,59	14,14	14,09, SD=1,50
3	6,73	8,61	8,22, SD=1,18
6	4,46	4,19	5,02, SD=1,00
12	5,95	6,11	4,80, SD=1,42
24	3,29	2,93	3,51, SD=0,59
48	N/A	N/A	N/A

Ejemplo 8. Se produjo una formulación de tacrolimus (TAC) usando TAC y glucosa (GLU) en una relación 1:1. La formulación TAC:GLU 1:1 se preparó usando el procedimiento de congelación ultrarrápida (URF). La composición se preparó disolviendo TAC y GLU en una relación 1:1 y el 0,75% de sólidos en una mezcla 60/40 de acetonitrilo y agua. La solución de fármaco y excipiente se aplicó a la superficie de un sustrato sólido, que se enfrió usando un sustrato criogénico mantenido a -50°C. A continuación, se recogieron las composiciones congeladas y el disolvente se eliminó mediante liofilización usando un liofilizador VirTis Advantage (VirTis Company, Inc. Gardiner, Nueva York). Los polvos secos se almacenaron a temperatura ambiente bajo vacío. El resultado de la caracterización de DRX (siguiendo el procedimiento en el Ejemplo 2) es que la formulación es amorfa. El resultado de SEM (siguiendo el procedimiento en el Ejemplo 4) es que la morfología es agregados nanoestructurados con pequeñas partículas primarias que consisten en

TAC y GLU con tamaños de partículas primarias de aproximadamente 100-300 nm.

Ejemplo 9. Se produjo una formulación de tacrolimus (TAC) usando TAC y manitol (MAN) en una relación 1:1. La formulación TAC:MAN 1:1 se preparó usando el procedimiento de congelación ultra-rápida (URF). La composición se preparó disolviendo TAC y MAN en una relación 1:1 y el 0,75% de sólidos en una mezcla 60/40 de acetonitrilo y agua. La solución de fármaco y excipiente se aplicó a la superficie de un sustrato sólido, que se enfrió usando un sustrato criogénico mantenido a -50°C. A continuación, se recogieron las composiciones congeladas y el disolvente se eliminó mediante liofilización usando un liofilizador VirTis Advantage (VirTis Company, Inc. Gardiner, Nueva York). Los polvos secos se almacenaron a temperatura ambiente bajo vacío. El resultado de la caracterización de DRX (siguiendo el procedimiento en el Ejemplo 2) es que la composición es amorfa. El resultado de SEM (siguiendo el procedimiento en el Ejemplo 4) es que la morfología es agregados nanoestructurados con pequeñas partículas primarias que consistían en TAC y MAN con tamaños de partículas primarias de aproximadamente 100-200 nm.

Ejemplo 10. Se produjo una formulación de tacrolimus (TAC) usando TAC e inulina (INL) en una relación 1:1. La formulación TAC:INL 1:1 se preparó usando el procedimiento de congelación ultrarrápida (URF). La composición se preparó diluyendo TAC e INL a una relación 1:1 y el 0,75% de sólidos en una mezcla 60/40 de acetonitrilo y agua. La solución de fármaco y excipiente se aplicó a la superficie de un sustrato sólido, que se enfrió usando un sustrato criogénico mantenido a -50°C. A continuación, se recogieron las composiciones congeladas y el disolvente se eliminó mediante liofilización usando un liofilizador VirTis Advantage (VirTis Company, Inc. Gardiner, Nueva York). Los polvos secos se almacenaron a temperatura ambiente bajo vacío. El resultado de la caracterización de DRX (siguiendo el procedimiento en el Ejemplo 2) es que la formulación es amorfa. El resultado de la visualización SEM (siguiendo el procedimiento en el Ejemplo 4) es que la morfología de la formulación es agregados nanoestructurados con pequeñas partículas primarias que consistían en TAC y INL con tamaños de partículas primarias de aproximadamente 100-200 nm.

Ejemplo 11. Con el fin de evaluar el aparato de dosificación de roedor usado en estos estudios, se llevó a cabo un estudio *in vitro* e *in vivo* del aparato usando itraconazol (ITZ). Se construyó un aparato de inhalación de dosificación para animales, que consistía en un tubo hueco (20 X 4,5 cm, espesor de pared nominal de 0,4 cm) con cuatro orificios adaptadores de 1,75 cm perforados a intervalos de 7 cm (2 orificios en cada lado). Los orificios adaptadores se construyeron para aceptar los tubos de retención de roedores desde la unidad de ensayo de toxicología Battelle. Una suspensión coloidal de ITZ fue nebulizada en el aparato durante 5 minutos usando un nebulizador de micro-bomba. Gotitas atomizadas que contenían ITZ fueron impulsadas dentro de la cámara a un caudal de 1 ml/min. Las concentraciones de ITZ se midieron *in vitro* en los 4 puertos adaptadores, e *in vivo* a partir de los pulmones de ratones ICR machos exogámicos en los tubos de retención de ratones apropiados en los puertos adaptadores. Los resultados *in vitro* mostraron que las concentraciones de ITZ (S.D.) eran de 3,35 (0,75) µg/ml en los puertos adaptadores después de 5 minutos de nebulización. Los resultados *in vivo* mostraron que las concentraciones pulmonares de ITZ eran 32 (3,0) µg/g de peso húmedo de pulmón (n = 8). Esto resultó ser tres veces mayor de lo que se había determinado anteriormente usando una unidad de exposición de cuerpo entero, sin retención, en la misma cepa de ratón con el doble de tiempo de exposición. Se consiguen altas concentraciones de ITZ en el pulmón de roedor con baja variabilidad. Puede usarse un nebulizador disponible comercialmente para períodos cortos de dosificación que niegan la necesidad de usar técnicas de dosificación invasivas y variables. Los datos para el estudio *in vivo* en ratones se muestran en la Tabla 10:

Tabla 10. Concentración de ITZ en el tejido pulmonar.

Ratón	Conc. ITZ en tejido pulmonar (µg/g)
Ratón 1	13,5
Ratón 2	15,9
Ratón 3	18,6
Ratón 4	19,2
Ratón 5	22,7
Ratón 6	21,6
Ratón 7	20,2
Ratón 8	18,3
Promedio	18,7, SD=3,0

Ejemplo 12. La composición en el Ejemplo 1 se ensayó para determinar su rendimiento *in vivo* en el modelo de ratón después de la administración de dosis múltiples. Se usó el aparato de dosificación descrito en el Ejemplo 7. También se usó la re-dispersión y la concentración de dosificación descritas en el Ejemplo 7; sin embargo, la dosificación se produjo una vez al día. Dos grupos de cuatro ratones fueron sacrificados por inhalación de isoflurano después de dosis múltiples. Un grupo de cuatro recibió 6 dosis, el otro recibió 13 dosis. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de administrada la última dosis y se tomaron muestras sanguíneas mínimas. Se extrajeron muestras de tejido pulmonar y sangre entera y se ensayaron tal como se describe en el Ejemplo 7. Los resultados para las concentraciones de TAC en sangre entera y tejido pulmonar se muestran en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11. Concentraciones de TAC en sangre entera después de la administración diaria por vía pulmonar en ratones

Día del sacrificio	Volumen promedio sangre (ml)	Conc. TAC promedio (ng/ml)	Cantidad de TAC en sangre (µg)
7	2,4	2,39	0,0057
14	2,4	2,649	0,0064

Tabla 12. Concentraciones pulmonares de TAC después de la dosificación pulmonar diaria en ratones

Día del sacrificio	Peso promedio de pulmón (g)	Conc. TAC promedio (µg/g)	Cantidad de TAC en pulmón (µg)
7	0,2205	7,19	1,585
14	0,2193	6,735	1,477

Ejemplo 13. El tejido pulmonar del estudio llevado a cabo en el Ejemplo 12 se sometió a examen histológico. Los pulmones se inflaron con una solución de formalina al 10% después del sacrificio, se ataron en la tráquea y se extrajeron. Se tomaron secciones de los pulmones, se tintaron y se incluyeron en parafina. Junto con los grupos de dosificación activa descritos en el Ejemplo 12, se evaluó un grupo de control dosificado con solución de lactosa durante 6 a 13 días. No se observó evidencia de daños en el tejido en ninguno de los casos. En las Figuras 10A-10D se muestran imágenes de la evaluación microscópica.

Ejemplo 14. La composición en el Ejemplo 1 se ensayó para determinar su rendimiento *in vivo* en el modelo de rata a una dosis baja en comparación con la dosis en el Ejemplo 7. La dosificación pulmonar de la formulación se llevó a cabo en ratas Sprague Dawley sanas (Harlan, Indianapolis IN). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Internacional sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación (IACUC) en la Universidad de Texas en Austin, y todos los animales se mantuvieron según Asociación Americana para la Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio. Las ratas se aclimataron en los tubos de retención (Battelle, Columbus, OH) durante 10-15 min/día durante 2 días antes de la dosificación. Se usa un aparato de dosificación de pequeños animales mediante inhalación para administrar la dosis a las ratas para el estudio. El aparato de dosificación fue diseñado para albergar hasta 4 ratas por punto de tiempo de dosificación. El aparato de dosificación consistía en un tubo hueco de pequeño volumen con dimensiones de 2 X 4,5 cm con cuatro orificios adaptadores de 1,75 cm perforados a intervalos de 7 cm y escalonados en cada lado, con el fin de aceptar los tubos de retención de roedores desde la unidad de ensayo de toxicología Battelle. La composición del Ejemplo 1 fue re-dispersada en agua (1,1 mg/ml) seguido por sonicación durante 1 minuto antes de la dosificación para preparar la suspensión de nebulización. La nebulización de 3 ml de suspensión preparada se realizó usando un nebulizador de microbomba Aeroneb® Profesional durante 10 minutos. Después de la dosificación pulmonar, las ratas se retiraron del aparato de dosificación, descansaron durante 1 hora, a continuación, se sometieron a eutanasia mediante narcosis de CO₂. Se extrajeron alícuotas de sangre entera y se ensayaron tal como se describe en el Ejemplo 7. Los resultados para las concentraciones totales de TAC en sangre se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Concentraciones de TAC en sangre entera después de la administración por vía pulmonar con una dosis reducida en ratas

Rata	Conc. TAC en sangre (ng/ml)
Rata 1	7,20

(Cont.)

Rata 2	1,53
Rata 3	4,42
Rata 4	2,50
Promedio	3,91, SD=2,5

Ejemplo 15. La composición en el Ejemplo 1 se ensayó para determinar su rendimiento *in vivo* en la rata después de la administración de dosis múltiples. Se usó el aparato de dosificación descrito en el Ejemplo 14. También se usó la re-dispersión y la concentración de dosificación descritas en el Ejemplo 14; sin embargo, la dosificación tuvo lugar una vez al día. Ocho ratas fueron sacrificadas mediante inhalación de isoflurano después de 21 dosis. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de administrar la última dosis y se tomaron muestras sanguíneas mínimas. Las muestras de sangre entera se analizaron según se describe en el Ejemplo 14. Los resultados para las concentraciones de TAC en sangre entera se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Concentraciones de TAC en sangre entera después de 21 días de administración continua por vía pulmonar en una dosis rebajada en ratas

Rata	Conc. TAC en sangre (ng/ml)
Rata 1	2,2096
Rata 2	1,8193
Rata 3	1,4874
Rata 4	2,7917
Rata 5	1,4187
Rata 6	1,4075
Rata 7	1,4874
Rata 8	1,3742
Promedio	1,75, SD=0,5

Ejemplo 16. La composición en el Ejemplo 1 se ensayó para determinar su rendimiento *in vivo* en un modelo de trasplante de pulmón de rata a la dosis rebajada usada en el Ejemplo 14. La dosificación pulmonar de la formulación se llevó a cabo en ratas Sprague Dawley sanas, con trasplante de pulmón (Harlan, Indianapolis IN). Se realizó una cirugía para reemplazar el pulmón izquierdo con un pulmón izquierdo sano de la misma especie. Las ratas descansaron al menos 7 días antes de que se les administrara la dosis. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Internacional sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación (IACUC) de la Universidad de Texas Health Science Center en San Antonio, y todos los animales se mantuvieron según la Asociación Americana para la Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio. La dosificación se llevó a cabo tal como se detalla en el Ejemplo 14; sin embargo, la eutanasia se realizó mediante necropsia de tejido después de la anestesia con isoflurano. Se extrajeron alícuotas de sangre entera de 3 ratas trasplantadas para dos puntos de tiempo y se analizaron tal como se describe en el Ejemplo 7. Los resultados para las concentraciones de TAC en sangre entera a las 6 y 12 horas eran de $2,97 \pm 0,3$ y $2,55 \pm 0,3$ ng/ml, respectivamente. Se recogieron también muestras de tejido pulmonar derecho e izquierdo y se analizaron para el contenido de TAC de 3 ratas trasplantadas en dos puntos de tiempo mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS). Brevemente, el tejido pulmonar se homogeneizó y las proteínas se precipitaron para separar el analito. Las muestras fueron sobrecargadas con un patrón interno para evaluar y corregir la eficiencia de la extracción. Los resultados para el TAC en el pulmón izquierdo (trasplantado) a las 6 y 12 horas eran de $319,8 \pm 80$ y $160,4 \pm 46$ ng/g, respectivamente. Los resultados para la concentración de TAC en el pulmón derecho a las 6 y 12 horas eran de $125,0 \pm 5$ y $62,6,4 \pm 17$ ng/g, respectivamente.

Ejemplo 17. La composición en el Ejemplo 1 se ensayó para determinar su rendimiento *in vivo* en un modelo de trasplante de pulmón de rata descrito en el Ejemplo 16, con la dosis rebajada usada en el Ejemplo 14. Después del sacrificio, se extrajeron los pulmones y se seccionaron en partes de vías respiratorias proximales y partes de vías

respiratorias distales. Estas secciones se analizaron para determinar el porcentaje de TAC total en el pulmón según la masa mediante LC/MS según el Ejemplo 16. Los resultados para la parte proximal derecha, distal derecha, proximal izquierda y distal izquierda en 3 ratas con trasplante de pulmón en el punto de tiempo a las seis horas eran de $4,0 \pm 6\%$, $49,3 \pm 4\%$, $33,6 \pm 4\%$ y $13,1 \pm 5\%$ del TAC total depositado, respectivamente. En una única rata no trasplantada en el mismo estudio, los resultados para la parte proximal derecha, distal derecha, proximal izquierda y distal izquierda en el punto de tiempo a las seis horas eran del 2,6%, 49,0%, 25,1% y 23,3% del TAC total depositado, respectivamente.

Ejemplo 18. La composición en el Ejemplo 1 se ensayó para determinar su rendimiento *in vitro* en un análisis de respuesta inmune en cultivo mixto de linfocitos (CML). Este ensayo se inicia cultivando células de médula ósea a partir de un huésped trasplantado con células de un donante de trasplante. Se evaluó la proliferación de los linfocitos en este cultivo para determinar la histocompatibilidad sin tacrolimus, después de la adición de Prograf® disuelto en etanol, y después de la adición de la composición TAC:LAC dispersada en agua. El porcentaje de inhibición se determinó con relación al recuento de linfocitos en el cultivo sin la presencia de tacrolimus. Se calculó una inhibición promedio después de cuatro iteraciones. Se encontró que a dosis equivalentes, Prograf® disuelto en etanol inhibió la proliferación de linfocitos en un 45%, mientras que TAC:LAC dispersada en agua inhibió la proliferación en un 86%.

Referencias

Hooks, M. A. (1994) Tacrolimus, A New Immunosuppressant - A review of the literature. Ann. Pharmacother.. 28, 501-511.

Waldrep, J. C. (1998) New aerosol drug delivery systems for the treatment of immune-mediated pulmonary diseases. Drugs of Today 34, 549-561.

Loser, K., Balkow, S., Higuchi, T., Apelt, J., Kuhn, A., Luger, T. A., y Beissert, S. (2006) FK506 Controls CD40L-Induced Systemic Autoimmunity in Mice 126, 1307-1315.

Tacca, M. D. (2004) Prospects for personalized immunosuppression: pharmacologic tools--a review. Transplant. Proc. 36, 687-689.

Jain, A. B., and Fung, J. J. (1996) Cyclosporin and tacrolimus in clinical transplantation - A comparative review. Clinical Immunotherapeutics 5, 351-373.

Tamura, S., Tokunaga, Y., Ibuki, R., Amidon, G. L., Sezaki, H., y Yamashita, S. (2003) The Site-Specific Transport and Metabolism of Tacrolimus in Rat Small Intestine. J Pharmacol Exp Ther 306, 310-316.

Venkataramanan R, J. A., Warty VW, et al. (1991) Pharmacokinetics of FK506 following oral administration: a comparison of FK506 and cyclosporine. Transplant. Proc. 23, 931-933.

Venkataramanan, R., Swaminathan, A., Prasad, T., Jain, A., Zuckerman, S., Warty, V., McMichael, J., Lever, J., Burckart, G., y Starzl, T. (1995) Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. Clin. Pharmacokinet. 29, 404-430.

Kawashima, Y. (2001) Nanoparticulate systems for improved drug delivery. Adv. Drug Deliv. Rev. 47, 1-2.

Grenha, A., Seijo, B., and Remunan-Lopez, C. (2005) Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. Eur. J. Pharm. Sci. 25, 427-437.

Taylor, K. M. G., y McCallion, O. N. M. (1997) Ultrasonic nebulisers for pulmonary drug delivery. Int. J Pharm. 153, 93-104.

Martinet, Y., Pinkston, P., Saltini, C., Spurzem, J., Muller-Quernheim, J., y Crystal, R. G. (1988) Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* effects of cyclosporine on the lung T-lymphocyte alveolitis of active pulmonary sarcoidosis. Am. Rev. Respir. Dis. 138, 1242-1248.

McConville, J. T., Overhoff, K. A., Sinswat, P., Vaughn, J. M., Frei, B. L., Burgess, D. S., Talbert, R. L., Peters, J. L., Johnston, K. P., y Williams, R. O. (2006) Targeted high lung concentrations of itraconazole using nebulized dispersions in a murine model. Pharmaceutical Research 23, 901-911.

Steckel, H., Eskandar, F., y Witthohn, K. (2003) The effect of formulation variables on the stability of nebulized aviscumine. Int. J Pharm. 257, 181-194.

Fu, J., Fiegel, J., Krauland, E., y Hanes, J. (2002) New polymeric carriers for controlled drug delivery following inhalation or injection. Biomaterials 23, 4425-4433.

Brambilla, G., Ganderton, D., Garzia, R., Lewis, D., Meakin, B., y Ventura, P. (1999) Modulation of aerosol clouds produced by pressurised inhalation aerosols. Int. J Pharm. 186, 53-61.

- Keenan, R. J., Zeevi, A., Iacono, A. T., Spichty, K. J., Cai, J. Z., Yousem, S. A., Otori, P., Paradis, I. L., Kawai, A., y Griffith, B. P. (1995) Efficacy of inhaled cyclosporine in lung transplant patients with refractory rejection: correlation of intragraft cytokine gene expression with pulmonary function and histologic characteristics. *Surgery* 118, 385-392.
- 5 Keenan, R. J., Duncan, A. J., Yousem, S. A., Zenati, M., Schaper, M., Dowling, R. D., Alarie, Y., Burckart, G. J., y Griffith, B. P. (1992) Improved immunosuppression with aerosolized cyclosporine in experimental pulmonary transplantation. *Transplantation* 53, 20-25.
- Blot, F., Tavakoli, R., Sellam, S., Epardeau, B., Faurisson, F., Bernard, N., Becquemin, M.-H., Frachon, I., Stem, M., Pocidalo, J.-J., Carbon, C., Bisson, A., y Caubarrere, I. (1995) Nebulized cyclosporine for prevention of acute pulmonary allograft rejection in the rat: Pharmacokinetic and histologic study. *J. Heart Lung Transplant.* 14, 1162-1172.
- 10 Waldrep, J. C., Arppe, J., Jansa, K. A., y Vidgren, M. (1998) Experimental pulmonary delivery of cyclosporin A by liposome aerosol. *Int. J. Pharm.* 160, 239-249.
- Rogers TL, Nelsen AC, Hu J, Johnston KP, Williams III RO. (2002) A novel particle engineering technology to enhance dissolution of poorly water soluble drugs: spray-freezing into liquid. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54: 271-280.
- 15 Rogers TL, Hu J, Yu Z, Johnston KP, Williams III RO. (2002) A novel particle engineering technology: spray-freezing into liquid. *Int. J. Pharm.* 242: 93-100.
- Rogers TL, Nelsen AC, Sarkari M, Young TJ, Johnston KP, Williams III RO. (2003) Enhanced aqueous dissolution of a poorly water soluble drug by novel particle engineering technology: Spray-freezing into liquid with atmospheric freeze-drying. *Pharm. Res.* 20: 485-493.
- 20 Rogers TL, Overhoff KA, Shah P, Johnston KP, Williams III RO. (2003) Micronized powders of a poorly water soluble drug produced by a spray-freezing into liquid-emulsion process. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55: 161-172.
- Hu, J., Johnston, K. P., Williams III, R. O. (2004) Stable amorphous danazol nanostructured powders with rapid dissolution rates produced by spray freezing into liquid. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30: 695-704.
- Yu Z, Rogers TL, Hu J, Johnston KP, Williams III RO. (2002) Preparation and characterization of microparticles containing peptide produced by a novel process: spray freezing into liquid. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54: 221-228.
- 25 Evans, J. C., Scherzer, B. D., Tocco, C. D., Kupperblatt, G. B., Becker, J. N., Wilson, D. L., Saghir, S., and Elder, E. J.: Preparation of nanostructured particles of poorly water soluble drugs via a novel ultrarapid freezing technology. In *Polymeric Drug Delivery II: Polymeric Matrices and Drug Particle Engineering*, vol. 924, pp. 320-328, 2006.
- Overhoff, K. A., Engstrom, J. D., Chen, B., Scherzer, B. D., Milner, T. E., Johnston, K. P., y III, R. O. W. Novel Ultra-rapid Freezing Particle Engineering Process for Enhancement of Dissolution Rates of Poorly Water Soluble Drugs. in press. 2006.
- 30 Davies, N. M., and Feddah, M. R. (2003) A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products. *Int. J. Pharm.* 255, 175-187.
- D.J. Van Drooge, W. L. J. H., H.W. Frijlink, (2004) Incorporation of lipophilic drugs in sugar glasses by lyophilization using a mixture of water and tertiary butyl alcohol as solvent. *J. Pharm. Sci.* 93, 713-725.
- 35 Eriksson, J. H. C., Hinrichs, W. L. J., de Jong, G. J., Somsen, G. W., and Frijlink, H. W. (2003) Investigations into the Stabilization of Drugs by Sugar Glasses: III. The Influence of Various High-pH Buffers. *Pharm. Res.* 20, 1437-1443.
- Bosquillon, C., Lombry, C., Preat, V., y Vanbever, R. (2001) Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance. *J. Control. Release* 70, 329-339.
- 40 Wierik, H., y Diepenmaat, P. (2002) Formulation of lactose for inhaled delivery systems. *Pharm. Tech. Eur.* 11, 1-5. de Boer, A. H., Gjaltema, D., Hagedoorn, P., and Frijlink, H. W. (2002) Characterization of inhalation aerosols: a critical evaluation of cascade impactor analysis and laser diffraction technique. *Int. J. Pharm.* 249, 219-231.
- Zeng, X. M., Martin, G. P., and Marriott, C. (1995) The controlled delivery of drugs to the lung. *Int. J. Pharm.* 124, 149-164.
- Miller, F. J., Mercer, R. R., y Crapo, J. D. (1993) Lower Respiratory-Tract Structure of Laboratory-Animals and Humans - Dosimetry Implications. *Aerosol Sci. Tech.* 18, 257-271.
- 45 Yamashita, K., Nakate, T., Okimoto, K., Ohike, A., Tokunaga, Y., Ibuki, R., Higaki, K., y Kimura, T. (2003) Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus. *Int. J. Pharm.* 267, 79-91.

Gao, P., Guyton, M. E., Huang, T., Bauer, J. M., Stefanski, K. J., y Lu, Q. (2004) Enhanced Oral Bioavailability of a Poorly Water Soluble Drug PNU-91325 by Supersaturatable Formulations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30, 221-229.

Iervolino, M., Cappello, B., Raghavan, S. L., y Hadgraft, J. (2001) Penetration enhancement of ibuprofen from supersaturated solutions through human skin. *Int. J Pharm.* 212, 131-141.

REIVINDICACIONES

1. Una composición adecuada para la administración por vía pulmonar que comprende:

un agregado nanoestructurado de disolución rápida, de alta potencia, sustancialmente amorfo, que comprende tacrolimus y una matriz estabilizadora que comprende, opcionalmente, un agente tensioactivo polimérico o no polimérico, un sacárido polimérico o no polimérico o ambos,

en el que el agregado comprende un área superficial mayor de $5 \text{ m}^2/\text{g}$ medida mediante análisis BET y exhibe sobresaturación durante al menos 0,5 horas cuando se añade de 11 a 15 veces la solubilidad cristalina acuosa de tacrolimus a un fluido pulmonar simulado.

2. Composición según la reivindicación 1, **caracterizada porque** el fluido pulmonar simulado comprende 100 ml de fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% p/v de L- α -dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) mantenido a 37°C y agitado con una velocidad de paleta de 100 rpm en un aparato de disolución de pequeño volumen.

3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada porque** más de aproximadamente el 80% del fármaco se disuelve en aproximadamente 1 hora cuando se añade una cantidad equivalente a aproximadamente 0,59 veces la solubilidad cristalina acuosa de tacrolimus a 100 ml de fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% p/v de DPPC mantenido a 37°C y agitado a una velocidad de paleta de 100 rpm en un aparato de disolución de pequeño volumen.

4. Composición según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** la sobresaturación se produce durante al menos 1, 2, 3 o 4 horas.

5. Composición según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** el agregado nanoestructurado muestra una solubilidad mayor que la solubilidad cristalina en el fluido pulmonar simulado modificado con 0,02% p/v de DPPC mantenido a 37°C y agitado con una velocidad de paleta de 100 rpm en un aparato de disolución de pequeño volumen.

6. Composición según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** el agregado comprende una deposición pulmonar de más de aproximadamente 0,10 $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo de tejido pulmonar completo cuando se administra mediante nebulización a un ratón con un peso de entre 16 y 32 g usando el aparato de dosificación pre-clínico para roedores.

7. Composición según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** el agregado nanoestructurado comprende un área superficial mayor de aproximadamente $10 \text{ m}^2/\text{g}$, preferentemente mayor de 20 ó 30 m^2/g .

8. Composición según las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** el agregado nanoestructurado es proporcionado para una liberación inmediata, liberación prolongada, liberación pulsante, liberación retardada, liberación controlada y sus combinaciones.

9. Composición según las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada porque** una dispersión para la nebulización es preparada mezclando el agregado nanoestructurado con un vehículo acuoso y es nebulizada mediante un nebulizador, un nebulizador de chorro de aire, un nebulizador ultrasónico o un nebulizador de micro-bomba, preferentemente en la que la fracción respirable de las gotitas nebulizadas es mayor de aproximadamente el 40, 50, 60, 70 u 80% medida mediante un impactador de cascada no viable de 8 etapas Thermo-Electron (anteriormente Anderson) a un caudal de aire de 28,3 l/min.

10. Composición según las reivindicaciones 1 a 9, adaptado de manera adecuada para la administración usando un dispositivo de administración de dosis medida presurizada o para la administración usando un dispositivo de inhalación de polvo seco.

11. Composición según las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizada porque** el agregado nanoestructurado sustancialmente amorfo es preparado mediante aerosol de congelación, congelación en líquido, congelación por pulverización en vapor, congelación ultra-rápida o secado por pulverización, o mediante precipitación con disolventes, precipitación con antidisolventes, precipitación continua o precipitación evaporativa en una solución acuosa.

12. Composición según las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además un vehículo farmacéutico que comprende un hidrato de carbono, sal orgánica, aminoácido, péptido o proteína que produce un polvo tras la congelación por pulverización en líquido o congelación ultra-rápida y/o un vehículo farmacéutico que comprende un hidrato de carbono seleccionado de entre el grupo que consiste en manitol, rafinosa, lactosa, maltodextrina, trehalosa y sus combinaciones.

13. Composición según las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizada porque** el agregado nanoestructurado comprende uno o más dominios de nanopartículas altamente humectables, o en el que el agregado nanoestructurado humedece rápidamente y se disuelve en una solución acuosa, o en el que el tacrolimus se disuelve en un disolvente o mezcla de co-disolventes capaz de disolver todos los componentes de la composición junto con un vehículo farmacéutico, en el que un polvo seco que tiene caprolimus presente en partículas individuales a entre el 5% y el 99% en peso es producido después

de la congelación por pulverización en líquido o congelación ultra rápida.

14. Un procedimiento de preparación de una composición pulmonar que comprende:

- 5 mezclar tacrolimus con un agente tensioactivo, una matriz estabilizadora o una combinación o un agente tensioactivo y la matriz estabilizadora; y congelar ultra-rápidamente el tacrolimus y el tensioactivo/la matriz estabilizadora dando una nanopartícula de rápida disolución, de alta potencia, amorfa, mediante congelación por pulverización en líquido o congelación ultra-rápida, en el que la nanopartícula comprende un área superficial mayor de $5 \text{ m}^2/\text{g}$ medida mediante análisis BET y exhibe sobresaturación durante al menos 0,5 horas cuando se añade de 11 a 15 veces la solubilidad cristalina acuosa de tacrolimus a un fluido pulmonar simulado modificado, preferentemente definido adicionalmente como en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.
- 10 15. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, preferentemente tal como se obtiene mediante un procedimiento según la reivindicación 14, para la fabricación de una composición farmacéutica para reducir el rechazo de transplante en un sujeto, tratando el sujeto con una cantidad eficaz de la composición de nanopartículas de tacrolimus para prevenir un rechazo de transplante, preferentemente
 en la que la partícula de tacrolimus está adaptada para la administración por vía pulmonar,
- 15 es proporcionada para prevenir el rechazo de un transplante de pulmón, y/o
 es proporcionada a entre 0,1 mg/ml a 100 mg/ml.

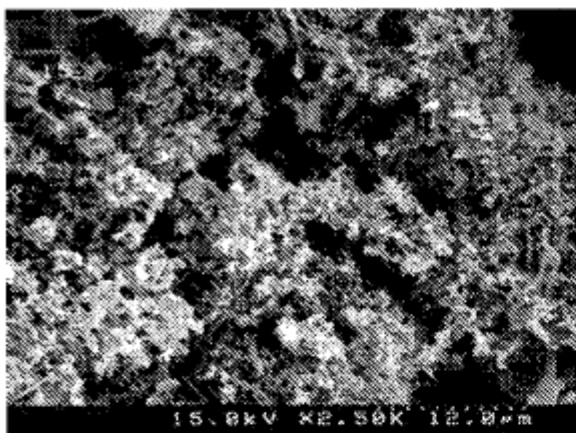


FIGURA 1A

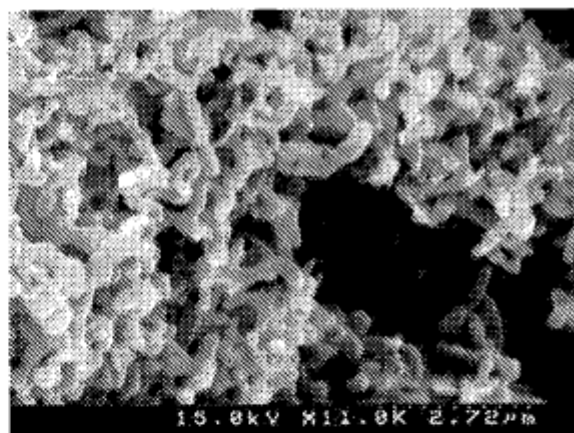


FIGURA 1B

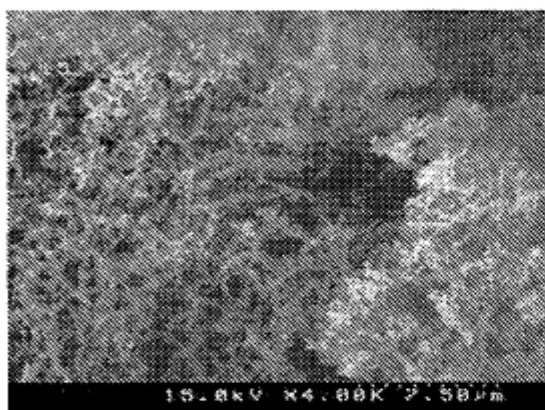


FIGURA 2A

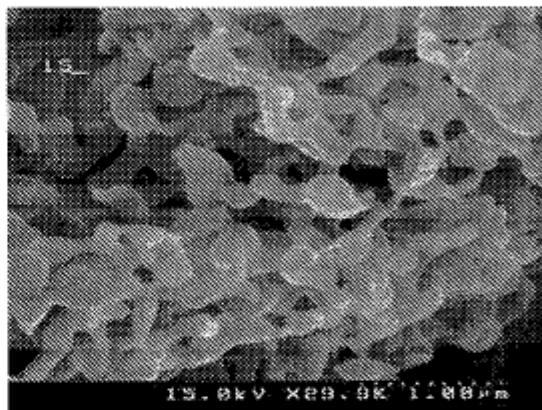


FIGURA 2B

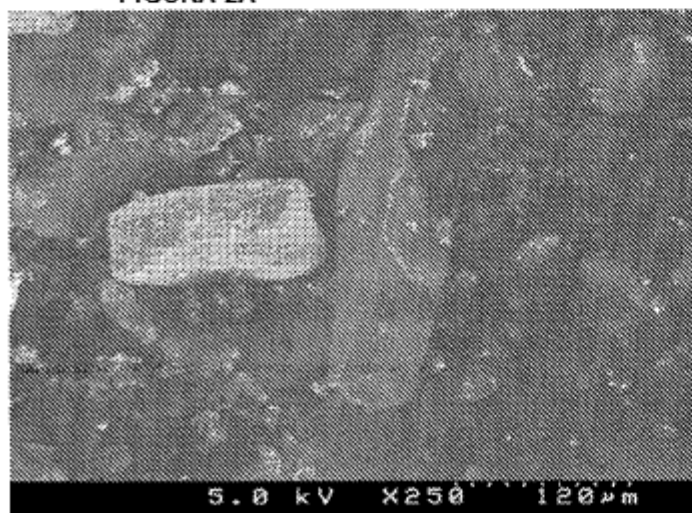


FIGURA 3

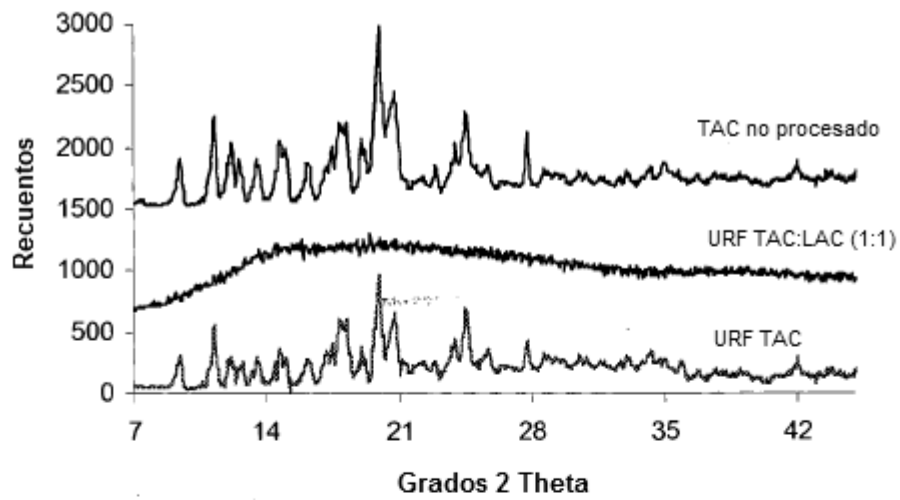


FIGURA 4

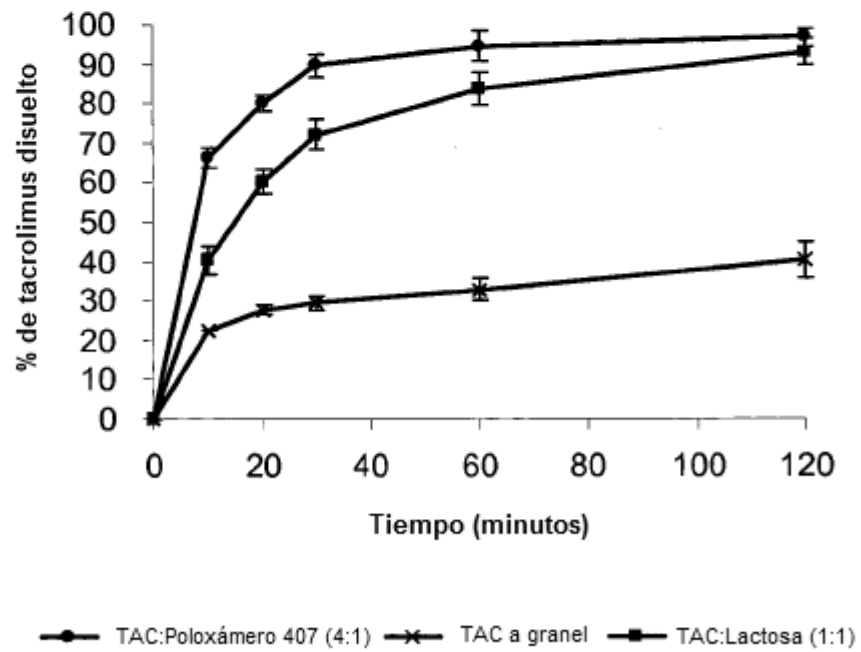


FIGURA 5

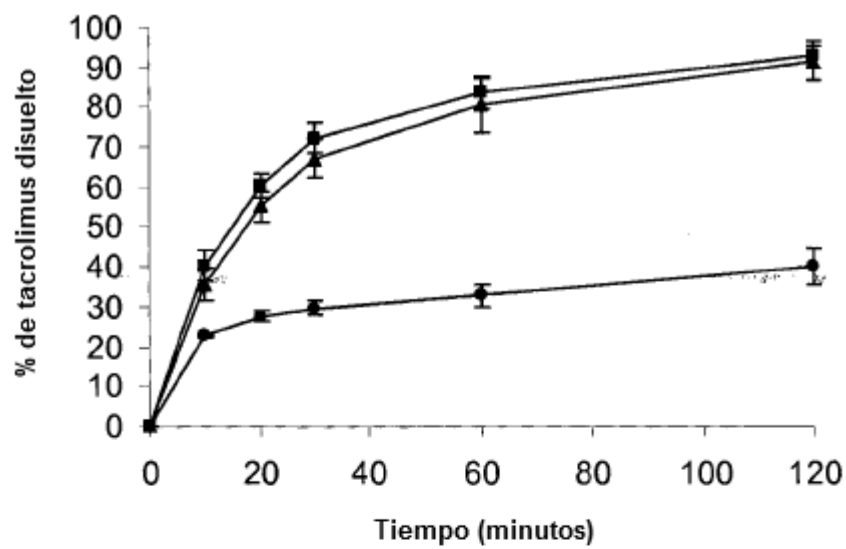


FIGURA 6

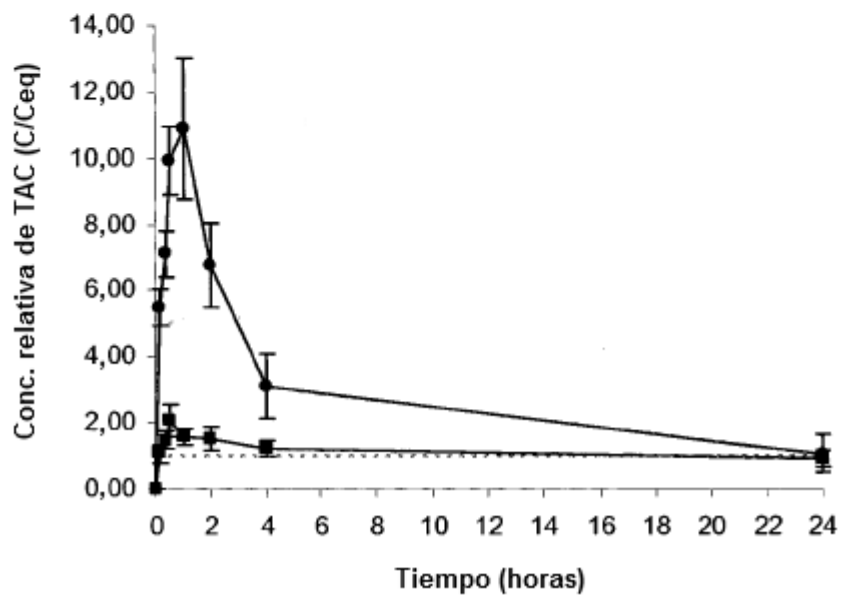


FIGURA 7

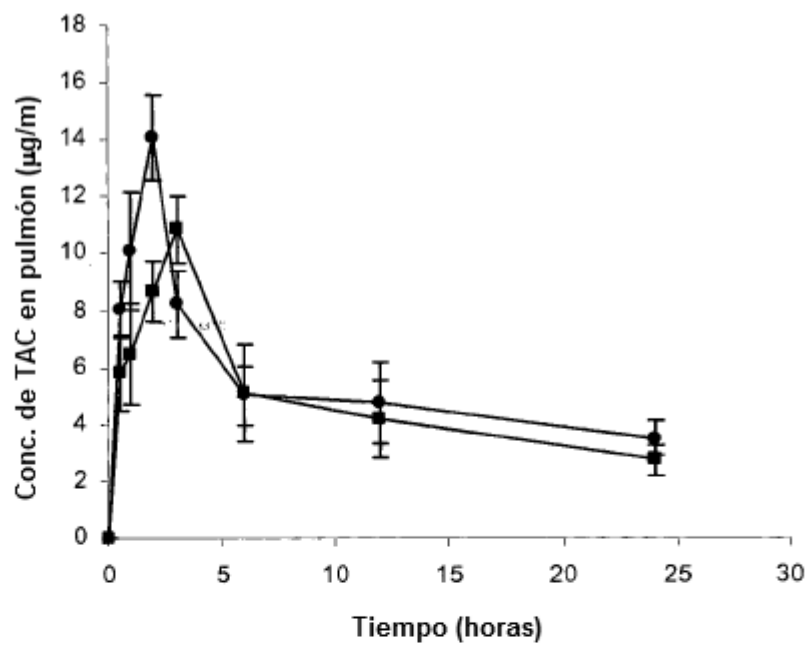


FIGURA 8

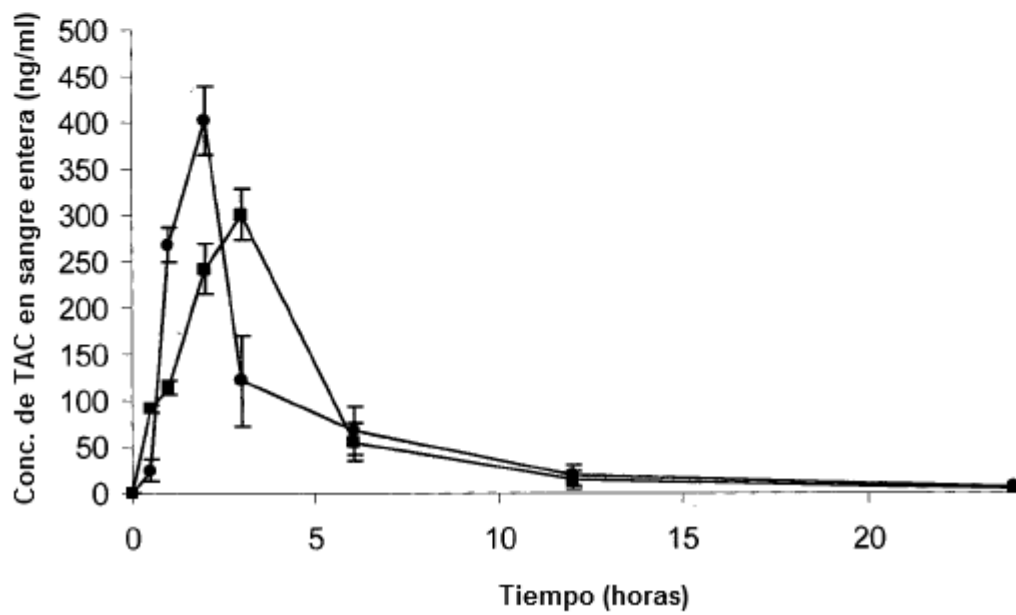


FIGURA 9

FIGURA 10A:

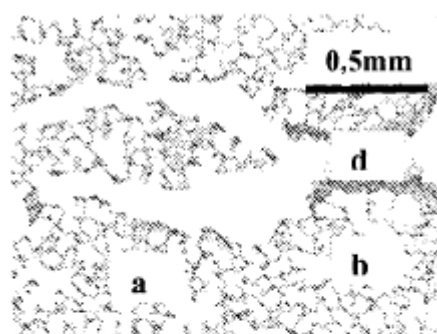


FIGURA 10B:

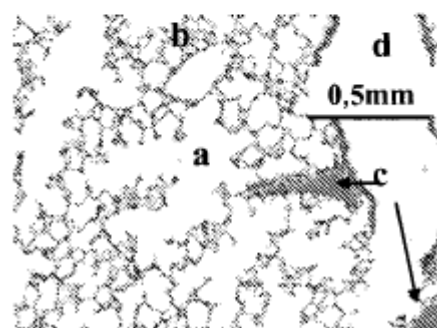


FIGURA 10C:

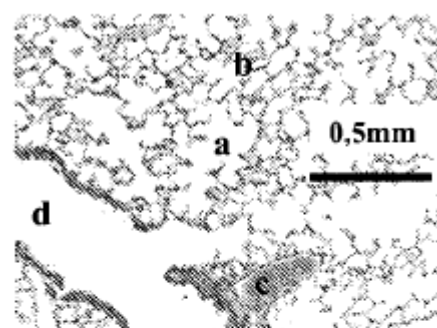


FIGURA 10D:

