

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 594 901

61 Int. Cl.:

A61K 47/02 (2006.01)
A61K 31/43 (2006.01)
A61K 31/7036 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12 TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 17.07.2012 PCT/EP2012/063995
- (87) Fecha y número de publicación internacional: 24.01.2013 WO13011019
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 17.07.2012 E 12735554 (3)
- (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 06.07.2016 EP 2734203
 - 54 Título: Composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias
 - (30) Prioridad:

21.07.2011 DE 102011108227

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 23.12.2016

(73) Titular/es:

EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITÄTSKLINIKUM (100.0%) Geissweg 3 72076 Tübingen, DE

(72) Inventor/es:

DOERING, GERD; RIETHMUELLER, JOACHIM Y HERRMANN, GLORIA

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias

20

35

40

55

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica, así como a la utilización de la misma para el tratamiento de una enfermedad respiratoria.

El desarrollo de conceptos de tratamiento eficaces en el caso de infecciones de las vías respiratorias representa uno de los mayores retos en nuestro tiempo. Esto es válido especialmente para enfermedades pulmonares bacterianas crónicas como se dan en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (en inglés: "chronic obstructive pulmonary disease", COPD) o fibrosis cística (inglés: "cystic fibrosis", CF).

COPD es una perturbación progresiva crónica del parénquima pulmonar de la cual está afectada aproximadamente 9% de la población. Desde el punto de vista global, COPD es la cuarta causa de muerte más frecuente, que en el año 2003 fue responsable de 2,7 millones de casos de muerte. El daño pulmonar progresivo facilita las infecciones pulmonares bacterianas, la cuales influyen negativamente sobre la perturbación de la función pulmonar. Aproximadamente 10% de los pacientes con COPD avanzada padecen bajo una infección pulmonar crónica con *Pseudomonas aeruginosa*. Otras bacterias patógenas oportunistas comprenden *H. influenzae (NTHI), Moraxella catarrhalis, Streptococcus pneumoniae y* anaerobias, no tipificables, que se pueden detectar en las vías aéreas de aproximadamente 20 a 25% de los pacientes de COPD clínicamente estables.

También en el caso de la enfermedad hereditaria CF las infecciones pulmonares bacterianas crónicas, hereditarias, adquiridas de forma secundaria, llevan a una menor esperanza de vida. En todo el mundo se estima que existen 100.000 pacientes de CF, de los cuales la mayor parte padece infecciones pulmonares crónicas. Investigaciones más recientes han demostrado que en las vías aéreas de los pacientes de CF existen muchas especies de diferentes bacterias, entre ellas *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*, NTHI, cepas complejas de *Burkholderia cepacia, Acinetobacter baumanii*, así como otras muchas especies de bacterias estrictamente anaerobias tales como *Prevotella intermedia*.

Tanto en el caso de pacientes de COPD como también de pacientes de CF las infecciones pulmonares bacterianas persistentes conducen a la entrada de granulocitos neutrófilos de la sangre en las vías respiratorias afectadas, por lo que se forman placas viscosas de muco. Por ello se reduce la autolimpieza del pulmón a través de la actividad de los cilios y se disminuye la eficacia de los antibióticos. Las actividades disminuidas de los antibióticos facilitan, además, la creación de resistencia en las bacterias, especialmente cuando se administra solo un único antibiótico. Esto favorece nuevamente su persistencia e incremente la morbilidad, así como la mortandad de los pacientes.

30 En pacientes de CF las infecciones pulmonares por *Pseudomonas aeruginosa* se tratan predominantemente con diferentes antibióticos. En el caso de pacientes de COPD no existen estrategias terapéuticas racionales en este contexto.

La desventaja de las actuales estrategias terapéuticas para pacientes de CF consiste en que la mayoría de los demás patógenos bacterianos, que junto a *Pseudomonas aeruginosa* en las vías respiratorias de los pacientes contribuyen a la enfermedad pulmonar, son pasados por alto.

Tampoco las terapias basadas en antibióticos empleadas hoy en día para el tratamiento de pacientes de COPD se han acreditado hasta el momento.

Ghannam et al. (2009), Inhaled Aminoglycosides in Cancer Patients With Ventilator-Associated Gram-Negative Bacterial Peumonia: Safety and Feasibility in the Era of Escalating Drug Resistance, Eur. J. Microbial. Infect. Dis. 28:253-259, describen un estudio retrospectivo, en la que se examinó la administración de aminoglucósidos y colistina en pacientes de cáncer con neumonía bacteriana gram-negativa asociada al ventilador. En este caso, al paciente obtuvo la administración combinada de colistina y tobramicina por inhalación y, además, sistémicamente imipenem.

Pintado et al. (2008), Intravenous Colistin Sulphomethate Sodium for Therapy of Infections Due to Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria, Journal of Infection 56:185-190, describen un estudio retrospectivo en el cual se examina la administración intravenosa de colistina para la terapia de infecciones por bacterias gram-negativas multiresistentes. Se menciona también que 15 pacientes obtuvieron, además, en combinación beta-lactamas y aminoglucósidos. Como ejemplos de beta-lactamas se citan, entre otros, imipenem y meropenem. Como ejemplos de aminoglucósidos se citan Tobramicina y Amikacina.

Akindipe et al. (2007), Left Pneomonectomy in a Patient With a Chronocally Infected Allograft, describen una terapia en una persona con una grave enfermedad pulmonar, en la cual se administración por vía intravenosa meropenem, tobramicina, así como colistina por inhalación.

Ante este panorama, es objeto fundamental de la invención poner a disposición una composición farmacéutica, con la cual se puedan disminuir, preferentemente evitar, los inconvenientes del estado de la técnica anteriormente citados.

ES 2 594 901 T3

Este problema se soluciona mediante una composición farmacéutica que presenta una combinación de al menos un carbapenem, una polimixina y un aminoglucósido, así como un excipiente farmacéuticamente aceptable, diseñada para una administración por vía inhalativa.

Los carbapenemos, designados en un principio como tienamicinas, son antibióticos denominados de β-lactama con un amplio espectro de actividad. Representantes importantes son imipenem, ertapenem, meropenem y doripenem. Los carbapenemos inhiben la síntesis de la pared celular de las bacterias por unión a proteínas de unión de penicilina.

Las polimixinas forman un grupo de antibióticos polipeptídicos, que químicamente representan decapéptidos cíclicos, ramificados. De forma parecida a la membrana celular, poseen una polaridad creada por los aminoácidos contenidos en ellos y los ácidos grasos hidrófugos de posición final. Por ello, son incorporados en la membrana celular de bacterias gram-negativas y perturban su permeabilidad. En virtud de esto, estos antibióticos poseen un efecto bactericida. A las polimixinas pertenecen, por ejemplo, polimixina B, polimixina M, polimixina E (colistina) y colistinmetato. La elección de la polimixina específica queda a voluntad del experto en la materia y se orienta entre otras cosas según la indicación, el estado del paciente a tratar, la vía de administración y los parámetros toxológicos.

10

30

45

Los aminoglicósidos, respectivamente antibióticos aminoglucosídicos, pertenecen al grupo de los oligosacáridos antibióticos, con combinaciones de elementos constructivos de aminoazúcares y ciclohexano. Forman un gran grupo de aproximadamente 200 antibióticos solubles en agua. Representantes importantes son amikacina, apramicina, geneticina (G418), gentamiicina, kanamicina, netilmicina, neomicina, paromomicina, espectinomicina, estreptomicina u tobramicina. Los aminoglucósidos actúan de forma fuertemente bactericida por inhibición de la biosíntesis de proteínas en patógenos proliferantes y en reposo, acoplándose a la subunidad 30 <u>S</u> de los ribosomas y provocan fallos de lectura de los mRNA. Por ello se forman proteínas defectuosas, que muchas veces no pueden cumplir su función. Por consiguiente, las proteínas defectuosas se incorporan por ejemplo en la membrana celular de la bacteria, lo que lleva a la lisis del patógeno.

Los inventores han descubierto que la combinación de los tres principios activos da como resultado un efecto antibiótico sinérgico. Este sinergismo era sobre todo sorprendente puesto que las tres sustancias combinadas ejercen diferentes mecanismos de acción.

El experto en la materia, en virtud de los diferentes mecanismos de acción de los tres antibióticos, hubiera esperado interferencias químicas y eventualmente una neutralización de los efectos. Así, los inventores pudieron comprobar en experimentos paralelos que, por ejemplo, la combinación de aztreonam-lisina y colistina no presentaba efectos sinérgicos ni aditivos. El sinergismo observado era por lo tanto especialmente sorprendente.

Además de esto, el experto en la materia habría supuesto un incremento de los efectos secundarios. Pero, sorprendentemente, se puso de manifiesto que la composición farmacéuitica se toleraba muy bien por los pacientes. Tampoco se esperaba esto en virtud de las toxicidades descritas especialmente en el estado de la técnica para las polimixinas y los diferentes aminoglucósidos.

Después, se ha puesto de manifiesto como particularmente ventajoso, que en comparación con la terapia actual, con la composición farmacéutica conforme a la invención se incrementa múltiples veces la actividad bactericida frente a un gran número de especies bacterianas. A ello se añade, que la composición farmacéutica conforme a la invención disminuye el desarrollo de resistencias a los antibióticos, en virtud de la nueva combinación de principios activos.

Finalmente, la composición farmacéutica conforme a la invención se puede preparar de forma barata. Los tres antibióticos son disponibles en el comercio, están testados farmacológica y toxicológicamente, lo cual favorece un acelerado proceso de admisión. Además, se produce un potencial de ahorro por el hecho de que los tres principios activos se pueden formular en una composición única.

En este caso, la composición conforme a la invención se puede diseñar de tal modo que como únicos componentes farmacológicamente activos, ésta contiene un carbapenem, una polimixina y un aminoglucósido. Sin embargo, se entiende que puedan estar contenidos otros principios activos, por ejemplo aquellos que refuerzan la eficacia conforme a la invención.

La elección de las respectivas concentraciones de los principios activos se lleva a cabo por el experto en la materia. Se orienta entre otras cosas según la indicación, el estado del paciente a tratar, la vía de administración y los parámetros toxicológicos

Excipientes farmacéuticamente aceptables son generalmente conocidos en el estado de la técnica. Comprenden por ejemplo aglomerantes, agentes de disgregación, agentes de relleno, agentes deslizantes, así como tampones, sales y otras sustancias adecuadas para la formulación de medicamentos; compárese Rowe et al. (2006), Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5º edición, Pharmaceutical Press; o Bauer et al. (1999), Lehrbuch der farmazeutischen Technologie, 6ª edición, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart mbH. El contenido de las presentes publicaciones forma parte de la presente solicitud por referencia a éstas. Particularmente preferidos son los excipientes farmacéuticos aceptables que son adecuados para la formulación de antibióticos y/o que posibilitan un refuerzo de los efectos de los antibióticos.

ES 2 594 901 T3

Después de una ejecución preferida, la composición farmacéutica conforme a la invención está diseñada para el tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias. Por lo tanto, la invención se refiere también a la utilización de una combinación de al menos un carbapenem, una polimixina y un aminoglucósido para el tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias, respectivamente a un procedimiento para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias, el cual presenta las siguientes etapas: (1) poner a disposición una combinación de al menos un carbapenem, una polimixina y un aminoglucósido, y (2) formulación de la combinación en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5

10

45

Esta medida tiene la ventaja de que tres principios activos, empleados hasta ahora solo como monopreparados y acreditados para el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias, encuentran ahora aplicación por primera vez en combinación, la cual en virtud de un efecto sinérgico reconocido por uno de los inventores y la escasez de efectos secundarios, es particularmente adecuada para el tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias.

En este caso, es preferido conforme a la invención si en el caso del carbapenemo se trata de meropenem o imipenem, y/o en el caso de polimixina se trata de colistina o colistimetato, y/o en el caso del aminoglucósido se trata de tobramicina o gentamicina.

- Meropenem, respectivamente ácido 3-[5-(dimetilcarbamoil)pirrolidin-2-il]sulfanil-6-(1-hidroxietil)-4-metil-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hept-2-eno-2-carboxílico (nº-CAS 119478-56-7), es un antibiótico de banda ancha que es activo frente a un gran número de bacterias gram-positivas y gram- negativas, así como de bacterias anaerobias. Inhibe la síntesis de la pared celular de las bacterias.
- Imipenem, respectivamente ácido (5R,6S)-6-[(1R)-1-hidroxietil]-3-({2-[(iminometil)amino]etil}tio)-7-oxo-1-azabiciclo[3.2.0]hept-2-eno-2-carboxílico (nº CAS 74431-23-5) es otro antibiótico de amplio espectro de acción en el sector gram-positivo, gram-negativo, aerobio y anaerobio. Actúa como bactericida por inhibición de la síntesis de la pared celular de las bacterias.
 - Colistina, respectivamente *N*-(4-amino-1-(1-(4-amino-1-oxo-1-(3,12,23-tris(2-aminoetil)-20-(1-hidroxietil)-6,9-diisobutil-2,5,8,11,14,19,22-heptaoxo-1,4,7,10,13,18-hexaazaciclotricosan-15-ilamino)butan-2-ilamino)-3-
- hidroxibutan-2-ilamino)-1-oxobutan-2-il)-*N*,5-dimetilheptanamida (nº CAS: 1264-72-8) es un antibiótico activo frente bacterias gram-negativas. La colistina actúa a través de una damnificación de la membrana externa de las bacterias. El colistinmetato se prepara en forma de sal de sodio a partir de <u>colistina</u> por reacción con formaldehído e hidrógenosulfito de sodio. Se presenta en forma de polvo blanco, que en agua se disuelve muy fácilmente.
- Tobramicina, respectivamente(2S,3R,4S,5S,6R)-4-amino-2-{[(1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-diamino-3-{[(2R,3R,5S,6R)-3-amino-6-(aminometil)-4-hidroxioxan-2-il]oxi}-2-hidroxiciclohexil]oxi}-6-(hidroximetil)oxan-3,5-diol (n° CAS: 32986-56-4) es un antibiótico efectivo frente a un gran número de bacterias, preferentemente bacterias gram-negativas. Tobramicina se une al ribosoma bacteriano 30S y 50S e impide así la formulación del complejo 70S. Como resultado, la mRNA no puede ser transladada en una proteína, por lo que se produce la muerte celular.
- Gentamicina, respectivamente (3R,4R,5R)-2-{[(1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-diamino-3-{[(2R,3R,6S)-3-amino-6-[1(R)-1-(metilamino)etil]oxan-2-il]oxi}-2-hidroxiciclohexil]oxi}-5-metil-4-(metilamino)oxano-3,5-diol (n° CAS 1403-66-3) es una mezcla de compuestos aminoglucosídicos estructuralmente muy parecidos, las gentamicinas. Impide la lectura del mRNA en los ribosomas por unión a la subunidad 30S. Así se frena la síntesis de proteínas en las bacterias. Actúa sobre todo frente a bacterias gramnegativas.
- Como pudieron poner de manifiesto los inventores, por esta selección se pueden realizar un tratamiento aún más preciso de una enfermedad de las vías respiratorias.
 - La composición farmacéutica conforme a la invención está diseñada para una administración por vía inhalativa.
 - Esta medida tiene la ventaja que los principios activos llegan directamente a su lugar de acción, es decir las vías respiratorias y se evitan efectos secundarios, así como concentraciones más bajas de principio activo en las vías respiratorias, que aparecerían en el caso de una administración sistémica. Por ello se optimiza el efecto de la composición conforme a la invención
 - Según otra forma de ejecución preferida de de composición farmacéutica conforme a la invención, el excipiente farmacéutico aceptable presenta una solución acuosa de sal cloruro, la cual preferentemente es hipertónica.
- Esta medida tiene la ventaja inesperada de incrementar la eficacia de la composición conforme a la invención de manera sinérgica. Al efecto bactericida mejorado de los tres antibióticos se añade un efecto secretolítico. La solución salina de cloruro, acuosa, preferentemente hipertónica, por entrada del flujo de agua disuelve del tejido pulmonar las viscosas placas de moco y fomenta con ello la autolimpieza del pulmón. Al mismo tiempo facilita el efecto de los tres principios activos antibióticos, lo cual lleva a una mayor reducción de la colonización bacteriana de las vías respiratorias. Esto tiene como resultado una considerable mejora de la función pulmonar. Como particularmente ventajoso ha resultado en este caso, que los tres principios activos también son solubles en mayores concentraciones de sal cloruro, conservando su eficacia.

ES 2 594 901 T3

Conforme a la invención, por una solución de sal cloruro hipertónica se entiende una solución que presenta una concentración de sal cloruro > 0,9%.

Según un perfeccionamiento ulterior preferido de la composición farmacéutica conforme a la invención la solución acuosa de sal cloruro es una solución de sal cloruro al 6%.

- Esta medida tiene la ventaja de que se consigue un efecto secretolítico particularmente bueno. En este caso, resultó sorprendente que las eficacias de los tres antibióticos no se vieron influenciadas negativamente por la elevada concentración salina.
 - Según un perfeccionamiento ulterior preferido de la composición farmacéutica conforme a la invención la sal cloruro se selecciona del grupo constituido por NaCl, MgCl y CaCl o mezclas de estas.
- 10 Esta medida tiene la ventaja de que se emplea una sal cloruro de este tipo que, según conocimientos de los inventores, conduce a resultados particularmente buenos.
 - Además de esto, conforme a la invención es preferible que la enfermedad de las vías respiratorias sea una enfermedad bacteriana de las vías respiratorias.
- Esta medida tiene la ventaja de que la composición farmacéutica conforme a la invención, en el caso de un cuadro de la enfermedad particularmente problemático, se emplea y proporciona una ayuda eficaz.
 - En este caso es preferible que la enfermedad bacteriana de las vías respiratorias involucre bacterias seleccionadas del grupo constituido por *Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae (HI)* b, HI (NTHI) no tipificable, *Moraxella catarrhalis, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Burkholderia cepacia, Acinetobacter baumanii,* bacterias estríctamente anaerobias, incluida *Prevonell intermedia.*
- Tal como pudieron comprobar los inventores, la composición farmacéutica conforme a la invención manifiesta un efecto positivo en el caso de las bacterias anteriormente citadas, que aparecen con mucha frecuencia en relación con las enfermedades de las vías respiratorias. En contraposición con las terapias llevadas acabo hoy en día, las cuales esencialmente están orientadas al tratamiento de *Pseudomonas aeruginosa*, la composición farmacéutica conforme a la invención se caracteriza por un espectro de acción claramente más amplio y por consiguiente, posibilita también el tratamiento de las enfermedades de las vías respiratorias que no son tratables con la terapia convencional.
 - En este caso es preferible conforme a la invención si la enfermedad de las vías respiratorias se selecciona del grupo constituido por: bronquitis obstructiva crónica (COPD), fíbrosis cística (CF) y neumonía asociada al ventilador (VAP).
- Esta medida tiene la ventaja de que se prepara una composición farmacéutica que se puede emplear de forma beneficiosa en algunas de las enfermedades de las vías respiratorias más relevantes. Así, los inventores pudieron comprobar, especialmente en pacientes de CF que fueron tratados conforme a la invención, una significativa reducción del número de distintas bacterias patógenas y un incremento de las cantidades de esputo expulsadas al toser.
- Las características, propiedades y ventajas descritas para la composición farmacéutica conforme a la invención valen respectivamente para la utilización conforme a la invención y respectivamente para el procedimiento conforme a la invención.
 - Se entiende que las características citadas anteriormente y las que aún se van a mencionar no solo son utilizables en la combinación respectivamente indicada, sino también en otras combinaciones o en solitario, sin abandonar el marco de la presente invención.
- 40 La invención se va a describir ahora con más detalle con ayuda de ejemplos de ejecución, de los cuales se desprenden además otras características, propiedades y ventajas. Los ejemplos de ejecución son puramente ilustrativos y no limitan el alcance de la invención.

Se hace referencia a las figuras anexas, en las cuales se representa lo siguiente:

50

- Fig. 1 demuestra con ayuda del valor del pH la estabilidad de la composición farmacéutica conforme a la invención en diferentes concentraciones de sal común, representada por ejemplo en combinaciones de (a) meropenem, colistina y tobramicina, y (b) imipenem, colistina y gentamicina:
 - Fig. 2 demuestra la actividad bactericida sinérgica de los tres antibióticos combinados en la composición farmacéutica conforme a la invención, en comparación con la administración de los antibióticos por separado, en relación a la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa*, representada por ejemplo en combinaciones de (a) meropenem, colistina y tobramicina, y (b) imipinem, colistina y gentamicina;
 - Fig. 3 demuestra la actividad bactericida de los tres antibióticos combinados en la composición farmacéutica conforme a la invención en comparación con la administración de los antibióticos por separado, en relación

a la bacteria patógena *Escherichia coli*, representada por ejemplo en la combinación de meropenem, colistina y tobramicina.

Ejemplos de ejecución

5

10

25

30

35

40

45

1. Estabilidad química de la combinación conforme a la invención de los tres antibióticos en diferentes concentraciones salinas

Los tres antibióticos meropenem, colistina y tobramicina se disolvieron a concentraciones de 60 mg/ml, 20 mg/ml y 75 mg/ml, en solución acuosa de sal común al 0,9%, al 3 % y al 6% y se examinó la estabilidad de las soluciones durante un espacio de tiempo de 60 minutos. Como medida de la estabilidad servía en este caso el valor del pH. Además, los tres antibióticos imipenem, colistina y gentamicina se disolvieron a concentraciones de 100 mg/ml, 20 mg/ml, y 30 mg/ml, en una solución acuosa de sal común al 0,9% y se examinó la estabilidad de las soluciones durante un espacio de tiempo de 60 minutos. Además, se examinó visualmente si se producían incompatibilidades tales como precipitaciones o decoloraciones.

Los resultados se representan en las Figs. 1a y 1b.

En este caso se puso de manifiesto que el total de las tres soluciones de los tres antibióticos meropenem, colistina y tobramicina eran extremadamente estables. Al cabo del tiempo se producía únicamente un incremento mínimo, despreciable, del valor del pH, que aparecía prácticamente idéntico en todos los casos. Tampoco se pudo comprobar ningún indicio de una incompatibilidad física. No se dieron precipitaciones ni decoloraciones. Del mismo modo, también la solución de imipenem, colistina y gentamicina en 0,9% de sal común era estable durante 60 minutos. Tampoco aquí se dieron aquí precipitaciones ni decoloraciones.

20 2. Actividad sinérgica bactericida de la combinación conforme a la invención de los tres antibióticos en relación a una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*

En la siguiente etapa se examinó si el efecto bactericida de los antibióticos por separado, en relación con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* se modificaba a pH 7 en una solución de sal común al 0,9%, cuando los principios activos se empleaban en combinaciones. Para ello, los diferentes principios activos antibióticos se emplearon en concentraciones de 60 mg/ml de meropenem, 20 mg/ml de celestina y 75 mg/ml de tobramicina. Además, los tres antibióticos imipenem, celestina y gentamicina se emplearon en concentraciones de 100 mg/ml, 20 mg/ml y 30 mg/ml en una solución acuosa de sal común al 0,9%.

La construcción del ensayo fue la siguiente: las bacterias se extendieron sobre placas de cultivo de agar y se incubaron con las soluciones de antibióticos durante 24 horas a 37°C. A continuación se midieron las zonas de la incubación del crecimiento bacteriano dentro del césped de bacterias.

Los resultados se han representado en las Figs. 2a y 2b.

En este caso se puso de manifiesto que por la combinación de colistina, tobramicina (Tobra) y meropenem (Mero) frente a la administración de los principios activos por separado se consigue una mejora significativa de la efectividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*. La administración de los antibióticos por separado reducía el inóculo clínico inicial del aislado de *Pseudomonas* solo en \leq 3 log₁₀ unidades formadoras de colonias (CFU/ml), la combinación de colistina y tobramicina ya en 4 log₁₀ CFU/ml, y la combinación conforme a la invención de colistina, tobramicina y meropenem, incluso en 6 log₁₀ CFU/ml .

Resultados análogos se obtuvieron con la combinación imipenem, colistina y gentamicina (genta). La administración de los antibióticos por separado reducía el inóculo inicial de la cepa de laboratorio PAO1 solo en aproximadamente ≤ 10 log₁₀ unidades formadoras de colonias (CFU/ml), pero la combinación de colistina y gentamicina, así como la combinación de imipenem, colistina y gentamicina, sin embargo, totalmente.

Este incremento de actividad en la composición conforme a la invención se atribuye a un sinergismo. En este caso, se remisión a la definición del "Nacional Comittee for Clinical labaratory Standards" (NCCLS) del año 1999, que define sinergismo como una reducción del CFU bacteriano de ≥ 2 log₁0 CFU/ml por una combinación de diferentes antibióticos en comparación con la reducción del CFU bacteriano por el antibiótico más activo; vgl. McCaughey et al. (2011), Synergistic Effects of a Fosfomycin: Tobramycin Combination on Cystic Fibrosis Phatogens Grown. Aerobically and anaerobically, Abstract from J. Cyct. Fibros. 10: Suppl. 1, 26, A100.

- 3. Actividad bactericida de la combinación conforme a la invención de los tras antibióticos en relación a una cepa de Escherichia coli
- En la siguiente etapa se examinó el efecto de la combinación conforme a la invención, demostrada en el ejemplo de meropenem, colistina y tobramicina, en solución acuosa de sal común al 0,9% a un pH 7 en relación a una cepa de *Escherichia coli*. El montaje del ensayo correspondía en este caso al indicado bajo el ejemplo de ejecución 2, habiéndose intercambiado la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* por una cepa de *Escherichia coli*.

El resultado se representa en la Fig. 3.

En este caso se puso de manifiesto que los efectos observados en una administración por separado de tobramicina, respectivamente colistina, se podían incrementar claramente por la combinación conforme a la invención. Los antibióticos por separado reducían el inóculo inicial en \leq 6 log₁₀ CFU/ml, mientras que la combinación conforme a la invención de los tres antibióticos dio por resultado una reducción de 6 log₁₀ CFU/ml.

4. Actividad bactericida de la composición conforme a la invención en diferentes concentraciones salinas

A continuación se examinó qué influencia ejerce la concentración salina sobre la actividad bactericida de la combinación conforme a la invención de los tres antibióticos, demostrada en el ejemplo de meropenem, colistina y tobramicina, en relación a cuatro aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* (1 a 4), que fueron aislados en muestras de esputo de pacientes de CF. Para ello las bacterias se extendieron sobre placas de cultivo de agar y se incubaron con las soluciones de antibióticos descritas bajo las cifras 1 y 2, en concentraciones salinas presentes en agua, durante 24 horas a 37°C. A continuación, se midieron las zonas de la inhibición del crecimiento bacteriano dentro del césped de bacterias.

El resultado se representa en la Tabla 1 siguiente.

Concentración salina	Zona de la inhibición del crecimiento bacteriano			
	(mm de diámetro)			
	Cepas clínicas de Pseudomonas aeruginosa			
	1	2	3	4
0,9%	40	37	27	36
3%	42	37	29	36
6%	40	39	28	36

Tabla 1: influencia de la solución tampón con aumento creciente de las concentraciones salinas sobre la potencia de la composición conforme a la invención *in vitro*.

En este caso, en la zona examinada no se pudo comprobar ninguna influencia significativa de la concentración salina sobre la eficacia de la composición conforme a la invención.

20 5. Potencia clínica de la combinación conforme a la invención de los tres antibióticos en solución hipertónica de sal común al 6%

En un estudio clínico se examinó la tolerancia y eficacia de la combinación conforme a la invención de meropenem, colistina y tobramicina en una solución hipertónica de sal común al 6%. Para ello se trataron tres pacientes de CF [un paciente femenino y dos pacientes masculinos; edad media 28 años (18 a 42 años); capacidad media 1 segundo (FEV₁: 53,2% predicha. La composición conforme a la invención con 60 mg/ml de meropenem, 20 mg/ml de colistina y 75 mg/ml de tobramicina se administró por inhalación única utilizando un PARI eFLOW o un nebulizador Pari Master. Se llevó a cabo un ensayo de la función pulmonar una hora antes y una hora después de la inhalación. Además de esto, antes e inmediatamente después de la inhalación se determinaron en el esputo de los pacientes los CFU de *Pseudomonas aeruginosa, Stafilococcus aureus* y de todos los anaerobios.

En este caso se puso de manifiesto que la inhalación de la solución por los pacientes fue muy bien tolerada. Durante el estudio, aparte de tos durante la inhalación y de una obstrucción bronquial reversible, que se disolvía espontáneamente en el espacio de una hora después de la inhalación, no se manifestaron efectos secundarios algunos. El sabor salado de la solución no se apreció como molesto. El tratamiento inhalativo tuvo como resultado una secretolisis incrementada, lo que visualmente se pudo observar por las cantidades incrementadas de esputo expulsadas por la tos. También se comprobó una reducción significativa del número de bacterias (CFU) de *Pseudomonas aeruginosa* y *Stafilococcus aureus*, así como del conjunto de anaerobios, lo que resulta también de la Tabla 2.

Bacterias	Inhalación de la solución de principio activo		
	antes	después	Significancia
P. aeruginosa	7,12 ± 1,0	6,23 ± 1,1	0,03
S. aureus	$5,66 \pm 2,6$	$5,66 \pm 2,6$	0,37
Conjunto de anaerobios	$7,13 \pm 0,04$	$4,72 \pm 0.8$	0,005

Tabla 2: potencia clínica de la combinación de los tres antibióticos conforme a la invención en solución hipertónica de sal común al 6% - Primer examen bacteriológico en personas

Tal como se deduce de las Tablas 3 y 4, la administración de la combinación conforme a la invención de los antibióticos no conducía a un empeoramiento de la función pulmonar. Por el contrario, en el caso del flujo expiratorio máximo a 25, 50 y 75% de la capacidad vital forzada (MEF₂₅₋₇₅) se presentaba incluso una mejoría significativa.

15

25

30

35

5

10

40

Paciente	Inhalación de la solución de principio activo			
	antes	después	Significancia	
	FEV ₁ (% predicho ± SD		(p)	
1	47,9	44,0		
2	41,2	40,3		
3	70,4	73,6		
Media	53,2 ± 15	52,6 ± 18	0,41	

Tabla 3: potencia clínica de la combinación de los tres antibióticos conforme a la invención en solución hipertónica de sal común al 6% - Primer examen bacteriológico en personas: función pulmonar FEV₁

Paciente	Inhalación de la solución de principio activo			
	antes	después	Significancia	
	MEF_{25-75} (% predicho ± SD (p)			
1	16,4	17,4		
2	12,0	11,5		
3	43,1	52,4		
Media	23,8 ± 17	27,1 ± 22	0,20	

Tabla 4: potencia clínica de la combinación de los tres antibióticos conforme a la invención en solución hipertónica de sal común al 6% - Primer estudio en personas: función pulmonar (MEF₂₅₋₇₅)

Fazit

10

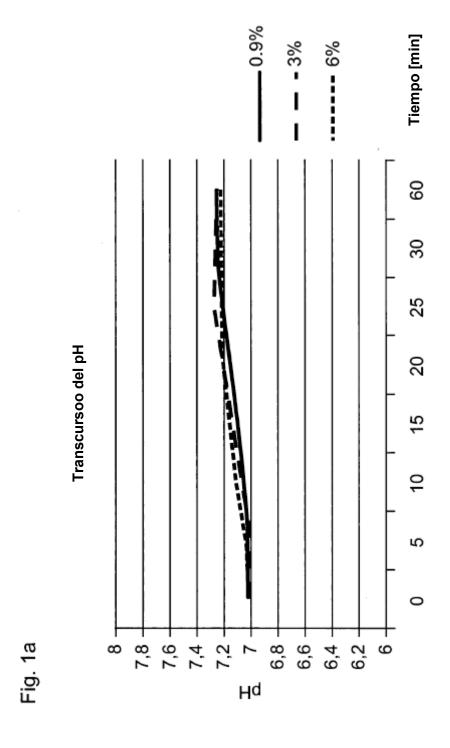
Los inventores pudieron demostrar contundentemente con ayuda de exámenes *in vitro* e *in vivo*, que por la combinación de un carbapenem, una polimixina y un aminoglucósido, en virtud de un efecto sinérgico, se pueden tratar de forma efectiva enfermedades de las vías respiratorias. La combinación farmacéutica se puede administrar por inhalación en solución salina al 6%, por lo cual se consiguen efectos secretolíticos adicionales. En este caso, en la clase de antibióticos de los carbapenemos y de los aminoglucósidos, tienen éxito al menos 2 representantes con análogo grado de eficacia.

REIVINDICACIONES

- 1. Composición farmacéutica que presenta una combinación de al menos un carbapenem, una polimixina y un aminoglucósido, así como un vehículo farmacéuticamente aceptable, caracterizado porque la composición farmacéutica se ha concebido para una administración en las vías inhalativas.
- 5 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada porque el carbapenem es el meropenem o el imipenem.
 - 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque la polimixina es la colistina o el colistimetato.
- 4. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque el aminoglucósido es la tobramicina o la gentamicina.
 - 5. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización para el tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias.
 - 6. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque el vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa de una sal cloruro.
- 15 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, caracterizada porque la solución de sal cloruro es hipertónica.
 - 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, caracterizada porque la solución de sal cloruro es una solución de sal cloruro aproximadamente al 6%.
- 9. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 6 A 8, caracterizada porque la sal cloruro se selecciona del grupo que comprende: NaCl, MgCl y CaCl o sus mezclas.
 - 10. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, caracterizada porque la enfermedad de las vías respiratorias es una enfermedad bacteriana de las vías respiratorias.
 - 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, caracterizada porque la enfermedad bacteriana de las vías respiratorias implica bacterias que se seleccionan del grupo que comprende *Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae* (HI) b, HI (NTHI) no tipificable, *Moraxella catarrhalis, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Burkholderia cepacia, Acinetobacter baumanii*, bacterias estríctamente anaerobias, incluida *Prevonell intermedia*.

25

12. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, caracterizada porque la enfermedad de las vías respiratorias se selecciona del grupo que comprende: la bronconeumonía crónica obstructiva (BRCO), la fibrosis quística (FK) y la neuropatía adquirida por ventilación (PAV).



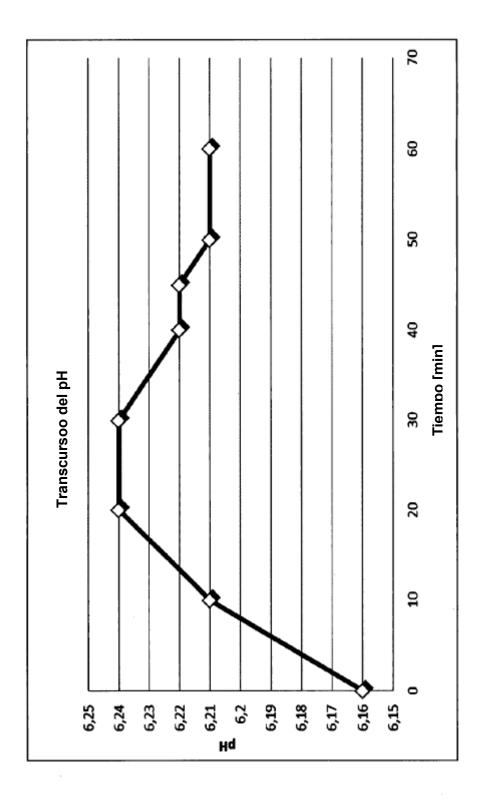
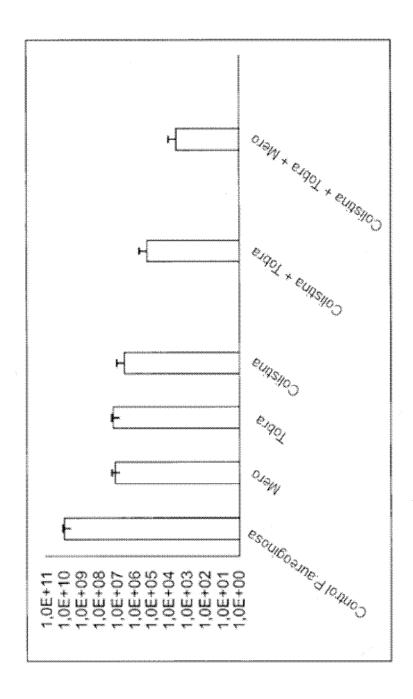
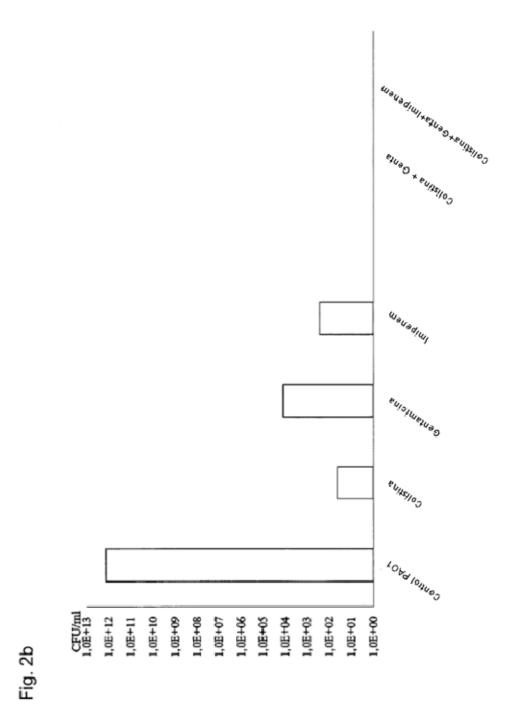
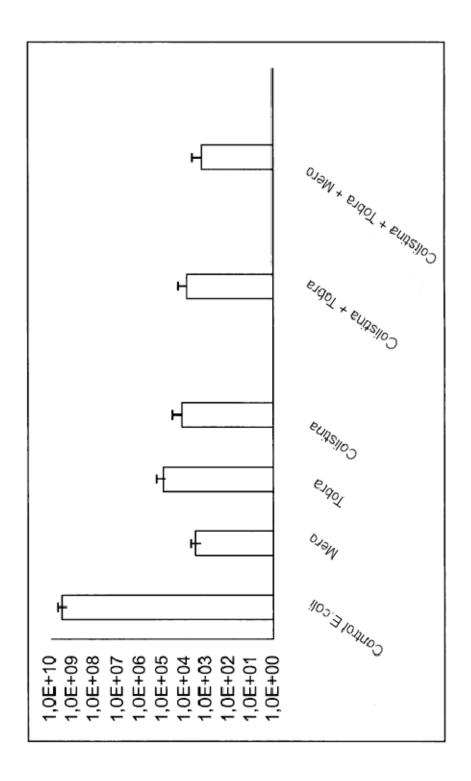


Fig. 1b



-io. 2a





-<u>ig</u>.3