

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 549**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/198** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2001 PCT/US2001/29311**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2002 WO02024158**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2001 E 01971210 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 1318785**

54 Título: **Administración pulmonar de L-Dopa**

30 Prioridad:

**19.09.2000 US 665252**  
**08.06.2001 US 877734**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.07.2017**

73 Titular/es:

**CIVITAS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
**190 Everett Ave.**  
**Chelsea, MA 02150, US**

72 Inventor/es:

**BARTUS, RAYMOND T. y**  
**EMERICH, DWAIN E.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 621 549 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 pulmonar de L-Dopa

**5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La enfermedad de Parkinson se caracteriza neuropatológicamente por degeneración de neuronas dopaminérgicas en los ganglios basales y neurológicamente por temblores debilitantes, lentitud de movimiento y problemas de equilibrio. Se estima que más de un millón de personas sufren enfermedad de Parkinson. Casi todos los pacientes  
10 reciben el precursor de la dopamina levodopa o L-Dopa, a menudo en conjunción con el inhibidor de la dopa-  
descarboxilasa, carbidopa. La L-Dopa controla de forma adecuada los síntomas de la enfermedad de Parkinson en  
las primeras fases de la enfermedad. Sin embargo, suele hacerse menos eficaz después de un periodo que puede  
variar entre varios meses y varios años en el curso de la enfermedad.

15 Según se cree, los efectos variables de la L-Dopa en los pacientes con enfermedad de Parkinson están  
relacionados, al menos en parte, con la semivida en plasma de la L-Dopa que suele ser muy corta, en el intervalo de  
1 a 3 horas, incluso cuando se coadministra con carbidopa. En las primeras fases de la enfermedad, este factor se  
mitiga con la capacidad de almacenamiento de dopamina de las neuronas estriatales diana. La L-Dopa es captada y  
almacenada en las neuronas y se libera con el tiempo. Sin embargo, a medida que avanza la enfermedad, las  
20 neuronas dopaminérgicas se degeneran, lo que produce un descenso en la capacidad de almacenamiento de la  
dopamina. Como consecuencia, los efectos positivos de la L-Dopa están cada vez más relacionados con las  
fluctuaciones de las concentraciones plasmáticas de la L-Dopa. Además, los pacientes suelen desarrollar problemas  
que afectan al vaciado gástrico y una captación intestinal deficiente de la L-Dopa. Los pacientes muestran  
oscilaciones cada vez más acusadas en los síntomas de la enfermedad de Parkinson, que están comprendidos entre  
25 la reanudación de los síntomas clásicos de la enfermedad de Parkinson, cuando las concentraciones plasmáticas  
descienden, y la llamada discinesia, cuando las concentraciones plasmáticas aumentan en exceso temporalmente  
después de la administración de L-Dopa.

A medida que avanza la enfermedad, la terapia convencional con L-Dopa implica pautas posológicas cada vez más  
30 frecuentes, aunque menores. Por ejemplo, muchos pacientes reciben L-Dopa cada dos a tres horas. Sin embargo,  
se ha observado que las dosis más frecuentes todavía de L-Dopa son inadecuadas para controlar los síntomas de la  
enfermedad de Parkinson. Además, resultan incómodas para el paciente y a menudo derivan en falta de  
cumplimiento.

35 Se ha observado también que incluso con hasta entre seis y diez dosis de L-Dopa al día, las concentraciones  
plasmáticas de L-Dopa pueden ser peligrosamente bajas, y el paciente puede sufrir síntomas muy intensos de la  
enfermedad de Parkinson. Cuando sucede, se administra L-Dopa adicional como una terapia de intervención para  
incrementar rápidamente la actividad de la dopamina en el encéfalo. Sin embargo, la terapia con administración oral  
se asocia con un periodo de instauración de aproximadamente 30 a 45 minutos durante el cual el paciente sufre  
40 innecesariamente. Además, los efectos combinados de la terapia de intervención, con la dosis pautada regularmente  
pueden conducir a sobredosis que podría requerir hospitalización. Por ejemplo, el agonista del receptor  
dopaminérgico administrado por vía subcutánea (apomorfina), que a menudo requiere un antagonista de la  
dopamina de acción periférica como, por ejemplo, domperidona, para controlar las náuseas inducidas por la  
dopamina, es incómodo e invasivo.

45 El documento WO-00/72.827A describe micropartículas adaptadas también para la administración pulmonar de  
fármacos.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

50 La invención se refiere al uso de levodopa en la fabricación de un medicamento para administración pulmonar con el  
fin de proporcionar una terapia de rescate en un paciente con enfermedad de Parkinson, donde la levodopa se  
incorpora en partículas que tienen una densidad aparente inferior a aproximadamente 0,4 g/cm<sup>3</sup> y un diámetro  
aerodinámico medio en masa inferior a aproximadamente 5 micrómetros.

55 Las partículas pueden tener una densidad aparente inferior a aproximadamente 0,1 g/cm<sup>3</sup> y tienen un diámetro  
aerodinámico medio en masa inferior a aproximadamente 3 micrómetros. El paciente puede estar en distrés agudo.  
La levodopa puede suministrarse al lugar de acción en menos de 15 minutos. La levodopa puede suministrarse al  
sistema nervioso central en un lapso de 10 minutos desde el suministro.

La invención es útil para terapia de rescate en el curso de la enfermedad de Parkinson.

Las dosis empleadas en la invención son también en general al menos aproximadamente dos veces inferiores a la dosis requerida con vías de administración distintas de la intravenosa, como, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección intramuscular, intraperitoneal, bucal, rectal y nasal.

Preferentemente, la administración en el tracto respiratorio se realiza mediante un inhalador de polvo seco o un inhalador con dosímetro. Las partículas tal como se describe en la presente memoria descriptiva pueden emplearse en composiciones adecuadas para su suministro al sistema pulmonar tal como se conoce en la técnica.

En una realización, las partículas empleadas en el procedimiento de la invención son partículas adecuadas para suministrar un medicamento al sistema pulmonar y en particular a los alvéolos o los tejidos pulmonares profundos. En una realización preferida, las partículas tienen un diámetro geométrico, de al menos 5  $\mu\text{m}$  (micrómetros), preferentemente entre aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  y 30  $\mu\text{m}$ . En otra realización preferida más, las partículas tienen un diámetro aerodinámico entre aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . En otra realización, las partículas tienen un diámetro geométrico medio en masa (DGMM) de más de 5  $\mu\text{m}$ , preferentemente de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  o más. En otra realización más, las partículas tienen un diámetro aerodinámico medio en masa (DAMM) comprendido entre aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . En una realización preferida, las partículas tienen un DAMM comprendido entre aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ .

Las partículas pueden consistir en el medicamento o pueden incluir además uno o más componentes adicionales. Se prefiere la liberación rápida del medicamento en el torrente sanguíneo y su suministro a su lugar de acción, por ejemplo, el sistema nervioso central. Las partículas pueden incluir un material que mejora la cinética de liberación del medicamento. Los ejemplos de estos materiales adecuados incluyen, pero no se limitan a, determinadas fracciones de fosfolípidos, aminoácidos y carboxilato combinadas con sales de metales multivalentes y otros.

La energía que mantiene las partículas del polvo seco en un estado agregado es tal que basta con una respiración del paciente, en un intervalo fisiológico razonable de velocidades de flujo de inhalación para desagregar el polvo contenido en el recipiente en partículas respirables. Las partículas desagregadas pueden penetrar por medio de la respiración del paciente y depositarse en las vías respiratorias y/o el tejido pulmonar profundo con alta eficiencia.

La invención tiene muchas ventajas. Por ejemplo, la administración pulmonar proporciona un tratamiento a demanda sin el inconveniente de las inyecciones. El suministro selectivo de un medicamento al sistema nervioso central puede obtenerse en un marco de tiempo no disponible con otras vías de administración, en particular en regímenes orales convencionales. Así, puede suministrarse una dosis eficaz al lugar de acción en la "primera ejecución" del medicamento en el sistema circulatorio. Al poner en práctica la invención, se proporciona alivio a los pacientes sintomáticos en un marco de tiempo durante el cual las terapias orales convencionales estarían todavía en camino hacia el lugar de acción. Las dosis reducidas empleadas en los procedimientos de la invención producen una concentración plasmática del plasma que es equivalente a la obtenida con la dosis oral. Pueden obtenerse concentraciones plasmáticas que se aproximan a las observadas con la administración intravenosa. También pueden obtenerse las ventajas de la dosis con respecto a otras vías de administración, por ejemplo, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, bucal, rectal y nasal. Además, puede suministrarse una cantidad terapéutica del fármaco al sistema pulmonar en uno o un pequeño número de etapas o respiraciones.

45

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1A es una representación gráfica de las concentraciones sanguíneas de L-Dopa en ratas después de la administración por alimentación forzada por vía oral o administración directa a los pulmones medido con un espectrómetro de masas.

La Fig. 1B es una representación gráfica de las concentraciones sanguíneas de L-Dopa en ratas después de la administración por alimentación forzada por vía oral o administración directa a los pulmones medido con HPLC.

La Fig. 2A es una representación gráfica de las concentraciones sanguíneas de L-Dopa en ratas después del suministro por vía oral o directamente en los pulmones.

La Fig. 2B es una representación gráfica de las concentraciones estriatales de dopamina en ratas después del suministro de L-Dopa por vía oral o directamente en los pulmones.

La Fig. 3 es una representación gráfica de las concentraciones sanguíneas y estriatales de  $^{14}\text{C}$  después de la administración de  $^{14}\text{C}$ -L-Dopa por vía oral o directamente a los pulmones.

La Fig. 4 es una representación gráfica de las concentraciones plasmáticas de  $^{14}\text{C}$  en ratas después de la

administración de  $^{14}\text{C}$ -L Dopa por vía oral (alimentación forzada), traqueotomía o ventilador.

La Fig. 5 es una representación gráfica de las concentraciones de  $^{14}\text{C}$  en el encéfalo en ratas después de la administración de  $^{14}\text{C}$ -L Dopa por vía oral (alimentación forzada), traqueotomía o ventilador.

La Fig. 6A es un gráfico de barras que muestra las concentraciones absolutas de  $^{14}\text{C}$ -carboplatino en regiones del

5 encéfalo después de la administración intravenosa (IV.) o pulmonar (pulmón).

La Fig. 6B es un gráfico de barras que muestra las concentraciones relativas de  $^{14}\text{C}$ -carboplatino en regiones del encéfalo después de la administración intravenosa (IV) o pulmonar (pulmón).

La Fig. 7A es un gráfico de barras que muestra las concentraciones absolutas de  $^{14}\text{C}$ -carboplatino en órganos de animales después de la administración intravenosa (IV) o pulmonar (pulmón).

10 La Fig. 7B muestra las concentraciones relativas de  $^{14}\text{C}$ -carboplatino en órganos de animales después de la administración intravenosa (IV) o pulmonar (pulmón).

La Fig. 8 es una representación gráfica que muestra la concentración plasmática de L-Dopa con respecto al tiempo después de la administración oral o pulmonar (normalizada para una dosis de 8 mg).

La Fig. 9 es una representación gráfica que muestra la concentración plasmática de ketoprofeno con respecto al

15 tiempo para grupos oral y pulmonar.

La Fig. 10 es una representación gráfica que muestra la concentración plasmática de ketoprofeno con respecto al tiempo para grupo oral

La Fig. 11 es una concentración plasmática de ketoprofeno con respecto al tiempo para grupo pulmonar.

La Fig. 12 es una gráfica que muestra curvas RODOS para diferentes formulaciones de polvos que incluyen L-DOPA.

20 Las Fig. 13A y 13B son cromatografías HPLC que representan la recuperación de L-DOPA de los polvos (Fig. 13A) en comparación con una muestra de referencia (Fig. 13B).

La Fig. 14A representa las concentraciones plasmáticas de L-DOPA después de las vías pulmonar (pulmón) y oral.

La Fig. 14B representa las concentraciones plasmáticas de L-DOPA después de la administración pulmonar

25 (pulmón), oral e intravenosa.

Las Fig. 15A y 15B muestran los resultados, respectivamente, de L-DOPA oral (p.o.) y pulmonar (pulmón) en la "tarea de colocación" funcional en un modelo de ratas de la enfermedad de Parkinson.

Las Fig. 16A y 16B muestran los resultados, respectivamente de L-DOPA oral (p.o.) y pulmonar (pulmón) en la "tarea de sujeción" funcional en un modelo de ratas de la enfermedad de Parkinson.

30 Las Fig. 17A y 17B muestran los resultados, respectivamente de L-DOPA oral (p.o.) y pulmonar (pulmón) en la tarea de acinesia funcional en un modelo de ratas de la enfermedad de Parkinson.

La Fig. 18 muestra los resultados de suministro oral (p.o.) y pulmonar (pulmón) de L-DOPA en la rotación funcional en un modelo de ratas de la enfermedad de Parkinson.

La Fig. 19A representa el tiempo hasta el inicio de las convulsiones después del suministro de alprazolam pulmonar

35 y oral 10 minutos antes de la administración de PZT.

La Fig. 19B representa la duración de las convulsiones después del suministro de alprazolam pulmonar y oral 10 minutos antes de la administración de PZT.

La Fig. 20A representa el tiempo hasta el inicio de las convulsiones después del suministro de alprazolam pulmonar y oral 30 minutos antes de la administración de PZT.

40 La Fig. 20B representa la duración de las convulsiones después del suministro de alprazolam pulmonar y oral 30 minutos antes de la administración de PZT.

La Fig. 21A representa el tiempo hasta el inicio de las convulsiones para alprazolam pulmonar 10 y 30 minutos antes de la administración de PZT.

La Fig. 21B representa la duración de las convulsiones para alprazolam pulmonar 10 y 30 minutos antes de la

45 administración de PZT.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La indicación médica tratada por los medicamentos descritos en la presente memoria descriptiva es la enfermedad

50 de Parkinson.

La invención proporciona una terapia de rescate. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "terapia de rescate" significa un suministro rápido a demanda de un fármaco a un paciente para ayudar a reducir o controlar los

55 síntomas de la enfermedad. Los procedimientos de la invención son adecuados también para su uso en pacientes

Las partículas pueden incluir uno o más componentes adicionales. La cantidad de fármaco o medicamento presente en estas partículas puede estar comprendida entre 1,0 y aproximadamente 90,0% en peso.

Para la terapia de rescate, se prefieren las partículas que incluyen uno o más componentes que promueven la liberación rápida del medicamento en el torrente sanguíneo. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, la liberación rápida del medicamento en el torrente sanguíneo se refiere a las cinéticas de liberación que son adecuadas para proporcionar la terapia de rescate. En una realización, la concentración plasmática terapéutica óptima se consigue en menos de 10 minutos. Puede conseguirse hasta en aproximadamente 2 minutos e incluso menos. La concentración terapéutica óptima puede conseguirse a menudo en un marco de tiempo similar o que se acerca al observado con la administración intravenosa. En general, la concentración plasmática terapéutica óptima se consigue significativamente más deprisa de lo que es posible con la administración oral, por ejemplo, de 2 a 10 veces más deprisa.

10

Las partículas pueden incluir uno o más fosfolípidos, como, por ejemplo, una fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol o una combinación de los mismos. Los fosfolípidos pueden ser endógenos del pulmón. También pueden emplearse combinaciones de fosfolípidos. En la Tabla 1 se muestran ejemplos específicos.

15

Tabla 1

|                                     |      |
|-------------------------------------|------|
| Dilauriloilfosfatidilcolina (C12:0) | DLPC |
| Dimiristoilfosfatidilcolina (C14:0) | DMPC |
| Dipalmitoilfosfatidilcolina (C16:0) | DPPC |
| Diestearoilfosfatidilcolina (18:0)  | DSPC |
| Dioleoilfosfatidilcolina (C18:1)    | DOPC |
| Dilaurilolilfosfatidilglicerol      | DLPG |
| Dimiristoilfosfatidilglicerol       | DMPG |
| Dipalmitoilfosfatidilglicerol       | DPPG |
| Diestearoilfosfatidilglicerol       | DSPG |
| Dioleoilfosfatidilglicerol          | DOPG |
| Ácido dimiristoilfosfatídico        | DMPA |
| Ácido dimiristoilfosfatídico        | DMPA |
| Ácido dipalmitoilfosfatídico        | DPPA |
| Ácido dipalmitoilfosfatídico        | DPPA |
| Dimiristoilfosfatidiletanolamina    | DMPE |
| Dipalmitoilfosfatidiletanolamina    | DPPE |
| Dimiristoilfosfatidilserina         | DMPS |
| Dipalmitoilfosfatidilserina         | DPPS |
| Dipalmitoilfosfatidilserina         | DPSP |
| Diestearoilfosfatidilserina         | DSSP |

El fosfolípido puede estar presente en las partículas en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0 y aproximadamente el 90% en peso. Preferentemente, puede estar presente en las partículas en una cantidad comprendida entre aproximadamente el 10 y aproximadamente el 60% en peso.

20

Los fosfolípidos o combinaciones de los mismos pueden seleccionarse de manera que impartan propiedades de liberación de control a las partículas. Las partículas que tienen propiedades de liberación controladas y procedimientos de modulación de la liberación de un agente biológicamente activo se describen en la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 60/150.742 con el título de Modulación de la liberación a partir de formulaciones de polvo seco mediante el control de la transición de matriz, presentada el 25 de agosto de 1999, la solicitud de patente no provisional de EE.UU. nº 09/644.736, presentada el 23 de agosto de 2000, con el título Modulación de la liberación a partir de formulaciones de polvo seco y la solicitud de patente no provisional de EE.UU. nº 09/792.869 presentada el 23 de febrero de 2001, con el expediente nº 2685.1012-004, y con el título Modulación de la liberación a partir de formulaciones de polvo seco. La liberación rápida, preferida en el suministro de un medicamento de terapia de rescate, puede obtenerse por ejemplo, incluyendo en las partículas fosfolípidos caracterizados por bajas temperaturas de transición. En otra realización, una combinación de partículas de liberación rápidas controladas permitiría una terapia de rescate acoplado con una liberación más sostenida en una única causa de tratamiento. Las propiedades de liberación de control pueden usarse en un tratamiento en curso no de rescate en un trastorno del SNC.

35

Las partículas pueden incluir un tensioactivo. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "tensioactivo" se refiere a cualquier agente que absorbe preferentemente en una interfaz entre dos fases inmiscibles,

tal como la interfaz entre agua y una solución de polímero orgánico, una interfaz agua/aire o una interfaz disolvente orgánico/aire. Los tensioactivos poseen en general una fracción hidrófila y una fracción lipófila, de manera que, tras su absorción en las micropartículas, suelen presentar fracciones ante el entorno externo que no atraen a partículas recubiertas de forma similar, reduciendo así la aglomeración de partículas. Los tensioactivos pueden promover también la absorción de un agente terapéutico o diagnóstico y aumentar la biodisponibilidad del agente.

Además de tensioactivos pulmonares, como, por ejemplo, los fosfolípidos expuestos anteriormente, los tensioactivos adecuados incluyen pero no se limitan a hexadecanol; alcoholes grasos tales como polietilenglicol (PEG); éter polioxietilen-9-laurílico; un ácido graso activo de superficie, tal como ácido palmítico o ácido oleico; gluocolato; surfactina; un poloxámero, un éster de ácido graso de sorbitano tal como trioleato de sorbitano (Span 85); y tiloxapol.

El tensioactivo puede estar presente en las partículas en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0 y aproximadamente el 90% en peso. Preferentemente, puede estar presente en las partículas en una cantidad comprendida entre aproximadamente el 10 y aproximadamente el 60% en peso.

Los procedimientos de preparación y administración de partículas que incluyen tensioactivos, y, en particular fosfolípidos, tal como se divulga en la patente de EE.UU. 5.855.913, emitida el 5 de enero de 1999 para Hanes y col. y en la patente de EE.UU. 5.985.309 emitida el 16 de noviembre de 1999 para Edwards y col.

Las partículas pueden incluir un aminoácido. Se prefieren los aminoácidos hidrófobos. Los aminoácidos adecuados incluyen aminoácidos hidrófobos de ocurrencia natural y no natural. Los ejemplos de aminoácidos que pueden emplearse incluyen, pero no se limitan a: glicina, prolina, alanina, cisteína, metionina, valina, leucina, tirosina, isoleucina, fenilalanina, triptófano. Los aminoácidos hidrófobos preferidos, incluyen pero no se limitan a, leucina, isoleucina, alanina, valina, fenilalanina, glicina y triptófano. También pueden emplearse los aminoácidos que incluyen combinaciones de aminoácidos hidrófobos. Los aminoácidos de ocurrencia no natural incluyen, por ejemplo, beta-aminoácidos. Pueden emplearse configuraciones D, L y racémicas de aminoácidos hidrófobos. Los aminoácidos hidrófobos adecuados pueden incluir también análogos de aminoácido. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, un análogo de aminoácido incluye la configuración D o L de un aminoácido que tiene la fórmula siguiente:  $-NH-CHR-CO-$ , donde R es un grupo alifático, un grupo alifático sustituido, un grupo bencilo, un grupo bencilo sustituido, un grupo aromático o un grupo aromático sustituido y donde R no corresponde a la cadena lateral de un aminoácido de ocurrencia natural. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los grupos alifáticos incluyen hidrocarburos C1-C8 de cadena recta, ramificada o cíclicos que están completamente saturados, que contienen uno o dos heteroátomos tales como nitrógeno, oxígeno o azufre y/o que contienen una o más unidades de insaturación. Los grupos aromáticos incluyen grupos aromáticos carbocíclicos tales como fenilo y naftilo y grupos aromáticos heterocíclicos tales como imidazolilo, indolilo, tienilo, furanilo, piridilo, piranilo, oxazolilo, benzotienilo, benzofuranilo, quinolinilo, isoquinolinilo y acridinilo.

Los sustituyentes adecuados en un grupo alifático, aromático o bencilo incluyen -OH, halógeno (-Br, -Cl, -I y -F) -O(grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido), -CN, -NO<sub>2</sub>, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -IVFI(grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido), -N(grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido)<sub>2</sub>, -COO(grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido), -CONH<sub>2</sub>, -CONH(grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido), -SH, -S(grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, aromático o aromático sustituido) y -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>. Un grupo bencílico o aromático sustituido puede tener también un grupo alifático o alifático sustituido como sustituyente. Un grupo alifático sustituido puede tener también un bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido como sustituyente. Un grupo alifático sustituido, aromático sustituido o bencilo sustituido puede tener uno o más sustituyentes. La modificación de un sustituyente de aminoácidos puede aumentar, por ejemplo, la lipofilia o la hidrofobia de los aminoácidos naturales que son hidrófilos.

Una serie de los aminoácidos, análogos de aminoácidos y sales de los mismos adecuados puede obtenerse comercialmente. Otros pueden sintetizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Las técnicas de síntesis se describen, por ejemplo, en Green y Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Capítulos 5 y 7, 1991.

La hidrofobia se define en general con respecto a la distribución de un aminoácido entre un disolvente no polar y agua. Los aminoácidos hidrófobos son aquellos ácidos que muestran preferencia por el disolvente no polar. La hidrofobia relativa de los aminoácidos puede expresarse en una escala de hidrofobia en la que la glicina tiene el valor 0,5. En dicha escala, los aminoácidos que tienen preferencia por el agua tienen valores inferiores a 0,5 y los que tienen preferencia por disolventes no polares tienen un valor superior a 0,5. Tal como se usa en la presente

memoria descriptiva, el término aminoácido hidrófobo se refiere a un aminoácido que, en la escala de hidrofobia tiene un valor mayor o igual a 0,5, en otras palabras, tiene tendencia a distribuirse en el ácido no polar que es al menos igual al de la glicina.

- 5 También pueden emplearse combinaciones de aminoácidos hidrófobos. Además, también pueden emplearse combinaciones de aminoácidos hidrófobos o hidrófilos (preferentemente distribuidos en agua), donde la combinación global es hidrófoba. También pueden emplearse combinaciones de uno o más aminoácidos y uno o más fosfolípidos o tensioactivos. Se prefieren los materiales que imparten cinética de liberación rápida al medicamento.
- 10 El aminoácido puede estar presente en las partículas de la invención en una cantidad de al menos el 10% en peso. Preferentemente, el aminoácido puede estar presente en las partículas en una cantidad comprendida entre aproximadamente el 20 y aproximadamente el 80% en peso. La sal de un aminoácido hidrófobo puede estar presente en las partículas de la invención en una cantidad de al menos el 10% peso. Preferentemente, la sal del aminoácido está presente en las partículas en una cantidad comprendida entre aproximadamente el 20 y
- 15 aproximadamente el 80% en peso. Los procedimientos de formación y suministro de partículas que incluyen un aminoácido se describen en la solicitud de patente de EE.UU. nº 09/382.959, presentada el 25 de agosto de 1999, titulada Uso de aminoácidos simples para formar partículas porosas durante el secado por pulverización y en la solicitud de patente no provisional de EE.UU. nº 09/644.320, presentada el 23 de agosto de 2000, titulada Uso de aminoácidos simples para formar partículas porosas, cuyas enseñanzas se incorporan en su totalidad como referencia en la presente memoria descriptiva.
- 20

En otra realización de la invención, las partículas incluyen una fracción de carboxilato y una sal de metal multivalente metal. También pueden incluirse uno o más fosfolípidos. Dichas composiciones se describen en la solicitud provisional de EE.UU. 60/150,662, presentada el 25 de agosto de 1999, titulada Formulación para secado por

25 pulverización de partículas porosas grandes, y la solicitud de patente no provisional de EE.UU. nº 09/644.105, presentada el 23 de agosto de 2000, titulada Formulación para secado por pulverización de partículas porosas grandes, cuyas enseñanzas se incorporan en su totalidad como referencia en la presente memoria descriptiva. En una realización preferida, las partículas incluyen citrato de sodio y cloruro de calcio.

30 Pueden emplearse también otros materiales, preferentemente materiales que promueven la cinética de liberación rápida del medicamento. Por ejemplo, pueden emplearse polímeros biocompatibles, y preferentemente biodegradables. Se describen partículas que incluyen dichos materiales poliméricos en la patente de EE.UU. 5,874,064, emitida el 23 de febrero de 1999 para Edwards y col., cuyas enseñanzas se incorporan en su totalidad como referencia en la presente memoria descriptiva.

35

Las partículas pueden incluir también un material como, por ejemplo, dextrano, polisacáridos, lactosa, trehalosa, ciclodextrinas, proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos grasos, compuestos inorgánicos, fosfatos.

En un ejemplo específico, las partículas incluyen (en % en peso) el 50% de L-Dopa, el 25% de DPPC, el 15% de citrato de sodio y el 10% de cloruro de calcio. En otro ejemplo específico, las partículas incluyen (en % en peso) el

40 50% de L-Dopa, el 40% de leucina y el 10% de sacarosa. En otra realización más las partículas incluyen (en % en peso) el 10% de benzodiazepina, el 20% de citrato de sodio, el 10% de cloruro de calcio y el 60% de DPPC.

Las partículas que tienen una densidad aparente inferior a aproximadamente  $0,4 \text{ g/cm}^3$  se refieren en la presente memoria descriptiva como "partículas ligeras aerodinámicamente". La densidad aparente puede medirse usando instrumentos conocidos para los expertos en la materia tales como pero sin limitarse al Dual Platform Microprocessor

45 Controlled Tap Density Tester (Vankel, NC) o un instrumento GeoPyc™ (Micrometrics Instrument Corp., Norcross, GA 30093). La densidad aparente es una medida estándar de la densidad de masa envolvente. La densidad aparente puede determinarse usando el procedimiento de USP densidad en masa y densidad aparente, convenio de

50 la Farmacopea de los Estados Unidos, Rockville, MD, 10º Suplemento, 4950-4951, 1999. Entre las características que pueden contribuir a una baja densidad aparente se incluyen una textura superficial irregular y una estructura porosa.

La densidad de masa envolvente de una partícula isótropa se define como la masa de la partícula dividida por el

55 volumen de envolvente de esfera mínimo en el que puede confinarse. En una realización de la invención, las partículas tienen una densidad de masa envolvente inferior a aproximadamente  $0,4 \text{ g/cm}^3$ .

Las partículas ligeras aerodinámicamente tienen un tamaño preferido, por ejemplo, un diámetro geométrico medio en volumen (DGMV) de al menos aproximadamente 5 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ). En una realización, el DGMV es de

aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ . En otra realización de la invención, las partículas tienen un DGMV comprendido entre aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ . En otras realizaciones, las partículas tienen un diámetro medio, un diámetro medio en masa (DMM), un diámetro de envoltorio medio en masa (DEMM) o un diámetro geométrico medio en masa (DGMM) de al menos 5  $\mu\text{m}$ , por ejemplo de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a 5 aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ .

El diámetro de las partículas secadas mediante pulverización, por ejemplo, el DGMV, puede medirse usando un instrumento de detección de zona eléctrica tal como Multisizer IIe (Coulter Electronic, Luton, Beds, Inglaterra), o un instrumento de difracción láser (por ejemplo Helos, fabricado por Sympatec, Princeton, NJ). Otros instrumentos para 10 medir el diámetro de las partículas son bien conocidos en la técnica. El diámetro de las partículas en una muestra estará comprendido en un intervalo que dependerá de factores como la composición de las partículas y los procedimientos de síntesis. La distribución de tamaño de las partículas de una muestra puede seleccionarse de manera que permita un depósito óptimo en lugares diana dentro del tracto respiratorio.

15 Las partículas ligeras aerodinámicamente tienen preferentemente un "diámetro aerodinámico medio en masa" (DAMM), también referido en la presente memoria descriptiva como "diámetro aerodinámico", entre aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . En otra realización de la invención, el DAMM está entre aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ . En una realización adicional, el DAMM está entre aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ .

20 Experimentalmente, el diámetro aerodinámico puede determinarse empleando un procedimiento de sedimentación gravitatoria, en el que el tiempo para que un conjunto de partículas se sedimente a una cierta distancia se usa para inferir directamente el diámetro aerodinámico de las partículas. Un procedimiento indirecto para medir el diámetro aerodinámico medio en masa (DAMM) es el impactador de líquido de etapas múltiples (MSLI).

25 El diámetro aerodinámico,  $d_{acr}$ , puede calcularse a partir de la ecuación:

$$d_{acr} = d_g \sqrt{\rho_{ap}}$$

30 donde  $d_g$  es el diámetro geométrico, por ejemplo el DGMM, y  $\rho$  es la densidad del polvo.

Las partículas que tienen una densidad aparente inferior a aproximadamente 0,4  $\text{g}/\text{cm}^3$ , diámetros medios de al menos aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  y un diámetro aerodinámico de entre aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ , son más capaces de escapar al 35 depósito inercial y gravitatorio en la región orofaríngea, y son direccionados a las vías respiratorias, en particular al tejido pulmonar profundo. El uso de partículas mayores y más porosas resulta ventajoso porque son capaces de convertirse en aerosol con mayor eficiencia que las partículas de aerosol más densas y pequeñas tales como las usadas actualmente para terapias de inhalación.

40 En comparación con partículas más pequeñas y relativamente más densas las partículas ligeras aerodinámicamente de mayor tamaño, que tienen preferentemente un diámetro medio de al menos aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , también pueden potencialmente evitar más acertadamente el atrapamiento fagocitario por parte de los macrófagos alveolares y el aclaramiento de los pulmones, debido a la exclusión por tamaños de las partículas a partir del espacio citosólico de los fagocitos. La fagocitosis de partículas por los macrófagos alveolares disminuye drásticamente a medida que 45 aumenta el diámetro de partícula por encima de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ . Kawaguchi, H., y col., *Biomaterials* 7:61-66 (1986); Krenis, L.J. y Strauss, B., *Proc. Soc. Exp. Med.*, 107: 748-750 (1961); y Rudt, S. y Muller, R.H., *J. Contr. Rel.*, 22: 263-272 (1992). Para partículas de forma estadísticamente isotropa, tales como esferas con superficies rugosas, el volumen de envoltorio de la partícula es aproximadamente equivalente al volumen del espacio citosólico requerido en un macrófago para que complete la fagocitosis de la partícula.

50 Las partículas pueden fabricarse con el material, la rugosidad superficial, el diámetro y la densidad aparente apropiados para el suministro localizado en las regiones seleccionadas del tracto respiratorio tales como el tejido pulmonar profundo o las vías respiratorias superiores o centrales. Por ejemplo, pueden usarse partículas más grandes o de mayor densidad para el suministro en las vías respiratorias superiores, o puede administrarse una 55 mezcla de partículas de tamaño variable en una muestra, provistas del mismo agente terapéutico o de uno diferente a diferentes regiones diana del pulmón en una administración. Se prefieren las partículas que tienen un diámetro aerodinámico comprendido entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  para el suministro a las vías

respiratorias centrales y superiores. Se prefieren partículas que tienen un diámetro aerodinámico comprendido entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3 µm para el suministro al tejido pulmonar profundo.

La impactación inercial y la sedimentación gravitatoria de los aerosoles son mecanismos de depósito predominantes en las vías respiratorias y los ácidos de los pulmones durante las condiciones de respiración normales. Edwards, D.A., J. Aerosol Sci., 26: 293-317 (1995). La importancia de estos dos mecanismos de depósito aumenta en proporción con la masa de los aerosoles y no con el volumen de las partículas (o envoltantes). Dado que el lugar de depósito de aerosoles en los pulmones está determinado por la masa del aerosol (al menos para partículas de diámetro aerodinámico medio de más de aproximadamente 1 µm), al disminuir la densidad aparente mediante el incremento de las irregularidades superficiales de las partículas y la porosidad de las partículas se permite el suministro de volúmenes mayores de envoltante de las partículas en los pulmones, mientras todos los demás parámetros físicos permanecen sin cambios.

Las partículas de baja densidad aparente tienen un diámetro aerodinámico menor en comparación con el diámetro de la esfera de la envoltante real. El diámetro aerodinámico,  $d_{acr}$ , está relacionado con el diámetro de la esfera de la envoltante,  $d$  (Gonda, I., "Physico-chemical principles in aerosol delivery", en Topics in Pharmaceutical Sciences 1991 (eds. D.J.A. Crommelin y K.K. Midha), pp. 95-117, Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1992)), por la fórmula:

$$d_{acr} = d\sqrt{\rho}$$

donde la masa de la envoltante  $p$  está en unidades de  $g/cm^3$ . El depósito máximo de las partículas de aerosol monodispersadas en la región alveolar del pulmón humano (~60%) tiene lugar para un diámetro aerodinámico de aproximadamente  $d_{acr} = 3 \mu m$ . Heyder, J. y col., J. Aerosol Sci., 17: 811-825 (1986). Debido a su pequeña densidad de masa envoltante, el diámetro real  $d$  de las partículas ligeras aerodinámicamente que comprenden un polvo inhalado monodispersado que mostrarán un depósito máximo en el tejido pulmonar profundo es:

$$d = 3 / \sqrt{\rho} \mu m \text{ (donde } \rho < 1 g/cm^3 \text{)}$$

donde  $d$  es siempre mayor que 3 µm. Por ejemplo, las partículas ligeras aerodinámicamente que muestran una densidad de masa envoltante,  $p = 0,1 g/cm^3$ , mostrarán un depósito máximo para partículas que tienen diámetros de envoltante de hasta 9,5 µm. El aumento en el tamaño de las partículas reduce las fuerzas de adhesión entre partículas. Visser, J., Powder Technology, 58: 1-10. Así, un tamaño de partículas grande aumenta la eficiencia de la aerosolización en el tejido pulmonar profundo para partículas de baja densidad de masa envoltante, además de contribuir a menores pérdidas fagocíticas.

El diámetro aerodinámico puede calcularse para proporcionar un depósito máximo en los pulmones. Antes, este resultado se conseguía mediante el uso de partículas muy pequeñas de menos de aproximadamente cinco micrómetros de diámetro, preferentemente entre aproximadamente uno y aproximadamente tres micrómetros, que a continuación se someten a fagocitosis. La selección de partículas que tienen un diámetro mayor, pero que son suficientemente ligeras (de ahí la caracterización de "ligeras aerodinámicamente"), produce un suministro equivalente a los pulmones, pero las partículas de mayor tamaño no son fagocitadas. Puede obtenerse un suministro mejorado usando partículas con una superficie rugosa o desigual con respecto a las que tienen una superficie lisa.

Las partículas pueden tener una densidad de masa envoltante, referida también en la presente memoria descriptiva como "densidad de masa" inferior a aproximadamente  $0,4 g/cm^3$ .

La densidad de masa y la relación entre densidad de masa, diámetro medio y diámetro aerodinámico se exponen en la solicitud de EE.UU. nº 08/655.570, presentada el 24 de mayo de 1996.

Las partículas adecuadas pueden fabricarse o separarse, por ejemplo, por filtrado o centrifugado, para proporcionar una muestra de partículas con una distribución de tamaños preseleccionada. Por ejemplo, más de aproximadamente el 30%, el 50%, el 70% o el 80% de las partículas en una muestra pueden tener un diámetro dentro del intervalo seleccionado de al menos aproximadamente 5 µm. El intervalo seleccionado dentro de un cierto porcentaje de las partículas debe estar situado por ejemplo, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 30 µm, o de forma óptima entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 µm. En una realización preferida, al menos una parte de las partículas tienen un diámetro entre aproximadamente 9 y aproximadamente 11 µm. Opcionalmente, la muestra de

partículas también puede fabricarse donde al menos aproximadamente el 90%, u opcionalmente aproximadamente el 95% o aproximadamente el 99%, tienen un diámetro dentro del intervalo seleccionado. La presencia de la más elevada proporción de las partículas aerodinámicamente ligeras de mayor diámetro en la muestra de partículas mejora el suministro de agentes terapéuticos o diagnósticos incorporados en la misma al tejido pulmonar profundo.

- 5 Partículas de diámetro grande significan en general partículas que tienen un diámetro geométrico medio de al menos aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ .

Las partículas adecuadas que pueden emplearse en la invención se fabrican mediante secado por pulverización. El procedimiento puede incluir la formación de una mezcla que incluye L-Dopa y un tensioactivo, como, por ejemplo, los  
10 tensioactivos descritos anteriormente. En una realización preferida, la mezcla incluye un fosfolípido, como, por ejemplo, los fosfolípidos descritos anteriormente. La mezcla empleada en el secado por pulverización puede incluir un disolvente orgánico o acuoso-orgánico.

Los disolventes orgánicos adecuados que pueden emplearse incluyen pero no se limitan a alcoholes por ejemplo,  
15 etanol, metanol, propanol, isopropanol, butanoles y otros. Otros disolventes orgánicos incluyen pero no se limitan a perfluorocarbonos, diclorometano, cloroformo, éter, acetato de etilo, éter metil-terc-butílico y otros.

Los codisolventes incluyen un disolvente acuoso y un disolvente orgánico, tal como, pero sin limitarse a, los disolventes orgánicos tal como se describe anteriormente. Los disolventes acuosos incluyen agua y soluciones con  
20 tampón. En una realización, se prefiere un disolvente en agua y etanol con la proporción entre etanol y agua comprendida entre aproximadamente 50:50 y aproximadamente 90:10 de etanol:agua.

La mezcla sometida a secado por pulverización puede tener un pH neutro, ácido o alcalino. Opcionalmente, puede añadirse un amortiguador de pH al disolvente o codisolvente o a la mezcla formada. Preferentemente, el pH puede  
25 estar comprendido entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10.

Las técnicas de secado por pulverización adecuadas son descritas, por ejemplo, por K. Masters en "Spray Drying Handbook", John Wiley & Sons, Nueva York, 1984. En general, durante el secado por pulverización, se usa el calor de un gas caliente como aire o nitrógeno calentado para evaporar el disolvente de las gotas formadas al atomizar  
30 una alimentación de líquido continua. Otras técnicas de secado por pulverización son bien conocidas para los expertos en la materia. En una realización preferida se emplea un atomizador rotatorio. Un ejemplo de secadores por pulverización adecuados que usan atomización rotatoria incluye el secador por pulverización Mobile Minor, fabricado por Niro, Dinamarca. El gas caliente puede ser, por ejemplo, aire, nitrógeno o argón.

35 En un ejemplo específico se combinan 250 miligramos (mg) de L-Dopa en 700 mililitros (ml) de etanol con 300 ml de agua que contiene 500 mg de L-Dopa, 150 mg de citrato de sodio y 100 mg de cloruro de calcio y la mezcla resultante se seca por pulverización. En otro ejemplo, se combinan 700 ml de agua que contiene 500 mg de L-Dopa, 100 de sacarosa y 400 mg de leucina con 300 ml de etanol y la mezcla resultante se seca por pulverización.

40 Las partículas pueden fabricarse con una textura de superficie rugosa para reducir la aglomeración de partículas y mejorar la fluencia del polvo. Las partículas secadas mediante pulverización tienen propiedades de aerosolización mejoradas. La partícula secada por pulverización puede fabricarse con características que mejoran la aerosolización por medio de dispositivos de inhalador de polvo seco, y conducen a un menor depósito en la boca, la garganta y el dispositivo inhalador.

45 Las partículas descritas en la presente memoria descriptiva pueden emplearse en composiciones adecuadas para suministro del fármaco al sistema pulmonar. Por ejemplo, dichas composiciones pueden incluir las partículas y un soporte farmacéuticamente aceptable para la administración a un paciente, preferentemente para la administración por medio de inhalación. Las partículas pueden administrarse en solitario o en cualquier soporte farmacéuticamente  
50 aceptable apropiado, tal como un líquido, por ejemplo suero salino, o un polvo, para la administración al sistema respiratorio. Pueden suministrarse de forma conjunta con partículas de soporte más grandes, sin incluir un agente terapéutico, donde el último posee diámetros medios en masa por ejemplo en el intervalo entre aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .

55 Las dosificaciones, las formulaciones y los sistemas de suministro de aerosol pueden seleccionarse para una aplicación terapéutica en particular, tal como se describe, por ejemplo, en Gonda, L "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract", en Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6: 273-313, 1990; y en Moren, "Aerosol dosage forms and formulations", en: Aerosols in Medicine. Principles, Diagnosis and Therapy, Moren, y col., Eds, Elsevier, Ámsterdam, 1985.

La invención incluye el suministro al sistema pulmonar de una cantidad eficaz de un medicamento como, por ejemplo, un medicamento descrito anteriormente. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "cantidad eficaz" significa la cantidad necesaria para conseguir el efecto o la eficacia deseados. Las cantidades 5 eficaces reales de fármaco pueden variar de acuerdo con el fármaco específico o la combinación de los mismos que se usan, la composición particular formulada, el modo de administración y la edad, el peso, el estado del paciente y la gravedad del episodio que se trata. En la terapia de rescate, la cantidad eficaz se refiere a la cantidad necesaria para conseguir la remisión de los síntomas o el fin del episodio. En el caso de un precursor de la dopamina, el agonista o la combinación de los mismos es una cantidad que reduce los síntomas del Parkinson que requieren 10 terapia de rescate. Las dosificaciones para un paciente en particular se describen en la presente memoria descriptiva y pueden determinarse por un experto en la materia usando consideraciones convencionales (por ejemplo por medio de un protocolo farmacológico convencional apropiado). Por ejemplo, las cantidades eficaces de L-Dopa oral están comprendidas entre aproximadamente 50 miligramos (mg) y aproximadamente 500 mg. En muchos aspectos, un plan terapéutico común continuado con L-Dopa (oral) es de 100 mg ocho (8) veces al día. 15 Durante la terapia de rescate, las dosis eficaces de L-Dopa oral son similares en general a las administradas en el tratamiento en curso.

Para ser eficaz durante la terapia de rescate, las concentraciones plasmáticas de L-dopa suelen ser similares a las que se utilizan durante el tratamiento continuado (terapia no de rescate) con L-Dopa. Las cantidades eficaces de L- 20 Dopa suelen producir concentraciones plasmáticas que están comprendidas entre aproximadamente 0,5 microgramos ( $\mu\text{g}$ )/litro(1) y aproximadamente 2,0  $\mu\text{g/l}$ .

En la presente invención se ha descubierto que la administración pulmonar de dosis de L-Dopa, cuando se normaliza para el peso corporal, produce al menos un aumento de 2 veces tanto en los valores plasmáticos como en 25 las ventajas terapéuticas en comparación con la administración oral. Son posibles concentraciones plasmáticas y ventajas terapéuticas considerablemente mayores en comparación con la administración oral. En un ejemplo, la administración pulmonar de L-Dopa produce un aumento en la concentración plasmática comprendido entre aproximadamente 2 veces y aproximadamente 10 veces cuando se compara con la administración oral. Pueden obtenerse concentraciones plasmáticas que se acercan o son similares a las obtenidas con la administración 30 intravenosa. Se logran hallazgos similares con otros fármacos adecuados en el tratamiento de trastornos del SNC, como, por ejemplo, ketoprofeno.

Suponiendo que la biodisponibilidad sigue siendo la misma a medida que aumenta la dosificación, la cantidad de L-Dopa oral necesaria para alcanzar concentraciones plasmáticas comparables a las resultantes de la administración 35 pulmonar por los procedimientos de la invención puede determinarse en un momento dado después de la administración. En un ejemplo específico, las concentraciones plasmáticas 2 minutos después de la administración oral mediante los procedimientos de la invención, respectivamente, son 1  $\mu\text{g/ml}$  de L-Dopa y 5  $\mu\text{g/ml}$  de L-Dopa. Así se necesitaría 5 veces la dosis oral para conseguir el valor de 5  $\mu\text{g/ml}$  obtenido mediante la administración del fármaco usando los procedimientos de la invención. En otro ejemplo, las concentraciones plasmáticas de L-Dopa a 40 120 minutos después de la administración son el doble que con los procedimientos de la invención cuando se compara con la administración oral. Así se requieren dos veces las cantidades de L-Dopa después de la administración de 1  $\mu\text{g/ml}$  tras la administración oral en comparación con la cantidad administrada usando los procedimientos de la invención.

Para obtener una concentración plasmática de fármaco dada en un momento dado después de la administración, se requiere menos fármaco cuando el fármaco se suministra mediante los procedimientos de la invención que cuando se administra oralmente. En general, puede emplearse al menos una reducción de la dosis de dos veces en los 45 procedimientos de la invención en comparación con la dosis usada en la administración oral convencional. Es posible una reducción de la dosis muy superior. En una realización de la invención, se emplea una reducción de la dosis de cinco veces y pueden usarse reducciones de hasta aproximadamente diez veces en comparación con la 50 dosis oral.

También se emplea una reducción de la dosis de al menos a dos veces en comparación con otras vías de administración, aparte de la intravenosa, como, por ejemplo, intramuscular, subcutánea, bucal, nasal, intraperitoneal, 55 rectal.

Además o alternativamente al efecto farmacocinético (por ejemplo, concentración sérica, ventaja de la dosis) descrito anteriormente, la ventaja de la dosis resultante de la administración pulmonar de, L-Dopa, usada para tratar la enfermedad de Parkinson, también puede describirse en términos de una respuesta farmacodinámica. En

comparación con la vía oral, la invención evita la captación inconsistente del medicamento por el intestino, evita la captación retardada después de la ingesta, evita el catabolismo de primer paso del fármaco en la circulación y el rápido suministro desde el pulmón al encéfalo por medio de la arteria aorta.

- 5 Tal como se expone anteriormente, a menudo se desea un suministro rápido al lugar de acción del medicamento. Preferentemente, la cantidad eficaz se suministra en el "primer paso" de la sangre al lugar de acción. El "primer paso" es la primera vez que la sangre transporta el fármaco hasta el interior del órgano diana desde el punto en que el fármaco pasa del pulmón al sistema vascular. En general, el medicamento se libera en el torrente sanguíneo y se suministra en su lugar de acción en un periodo de tiempo que es suficientemente breve para proporcionar la terapia  
10 de rescate al paciente sometido a tratamiento. En muchos casos, el medicamento puede llegar al sistema nervioso central en menos de aproximadamente 10 minutos, a menudo hasta en dos minutos e incluso antes.

- Preferentemente, los síntomas del paciente remiten en cuestión de minutos y en general en no menos de una hora. En una realización de la invención, las cinéticas de liberación del medicamento son sustancialmente similares a las  
15 cinéticas del fármaco conseguidas por medio de la vía intravenosa. En otra realización de la invención, la  $T_{m\acute{a}x}$  del medicamento en el torrente sanguíneo está comprendida entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 minutos. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término  $T_{m\acute{a}x}$  significa el punto en el que los valores alcanzan una concentración máxima. En muchos casos, el inicio del tratamiento obtenido usando los procedimientos de la invención es al menos dos veces más rápido que el inicio del tratamiento obtenido con el suministro oral. Pueden  
20 obtenerse inicios del tratamiento significativamente más rápidos. En un ejemplo, el inicio del tratamiento es de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces más rápido que el observado con administración oral.

- Preferentemente, las partículas administradas al tracto respiratorio se desplazan a través de las vías respiratorias superiores (orofaringe y laringe), incluyendo las vías respiratorias inferiores la tráquea seguida por las bifurcaciones  
25 en los bronquios y los bronquiolos y a través de los bronquiolos terminales que se dividen a su vez en los bronquiolos respiratorios para conducir las hasta la zona final, los alveolos o el tejido pulmonar profundo. En una realización preferida de la invención, la mayor parte de la masa de las partículas se deposita en el tejido pulmonar profundo o los alveolos.

- 30 La administración de partículas al sistema respiratorio puede realizarse por medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, las partículas son suministradas a partir de un dispositivo de inhalación. En una realización preferida, las partículas se administran por medio de un inhalador de polvo seco (DPI). También pueden emplearse inhaladores con dosímetro (MDI), nebulizadores o técnicas de instilación.

- 35 En la técnica se conocen varios dispositivos y procedimientos de inhalación adecuados que pueden usarse para administrar partículas al tracto respiratorio de un paciente. Por ejemplo, los inhaladores adecuados se describen en la patente de EE.UU. 4.069.819, emitida el 5 de agosto de 1976 para Valentini, y col., la patente de EE.UU. 4.995.385 emitida el 26 de febrero de 1991 para Valentini, y col. y la patente de EE.UU. 5.997.848 emitida el 7 de diciembre de 1999 para Patton, y col. Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, Spinhaler® (Fisons,  
40 Loughborough, R.U.), Rotahaler® (Glaxo-Wellcome, Research Triangle Technology Park, Carolina del Norte), FlowCaps® (Hovione, Loures, Portugal), Inhalator® (Boehringer-Ingelheim, Alemania) y Aerolizer® (Novartis, Suiza), el Diskhaler (Glaxo-Wellcome, RTP, NC) y otros, como conocen los expertos en la materia. En una realización, el inhalador empleado se describe en la solicitud de patente de EE.UU., titulada Dispositivo y procedimiento de inhalación, de David A. Edwards, y col., presentada el 16 de abril de 2001.

- 45 El suministro al sistema pulmonar de las partículas puede realizarse mediante los procedimientos descritos en la solicitud de patente de EE.UU., Suministro de alta eficiencia de un aerosol de gran masa terapéutica, solicitud nº 09/591.307, presentada el 9 de junio de 2000, y los descritos en la solicitud de EE.UU. de continuación en parte nº 09/591.307.

- 50 Tal como se divulga en la presente memoria descriptiva, las partículas son retenidas, contenidas, almacenadas o confinadas en un recipiente. Preferentemente, el recipiente, por ejemplo una cápsula o un blíster, tiene un volumen de al menos aproximadamente  $0,37\text{ cm}^3$  y puede tener un diseño adecuado para su uso en un inhalador de polvo seco. Pueden emplearse recipientes más grandes que tienen un volumen de al menos aproximadamente  $0,48\text{ cm}^3$ ,  
55  $0,67\text{ cm}^3$  o  $0,95\text{ cm}^3$ .

En un ejemplo, al menos el 50% de la masa de las partículas almacenadas en el recipiente del inhalador se suministra al sistema respiratorio de un sujeto en una única etapa activada por respiración. En otra realización, se suministran al menos 10 miligramos del medicamento mediante la administración, en una única respiración, al tracto

respiratorio de un sujeto las partículas confinadas en el recipiente. Pueden suministrarse cantidades de hasta 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 50 miligramos.

El suministro al sistema pulmonar de partículas en una única etapa activada por respiración se mejora empleando 5 partículas que se dispersan a energías relativamente bajas, como, por ejemplo, a las energías suministradas normalmente por la inhalación de un sujeto. Dichas energías se refieren en la presente memoria descriptiva como "bajas". Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "administración de baja energía" se refiere a la administración en que la energía aplicada para dispersar y/o inhalar las partículas está en el intervalo suministrado normalmente por un sujeto durante la inhalación.

10

En un ejemplo específico, el polvo seco de un recipiente de inhalador de polvo seco, por ejemplo, una cápsula, que contiene 25 mg de dosis nominal de polvo que tiene una carga de L-Dopa al 50%, es decir, 12,5 mg de L-Dopa, se administra en una única respiración. Basándose en una ventaja de dosis conservadora de 4 veces, los 12,5 mg suministrados en una respiración son el equivalente de aproximadamente 50 mg de L-Dopa necesarios en la 15 administración oral. Pueden emplearse varias de estas cápsulas para suministrar dosis de L-Dopa más elevadas. Por ejemplo puede usarse un tamaño de 4 cápsulas para suministrar 50 mg de L-Dopa al sistema pulmonar con el fin de sustituir (considerando la misma ventaja de dosis conservadora de 4 veces) a una dosis oral de 200 mg.

## EJEMPLOS

20

### Ejemplo 1

Se realizaron pruebas *in vivo* para comparar la administración oral y traqueal de L-Dopa en un modelo de ratas. Los animales recibieron una inyección IP del inhibidor periférico de la descarboxilasa carbidopa (Sigma, St Louis, MO) 25 (200 mg/kg) una hora antes de la administración de L-Dopa. Con anestesia de ketamina, se dividió a los animales en dos grupos. En el primer grupo de animales (N = 4) la L-Dopa (8 mg) se puso en suspensión en suero salino que contenía metilcelulosa al 2% y se suministró por alimentación forzada por vía oral. En el segundo grupo (N = 5) se realizó una pequeña traqueotomía para permitir la colocación de la punta de una pipeta con una abertura de 2 mm modificada a través de la tráquea y hasta los pulmones. Se precargó la punta de la pipeta con L-Dopa en polvo (8 30 mg) y se puso en interfaz con un depósito de oxígeno usando conducciones de silicona. En coincidencia con el ciclo respiratorio del animal, se impulsó la L-Dopa hasta los pulmones usando una carga de oxígeno (5 litros/minuto). Se retiraron muestras de sangre (200  $\mu$ l) de una cánula femoral colocada previamente en los siguientes puntos temporales: 0 (inmediatamente antes de la administración de L-Dopa), 1, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos después de la administración de L-Dopa.

35

Las concentraciones sanguíneas de L-Dopa, medidas, respectivamente, por espectrometría de masas o HPLC, después de la administración por alimentación forzada por vía oral o administración directa en los pulmones se muestran en las Fig. 1A y 1B. El aumento en las concentraciones sanguíneas de L-Dopa con el tiempo después de la administración oral fue moderado. En cambio, la administración en los pulmones produjo un aumento robusto y 40 rápido en las concentraciones de L-Dopa que alcanzaron un máximo entre 1 y 5 minutos después de la administración del fármaco. Las concentraciones de L-Dopa en este grupo disminuyeron entre 5 y 15 minutos y se mantuvieron estables posteriormente. Los datos se presentan en forma de la media  $\pm$  ECM en concentraciones de L-Dopa en ng/ml de sangre.

45 La relación entre las concentraciones sanguíneas de L-Dopa y las concentraciones estriatales de dopamina después del suministro de L-Dopa por vía oral o directamente en los pulmones, tal como se describe anteriormente, se muestra en las Fig. 2A y 2B. La Fig. 2A muestra las concentraciones sanguíneas de L-Dopa inmediatamente antes de L-Dopa (valor basal) y 2, 15 y 45 minutos después de L-Dopa (N = 4-6 por punto temporal para cada grupo). Una vez más, los valores después de la administración en los pulmones muestran un incremento robusto y rápido en las 50 concentraciones de L-Dopa, con respecto a los aumentos moderados después de la administración oral.

La Fig. 2B muestra las concentraciones de dopamina en el estriado para los mismos animales mostrados en la Fig. 2A. Inmediatamente después de la extracción de la muestra de sangre, se les extirpó el cerebro y se diseccionó el estriado. Se determinaron las concentraciones tisulares de dopamina usando cromatografía líquida de alto 55 rendimiento (HPLC). Debe observarse que la acusada diferencia en las concentraciones sanguíneas de L-Dopa observadas entre los dos tratamientos a los dos minutos se siguió, más adelante en el tiempo, de diferencias más moderadas pero significativas en los valores estriatales de dopamina. Las concentraciones sanguíneas se presentan como la media  $\pm$  ECM de las concentraciones sanguíneas en ng de L-Dopa/ml de sangre. Los valores estriatales de dopamina se presentan como la media  $\pm$  ECM de ng de dopamina/ mg de proteína.

También se determinaron las concentraciones sanguíneas y estriales de <sup>14</sup>C después de la administración de <sup>14</sup>C-L-Dopa tal como se describe anteriormente y se muestran en la Fig. 3. Se mezcló un total de 25 µCi de L-Dopa radiomarcada con L-Dopa no marcada para proporcionar una concentración total de fármaco de 8 mg/rata. Se tomaron muestras de sangre 2, 5 y 15 minutos después de la administración del fármaco L-Dopa (N = 6 por punto temporal para cada grupo). A los 5 o 15 minutos después de L-Dopa, se extirpó el estriado y se sometieron a ensayo las muestras de sangre y de tejido para determinar los valores de <sup>14</sup>C usando centelleo. Los valores plasmáticos en el minuto cero se deducen de otros estudios que usan agentes radiactivos.

Una vez más, se alcanzó un incremento robusto y rápido en las concentraciones plasmáticas por la vía pulmonar, lo que se reflejó en un aumento de la actividad de la dopamina en el encéfalo en los puntos temporales de 5 minutos y 15 minutos tiempo (con respecto a la administración oral).

En la Fig. 4 se muestra la comparación directa de los valores plasmáticos de <sup>14</sup>C después de la administración de <sup>14</sup>C-L-Dopa por alimentación forzada por vía oral, la inhalación usando una traqueotomía (tal como se describe anteriormente) o un ventilador (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA). En la Fig. 5 se muestran las concentraciones encefálicas de <sup>14</sup>C-L-Dopa. Se anestesió a todos los animales brevemente con isoflurano al 1% y fueron inmovilizados en un arnés para permitir la extracción de sangre por medio de una cánula femoral colocada previamente. Las muestras de sangre se extrajeron 0, 2, 5 y 15 minutos después de la administración. Para la administración de L-Dopa usando el ventilador, se colocó un catéter de calibre 24 en la tráquea y se administró la L-Dopa (25 µCi) durante un periodo de 3-5 segundos usando un volumen corriente de 1 ml y 100 golpes/minuto. Se procesaron las muestras de tejido estriatal para determinar los valores de radioactividad usando recuentos de centelleo. Los valores plasmáticos y encefálicos de <sup>14</sup>C fueron comparativamente elevados tanto con los procedimientos convencionales de traqueotomía como con el ventilador.

**Ejemplo de referencia 1**

Se determinaron las concentraciones sanguínea, encefálica y en los órganos periféricos de <sup>14</sup>C después de la administración de <sup>14</sup>C-carboplatino por administración IV o pulmonar. Se mezcló un total de 100 µCi de carboplatino radiomarcado con carboplatino no marcado para proporcionar una concentración total de fármaco de 8 mg/rata. Se anestesió a todos los animales con ketamina. Para administración IV, se administró carboplatino por medio de una cánula femoral colocada previamente. Para administración pulmonar, se colocó un catéter de calibre 24 en la tráquea y se administró el carboplatino usando un ventilador Harvard durante un periodo de 3-5 segundos usando un volumen corriente de 1 ml y 100 golpes/minuto. Las muestras de sangre se tomaron 10 minutos después de la administración del fármaco (N = 6 por punto temporal para cada grupo). Se les extirpó el cerebro y se diseccionó en varias regiones incluidas las cortezas olfativa, frontal y occipital, el hipocampo, el estriado y el cerebelo. Los órganos periféricos incluyeron los riñones, el bazo, el corazón, los testículos y el músculo. A continuación se procesaron todas las muestras para determinar los valores de <sup>14</sup>C usando centelleo.

Los resultados se muestran en la Tabla 2, que recoge los recuentos de centelleo de los valores de <sup>14</sup>C en plasma, el encéfalo y los órganos periféricos después de la administración de <sup>14</sup>C-carboplatino (100 µCi/8 mg), y en las Fig. 6A-6B y 7A-7B. Las concentraciones plasmáticas absolutas de <sup>14</sup>C fueron superiores después de la administración IV Sin embargo, las concentraciones encefálicas absolutas fueron comparables lo que parece indicar que el suministro en el encéfalo en este punto temporal fue relativamente selectivo. Este aspecto se aclara cuando se calcula la proporción entre las concentraciones de <sup>14</sup>C en el encéfalo y en la sangre. Después de la administración pulmonar, las concentraciones de <sup>14</sup>C fueron el 2.833% más elevadas que las observadas después de la administración IV Los valores absolutos de <sup>14</sup>C en el tejido periférico fueron también inferiores después de la administración pulmonar (92% menores con respecto a IV). En contraste con las grandes diferencias en la selectividad observadas en el encéfalo, la selectividad periférica relativa (derivada de dividir los valores de radioactividad en los órganos periféricos por el de la sangre) fue sólo el 47% más alto en el grupo pulmonar. De forma interesante, los máximos valores de <sup>14</sup>C en el tejido periférico se encontraron en el corazón. En conjunto, estos datos indican que el encéfalo y el corazón pueden representar lugares de suministro preferente en el punto temporal inmediatamente después de la administración pulmonar del fármaco.

**Tabla 2**

|                               |                       |                         |
|-------------------------------|-----------------------|-------------------------|
|                               |                       | 10 minutos              |
| Concentraciones plasmáticas   | IV                    | 994,348 (n = 6)         |
|                               | Pulmón (% Diferencia) | 102,215 -89,72% (n = 6) |
| Valores absolutos en encéfalo | IV Pulmón             | 29,47 27,29             |

|  |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| (nCi/gramo)  |  |                       |
| Selectividad relativa en encéfalo (Encéfalo/Sangre)                              | IV<br>Pulmón (% Diferencia)<br>IV(Br/B1)/Pulmón(Br/BI)   | 0,03<br>0,88 +2833%   |
| Valores absolutos en tejidos (Órganos periféricos) *excluye riñón                | IV<br>Pulmón (% Diferencia)<br>IV(Br/BI)/Pulmón(Br/BI)   | 0,03<br>0,88 +2833%   |
| Selectividad relativa en órganos periféricos (periféricos/Sangre) *excluye riñón | IV<br>Pulmón (% Diferencia)<br>IV(Por/BI)/Pulmón(Por/BI) | 0,44<br>0,65 +47,727% |

## Ejemplo 2

Las partículas que comprenden L-Dopa y son adecuadas para la inhalación se produjeron del modo siguiente. Se añadieron 2,00123 g de DPPC (Avanti Polar Lipids, Lote # G160PC-25) a 2,80 L de etanol y se agitó para disolución. Se añadieron 0,0817 g de L-Dopa (Spectrum, Lote 0Q0128, Laguna Hills, CA), 0,9135 g de citrato de sodio (deshidratado) (Spectrum Lote NX0195), y 0,5283 g de cloruro de calcio (deshidratado) (Spectrum Lote NT0183) a 1,2 L de agua y se disolvió. Se combinaron las soluciones añadiendo la solución en agua a la solución en etanol y a continuación se dejaron las soluciones en agitación hasta que la solución fue transparente. El % en peso de la formulación fue de aproximadamente: 20% de L-Dopa, 50% de DPPC, 20% de citrato de sodio, 10% de cloruro de calcio.

A continuación se secó por pulverización la solución final en un secador Niro (Niro, Inc., Columbus, MD) usando un atomizador rotatorio y nitrógeno como gas de secado siguiendo las instrucciones del fabricante, usando las siguientes condiciones de pulverización:  $T_{\text{entrada}} = 120^{\circ} \text{C}$ ,  $T_{\text{salida}} = 54^{\circ} \text{C}$ , velocidad de alimentación = 65 ml/min, nitrógeno calentado = 38 mm H<sub>2</sub>O, velocidad de atomizador = 20.000 rpm (atomizador usado V24).

Las características de las partículas resultantes fueron: diámetro aerodinámico medio en masa (DAMM) = 2,141  $\mu\text{m}$  y diámetro geométrico medio en volumen (DGMV) = 10,51  $\mu\text{m}$ .

Con anestesia con ketamina, seis ratas recibieron administración pulmonar de la formulación descrita anteriormente (20/50/20/10 L-Dopa/DPPC/citrato de sodio/cloruro de calcio).

Los resultados se muestran en la Fig. 8. Esta figura muestra las concentraciones sanguíneas de L-Dopa después de la administración por alimentación forzada por vía oral o administración directa en los pulmones por insuflación. Las concentraciones de L-Dopa se midieron con HPLC. Los animales recibieron una inyección IP del inhibidor periférico de la descarboxilasa carbidopa (200 mg/kg) 1 hora antes de la administración de L-Dopa. Con anestesia con ketamina, se dividió a los animales en 2 grupos. En el primer grupo, se dejó a los animales en ayunas durante toda la noche y se suspendió la L-Dopa (8 mg) en suero salino que contenía metilcelulosa al 1% y se suministró por alimentación forzada por vía oral. En el segundo grupo, se usó la insuflación para suministrar la formulación de L-Dopa directamente en los pulmones. Las muestras de sangre (200  $\mu\text{l}$ ) se extrajeron de una cánula femoral colocada previamente en los siguientes puntos temporales: 0 (inmediatamente antes de la administración de L-Dopa), 2, 5, 15 y 30 minutos después de la administración de L-Dopa. El aumento en las concentraciones sanguíneas de L-Dopa con el tiempo después de la administración oral fue moderado. En cambio, la administración en los pulmones produjo un aumento robusto y rápido en las concentraciones de L-Dopa. Las concentraciones de L-Dopa en este grupo se mantuvieron elevadas con respecto al suministro oral 30 minutos después de la administración del fármaco. Los datos se normalizaron a una dosis de 8 mg/kg (la dosis total de alimentación forzada por vía oral). Los datos se presentan en forma de la media ( $\pm$  ECM) ng de L-Dopa/ml de sangre.

## 40 Ejemplo de referencia 2

Se prepararon partículas de ketoprofeno/DPPC/maltodextrina y se administraron *in vivo*.

El Ketoprofeno (99,5%) se obtuvo de Sigma, (St. Louis, MO), la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) y la maltodextrina, de M100 (Grain Processing Corp., Muscatine, IA).

Para preparar soluciones de ketoprofeno/DPPC/maltodextrina, se añadió la maltodextrina (0,598 g) a 0,60 L de agua USP. Se añadió DPPC (0,901 g) a 1,40 L de etanol y se agitó hasta disolución. Se combinaron las soluciones de agua y etanol, para dar como resultado una solución turbia. Se usaron 500 ml de esta solución de reserva para cada

ejecución. La adición de ketoprofeno a la solución de reserva de DPPC/maltodextrina se describe en la Tabla 3.

Se usó un secador por pulverización portátil Niro Atomizer (Niro, Inc., Columbus, MD) para producir los polvos secos. Aire comprimido con presión variable (1 a 5 bar) activó un atomizador rotatorio (2.000 a 30.000 rpm) situado encima del secador. Se bombeó continuamente la alimentación líquida de las soluciones de ketoprofeno/DPPC/maltodextrina, con velocidad variable (20 a 66 ml/min) mediante una bomba con dosímetro electrónico (LMI, modelo #A151-192s) en el atomizador. Se midieron las temperaturas de entrada y de salida. La temperatura de entrada se controló manualmente; pudo hacerse variar entre 100°C y 400°C, con un límite de control de 5°C. La temperatura de salida se determinó mediante la temperatura de entrada y factores como la velocidad de alimentación del gas y el líquido; varió entre 50°C y 130°C. Se fijó fuertemente un contenedor al ciclón de 6" para recoger el producto en polvo. Las condiciones de pulverización para cada solución se suministran en la Tabla 4, que muestra que las condiciones de pulverización se mantuvieron casi constantes durante todo el estudio. En la Tabla 5 se proporcionan la recuperación y el rendimiento total para cada solución.

15 Las partículas se caracterizaron usando el Aerosizer (TSI, Inc., Amherst, MA) y el dispersor de polvo seco RODOS (Sympatec Inc., Princeton, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para RODOS, el diámetro geométrico se midió a 2 bares. También se caracterizó el material de la ejecución #5 usando un impactador en cascada Andersen colapsado gravimétrico (ACI, 2 fases, Anderson Inst., Sunyra, GA). Las muestras se examinaron usando un microscopio electrónico de barrido (MEB).

20 La Tabla 5 indica que el incremento en el % en peso de ketoprofeno condujo a una disminución del rendimiento. La adición de ketoprofeno a la solución de reserva redujo linealmente el rendimiento. Esto puede deberse a una disminución en la temperatura de fusión de DPPC cuando se mezcla con ketoprofeno, lo que lleva a la pérdida de rendimiento.

25 La Tabla 6 muestra que las partículas tuvieron un diámetro comprendido entre 8,8 µm y 10,2 µm (DGMV) y entre 2,65 µm y 3,11 µm (DAMM). Las partículas con DAMM mínimo fueron para el 8,4% de material de carga (ejecución #5).

30 La Tabla 7 muestra los resultados de un estudio de impactador colapsado Andersen (ACI, gravimétrico, n = 2) del material desde la ejecución #5, el 8,4% de material de carga. Las fracciones de partícula fina (FPF) inferiores a 5,6 µm e inferiores a 3,4 µm son consistentes con polvos de los que se espera que sean respirables.

Tabla 3

| ID de muestra | Ketoprofeno añadido (mg) | Sólidos totales (g/L) | % Ketoprofeno |
|---------------|--------------------------|-----------------------|---------------|
| Ejecución #1  | 0                        | 1,000                 | 0             |
| Ejecución #2  | 8,0                      | 1,016                 | 1,6           |
| Ejecución #3  | 15,1                     | 1,030                 | 3,0           |
| Ejecución #4  | 30,1                     | 1,060                 | 5,7           |
| Ejecución #5  | 46,0                     | 1,092                 | 8,4           |
| Ejecución #6  | 63,0                     | 1,126                 | 11,2          |

35

Tabla 4

| ID de muestra | Temperatura (°C) Entrada Salida | Alimentación de líquido (ml/min) | Presión de gas (mmH <sub>2</sub> O) | Velocidad del rotor (RPM) | Punto de rocío de entrada (°C) |
|---------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Ejecución #1  | 115 36                          | 75                               | 40                                  | 18.600                    | -27,0                          |
| Ejecución #2  | 113 38                          | 85                               | 40                                  | 18.400                    | -26,8                          |
| Ejecución #3  | 110 38                          | 85                               | 39                                  | 18.300                    | -26,4                          |
| Ejecución #4  | 110 39                          | 85                               | 38                                  | 18.400                    | -25,9                          |
| Ejecución #5  | 110 38                          | 86                               | 39                                  | 18.400                    | -25,4                          |
| Ejecución #6  | 110 38                          | 85                               | 38                                  | 18.400                    | -25,0                          |

Tabla 5

| ID de muestra | Peso recogido (mg) | Rendimiento teórico(mg) | Rendimiento real (% teórico) |
|---------------|--------------------|-------------------------|------------------------------|
| Ejecución #1  | 186                | 500                     | 37,2                         |
| Ejecución #2  | 195                | 508                     | 38,4                         |
| Ejecución #3  | 147                | 515                     | 28,5                         |

|              |     |     |      |
|--------------|-----|-----|------|
| Ejecución #4 | 127 | 530 | 24,0 |
| Ejecución #5 | 89  | 546 | 16,3 |
| Ejecución #6 | 67  | 563 | 11,9 |

Tabla 6

| ID de muestra | DAMM ( $\mu\text{m}$ ) | Desv. típica | MGVD ( $\mu\text{m}$ , 2 bar) |
|---------------|------------------------|--------------|-------------------------------|
| Ejecución #1  | 3,11                   | 1,48         | 9,0                           |
| Ejecución #2  | 3,01                   | 1,37         | 9,3                           |
| Ejecución #3  | 2,83                   | 1,40         | 10,3                          |
| Ejecución #4  | 2,84                   | 1,41         | 10,4                          |
| Ejecución #5  | 2,65                   | 1,39         | 9,8                           |
| Ejecución #6  | 2,83                   | 1,38         | 8,8                           |

Tabla 7

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Fase 0                   | 1,33 mg  |
| Fase 2                   | 2,75 mg  |
| Fase F                   | 3,17 mg  |
| Llenado de cápsula       | 12,37 mg |
| Peso < 5,6 $\mu\text{m}$ | 5,92     |
| FPF <sub>5,6</sub>       | 0,479    |
| Peso < 3,4 $\mu\text{m}$ | 3,17     |
| FPF <sub>3,4</sub>       | 0,256    |

5

Se produjeron 350 mg de partículas que contenían ketoprofeno al 8% en DPPC/maltodextrina 60/40 tal como se describe anteriormente y se administraron a 20 ratas Sprague Dawley. A las 8 ratas se les suministraron 7 mg de polvo por insuflación, y a 7 ratas se les suministraron oralmente 7 mg de polvo disuelto en etanol al 50%. Los puntos temporales se fijaron en 0, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos. Para t = 0, se sometió a ensayo a 4 animales sin dosificación. Para cada punto temporal posterior, se tomaron muestras de 3 ó 4 ratas. Cada rata se usó para 4 puntos temporales, con 3 ó 4 animales cada uno en cuatro grupos. Los animales se distribuyeron del modo siguiente: 3 animales por vía oral a 5, 30, 120, 360 minutos; 4 animales por insuflación a 15, 60, 240, 480 minutos. Se extrajo suficiente sangre en cada punto temporal para el ensayo en plasma de ketoprofeno. Se centrifugaron las muestras de sangre, se recogió el plasma y a continuación se congeló a -20°C antes de la entrega al laboratorio contratado para su análisis. El ensayo usado en este estudio tiene un límite de detección inferior de 1,0 mg/ml.

Se administraron a las ratas dosis de ketoprofeno por administración oral o pulmonar para determinar si la vía pulmonar alteraría el tiempo requerido para alcanzar la concentración plasmática máxima. Los resultados (fig. 9-11) muestran que la vía de administración pulmonar conduce a una captación muy rápida y la  $C_{\text{máx}}$  tiene lugar a  $\leq 10$  minutos. Las ratas que recibieron dosis orales de ketoprofeno mostraron un comportamiento farmacocinético un tanto anómalo, siendo la biodisponibilidad relativa aproximadamente la mitad que la mostrada por las ratas a las que se administró la dosis por la vía pulmonar. Este resultado fue inesperado, ya que el ketoprofeno es biodisponible oralmente al 90% en el modelo humano. Esta anomalía para las ratas con dosis oral no invalida, sin embargo, el significado de la  $C_{\text{máx}}$  temprana que se observa en las ratas con dosis por la vía pulmonar.

25

Los resultados se proporcionan en la Tabla 8. Se calcularon las medias junto con los errores estándar y los valores p. Los resultados se presentan también de modo gráfico en las Fig. 9-11, donde la Fig. 9 muestra los dos conjuntos de datos, la Fig. 10 proporciona los resultados de la dosificación oral y la Fig. 11 muestra los resultados de la insuflación. Para la Fig. 9, los puntos con  $p < 0,05$  están marcados con "\*" y los puntos con  $p < 0,01$  están marcados con "\*\*". Para las Fig. 10 y 11, el ABC (área bajo la curva) se realizó por integración numérica de la curva con interpolación suave.

30

En t = 0, todas las ratas mostraron valores de ketoprofeno por debajo del límite de detección para el ensayo. De t = 5 min a t = 60 min, las ratas con insuflación tenían concentraciones plasmáticas de ketoprofeno significativamente superiores. En t = 120 min y t = 240 min, las concentraciones plasmáticas de ketoprofeno de los dos grupos fueron estadísticamente equivalentes. En t = 360 min y t = 480, las concentraciones plasmáticas de ketoprofeno para los dos grupos se acercaron al límite de detección para el ensayo.

35

La proporción entre las ABC para ratas con insuflación frente a dosis oral fue de aproximadamente 2. Las concentraciones plasmáticas para ketoprofeno en los primeros puntos temporales fueron también estadísticamente

40

significativas.

El valor  $C_{m\acute{a}x}$  para las ratas con insuflaci3n tuvo lugar claramente en < 15 min y  $C_{m\acute{a}x}$  para las ratas con dosis oral tuvo lugar entre 15-60 min. Debido al gran error estandar y a las concentraciones plasmaticas relativamente bajas para este grupo, no es posible determinar con precisi3n el tiempo requerido para  $C_{m\acute{a}x}$ .

La administraci3n pulmonar deriv3 en que el valor  $C_{m\acute{a}x}$  se produjera m3s r3pidamente (<15 min) que con la dosificaci3n oral (t = 15 a 60 min).

- 10 Las ratas con insuflaci3n mostraron mayor biodisponibilidad que las que recibieron dosis orales. Este resultado es inesperado ya que los estudios anteriores han mostrado que el ketoprofeno tiene una biodisponibilidad consistentemente alta (>90%) en los seres humanos cuando se administra por v3a oral, subcut3nea o rectal. Dado que el comportamiento farmacocin3tico del ketoprofeno suministrado oralmente es bien conocido, los resultados an3malos observados en este caso para el grupo de dosificaci3n oral no invalidan los resultados observados para el grupo de insuflaci3n.

**Tabla 8**

| Tiempo Min. | Dosificaci3n oral Media ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Grupo Dev. t3pica | Pulmonar Media ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Grupo de dosificaci3n Dev. t3pica | Valor P |
|-------------|--|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---------|
| 0           | 1,0  | N/D               | 1,0                                 | N/D                               |         |
| 5           | 1,7  | 0,75              | 9,6                                 | 1,27                              | 0,0003  |
| 15          | 2,1  | 0,76              | 7,6                                 | 0,28                              | 0,0000  |
| 30          | 1,9  | 0,12              | 5,5                                 | 0,76                              | 0,0012  |
| 60          | 2,0  | 0,13              | 4,5                                 | 0,60                              | 0,0002  |
| 120         | 1,7  | 0,31              | 2,4                                 | 0,44                              | 0,0929  |
| 240         | 1,4  | 0,05              | 1,8                                 | 0,63                              | 0,2554  |
| 360         | 1,0  | 0,06              | 1,8                                 | 0,35                              | 0,0224  |
| 480         | 1,0  | 0,00              | 1,3                                 | 0,47                              | 0,2174  |

Media de concentraciones plasmaticas de ketoprofeno en grupo oral y pulmonar

20

### Ejemplo 3

Se emplearon los siguientes procedimientos experimentales e instrumentaci3n para determinar las caracteristicas f3sicas de las part3culas que incluyen L-DOPA y son adecuadas para administraci3n pulmonar.

25

Se analiz3 el di3metro aerodin3mico usando API AeroDisperser y Aerosizer (TSI, Inc., St. Paul, MN) de acuerdo con procedimientos estandar (Alkermes SOP # MS-034-005). Se produjo un polvo de muestra y se dispers3 en el AeroDisperser y despu3s se aceler3 a trav3s de una boquilla en el Aerosizer. Se realiz3 una medida del tiempo de vuelo directo de cada part3cula en el Aerosizer, que depend3a de la inercia de la part3cula. A continuaci3n se tradujo la distribuci3n del tiempo de vuelo a una distribuci3n de tama3os de part3culas aerodin3micas basada en la masa usando un equilibrio de fuerzas basado en la ley de Stokes.

30

El di3metro geom3trico se determin3 una t3cnica de difracci3n por l3ser (Alkermes SOP# MS-021-005). El equipo consiste en un difract3metro HELOS y un dispersor RODOS (Sympatec, Inc., Princeton, NJ). El dispersor RODOS aplica una fuerza de cizalla a una muestra de part3culas, controlada por la presi3n del regulador del aire comprimido de entrada. Las part3culas dispersadas se desplazan a trav3s de un haz de l3ser donde el patr3n de luz difractada resultante producido es recogido por una serie de detectores. A continuaci3n se traduce el patr3n de difracci3n conjunto a una distribuci3n de tama3os de part3culas basada en el volumen usando el modelo de difracci3n de Fraunhofer, sobre la base de que las part3culas m3s peque3as difractan la luz en 3ngulos mayores.

40

Las propiedades aerodin3micas de los polvos dispersados a partir del dispositivo inhalador se evaluaron con un impactador de cascada MkII Anderson en 2 fases (Anderson Instruments, Inc., Smirna, GA). El instrumento consiste en dos fases que separan las part3culas del aerosol seg3n su di3metro aerodin3mico. En cada fase, la corriente de aerosol pasa a trav3s de un conjunto de boquillas e incide en la placa de impactaci3n correspondiente. Las part3culas que tienen una inercia suficientemente peque3a continuar3n en la corriente de aerosol hasta la fase siguiente, mientras que las part3culas restantes impactar3n contra la placa. En cada fase sucesiva, el aerosol pasa a trav3s de las boquillas a mayor velocidad y en la placa se recogen part3culas aerodin3micamente m3s peque3as. Despu3s de que el aerosol pasa a trav3s de la fase final, un filtro recoge las part3culas m3s peque3as que a3n

45

quedan.

Antes de determinar la carga de fármaco en un polvo seco, es preciso separar primero el fármaco de los excipientes del polvo. Se desarrolló una técnica de extracción para separar la L-Dopa del excipiente DPPC. Primero se disolvieron las partículas en cloroformo al 50%/metanol al 50%. Se peletizó la L-Dopa insoluble y se lavó con el mismo sistema de disolvente y a continuación se solubilizó en ácido clorhídrico 0,5 M. Se obtuvo un pico de DPPC con L-DOPA para determinar la recuperación. Se inyectaron las muestras en cromatografía líquida de alta presión y fase inversa (HPLC) para su análisis.

10 La separación se consiguió usando una columna Waters Symmetry C18 de 5-  $\mu\text{m}$  (150-mm x 4,6-mm DI). La columna se mantuvo a 30°C y se guardaron las muestras a 25°C. El volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{L}$ . La fase móvil se preparó a partir de metanol al 2,5% y solución acuosa al 97,5% (10,5 g/L de ácido cítrico, 20 mg/L de EDTA, 20 mg/L de sal sódica de ácido 1-octanosulfónico monohidratada). La fase móvil se agitó continuamente en una placa de agitación y se desgasificó y a través de un sistema de desgasificación en línea Waters. La L-Dopa se eluyó en condiciones isocráticas. La detección se realizó usando un detector de ultravioleta fijado a una longitud de onda de 254 nm.

Dado que la dosis oral individual media de L-Dopa está comprendida en general entre 100 y 150 mg, se realizaron experimentos para preparar las partículas adecuadas para inhalación que incluían cargas elevadas de L-Dopa. Se estudiaron formulaciones del 20% y el 40% de carga de L-Dopa. La carbidopa, un inhibidor de la descarboxilasa suministrado en conjunción con L-Dopa para prevenir la descarboxilación periférica, se incluyó también en una proporción de 4:1 peso/peso (p/p) en algunas de las formulaciones. La L-Dopa y la combinación de L-Dopa y carbidopa se pulverizaron con éxito con formulaciones de DPPC. La formulación óptima estaba formada por L-Dopa y/o carbidopa, citrato de sodio al 20% (p/p) y cloruro de calcio al 10% (p/p), y el resto de dipalmitoiloisfatidilcolina (DPPC).

En la Tabla 9 se resumen los detalles sobre las formulaciones y las propiedades físicas de las partículas obtenidas. El tamaño aerodinámico o el diámetro aerodinámico medio en masa (DAMM) se midieron con un Aerosizer, y el tamaño geométrico o el diámetro geométrico medio en volumen (DGMV) se determinó mediante difracción con láser, y la fracción de partículas finas (FPF) se midió usando un impactador en cascada de 2 fases Andersen. Tal como se muestra en la Fig. 12 y mediante las proporciones de DGMV en la Tabla 9, los polvos eran independientes de la velocidad de flujo. Se empleó micrografía electrónica de barrido para observar las partículas.

Tabla 9

| ID de carga (%)  | Rendimiento(%) | DGMV ( $\mu\text{m}$ ) a 2 bar | Proporción DGMV 0,5/4,0 bar | DAMM ( $\mu\text{m}$ ) | FPF(%) 5,6/3,4 |
|------------------|----------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------|----------------|
| L-Dopa/Carbidopa |                |                                |                             |                        |                |
| 20/0             | >40            | 9,9                            | NA                          | 2,7                    | ND             |
| 40/0             | >40            | 8,0                            | 1,2                         | 3,3                    | 42/17          |
| 20/5             | 42             | 10                             | 1,6                         | 3,1                    | 64/38          |
| 40/10            | >20            | 7,4                            | 1,6                         | 3,8                    | 40/14          |

35 La integridad de la L-Dopa pareció conservarse a través de la formulación y el proceso de secado por pulverización. La L-Dopa se extrajo de polvos de L-Dopa y se analizó por HPLC de fase inversa. En los polvos de L-Dopa no se detectaron impurezas (Fig. 13A); los primeros picos eluidos en torno a 1-2 minutos se deben a un disolvente como puede verse en la Fig. 13B que es una muestra de referencia que no contenía L-Dopa. La pureza de L-Dopa recuperada de las partículas fue del 99,8% y el 99,9% respectivamente para el 20% y el 40% de partículas cargadas.

Para determinar la carga (porcentaje en peso) de L-Dopa en el polvo, primero se separó la L-Dopa de los excipientes en la formulación y a continuación se analizó por HPLC de fase inversa. Los resultados de la recuperación de la L-Dopa a partir de los polvos y los cálculos finales de la carga se proporcionan en la Tabla 10. Las recuperaciones de extracción y la determinación de la carga fueron satisfactorias. El % en peso real determinado de L-Dopa en el polvo fue de aproximadamente el 87% de la carga teórica de la carga.

Tabla 10

| Formulación del polvo | Recuperación de la extracción % | Carga real (%) |
|-----------------------|---------------------------------|----------------|
| 20/0                  | 100 $\pm$ 4,5                   | 17,3 $\pm$ 02  |
| 40/0                  | 101 $\pm$ 2,8                   | 35,0 $\pm$ 5,4 |

**Ejemplo 4**

Las determinaciones de las concentraciones plasmáticas de L-Dopa se realizaron después de inyección IV, alimentación forzada por vía oral o insuflación en los pulmones. En general la carbidopa se administra para garantizar que se interrumpe completamente la actividad de la descarboxilasa periférica. En este ejemplo, los animales recibieron una inyección intraperitoneal (IP) del inhibidor periférico de la descarboxilasa carbidopa (200 mg/kg) 1 hora antes de la administración de L-Dopa. Con anestesia con ketamina, se dividió a los animales en 3 grupos. En el primer grupo de animales, la L-Dopa (2 mg) se puso en suspensión en suero salino que contenía metilcelulosa al 1% y ácido ascórbico al 1% y se suministró por alimentación forzada por vía oral. En el segundo grupo se usó una técnica de insuflación para administración pulmonar de partículas que incluían L-Dopa (20% de densidad de carga): se usó un laringoscopio para visualizar la epiglotis de la rata y se introdujo el dispositivo de insuflación de punta roma (dispositivo de suministro de polvo PennCentury Insufflation) en la vía respiratoria. Se usó un bolo de aire (3 cc), a partir de una jeringa asociada, para suministrar el polvo precargado desde la cámara del dispositivo a los pulmones del animal. Se suministró un total de 10 mg de polvo (2 mg de L-Dopa). En el tercer grupo se usó una cánula femoral colocada previamente para suministrar un bolo (2-3 segundos) de L-Dopa (2 mg). Se extrajeron muestras de sangre (200  $\mu$ L) de cada animal usando la cánula femoral en los siguientes puntos temporales: 0 (inmediatamente antes de la administración de L-Dopa), 2, 5, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos después de la administración de L-Dopa. Todas las muestras se procesaron para las determinaciones de L-Dopa usando HPLC.

En las Fig. 14A y 14B se muestran los resultados de un estudio farmacocinético que usó el procedimiento descrito. En la Fig. 14A se representan los resultados de una comparación de la administración pulmonar de L-Dopa con la administración oral. Después de la insuflación, las concentraciones plasmáticas máximas de L-Dopa se observaron en el primer punto temporal medido (2 minutos) y empezaron a disminuir en 15 minutos desde la administración aunque se mantuvieron elevadas, con respecto a la administración oral, durante hasta 120 minutos. En cambio, la administración oral de L-Dopa produjo un aumento más gradual en las concentraciones plasmáticas de L-Dopa, que alcanzaron un máximo 15-30 minutos después de la administración y después disminuyeron gradualmente en las 1-2 horas siguientes.

También se compararon las formas intravenosa, oral y pulmonar de administración. Los resultados se muestran en la Fig. 14B. Este panel representa los mismos datos presentados en la Fig. 14A con la adición del grupo de administración IV que permite comparaciones directas de las concentraciones plasmáticas de L-Dopa obtenidas según las tres vías de administración (pulmonar, oral e IV). Los datos se presentan en forma de la media  $\pm$  ECM  $\mu$ g de L-Dopa/ml de sangre. Las concentraciones plasmáticas de L-Dopa aumentaron rápidamente después de la administración intravenosa (IV). Los máximos valores de L-Dopa se observaron a los 2 minutos y disminuyeron después rápidamente.

La biodisponibilidad se estimó realizando cálculos del área bajo la curva (ABC). En el curso temporal completo del estudio (0-240 min), la biodisponibilidad relativa (comparada con IV) de la L-Dopa pulmonar fue de aproximadamente el 75% en comparación con el 33% para L-Dopa oral. La biodisponibilidad relativa de la L-Dopa pulmonar 15 min y 60 min después de la administración fue del 38% y el 62%, respectivamente, mientras que la de L-Dopa oral fue del 9% y el 24%, respectivamente.

**Ejemplo 5**

También se llevó a cabo la evaluación farmacodinámica de las ratas que recibieron L-Dopa. Las ratas recibieron inyecciones unilaterales de la neurotoxina 6-OHDA (específica para neuronas dopaminérgicas en el encéfalo) en el fascículo del prosencéfalo medial. A continuación se realizó un cribado de las ratas para garantizar una depleción de dopamina estriatal con éxito usando un paradigma de cambio inducido por apomorfina estándar. Empezando dos semanas después de la cirugía, se sometió a ensayo a los animales semanalmente durante tres semanas para analizar el comportamiento de la rotación inducida por la apomorfina. Para esta prueba, los animales recibieron una inyección IP de apomorfina (0,25 mg/kg para la primera prueba y 0,1 mg/kg para las dos pruebas siguientes) y se colocaron en un cubo cilíndrico de plexiglás. Se contó cada rotación de 360 grados durante 30 minutos y en la prueba conductual sólo se usaron los animales que mostraron >200 rotaciones/30 minutos (12/30 ratas con lesiones).

Se realizaron pruebas de las ratas con lesiones con varias tareas motoras después de la administración de L-Dopa. Los datos de los estudios (tarea de colocación, tarea de sujeción, acinesia) resaltaron aún más la ventaja de la

administración pulmonar con respecto a la oral.

En una prueba, se sometió a los animales que superaron la prueba de la apomorfina a una prueba usando una "tarea de colocación". Antes de cada día de prueba, los animales recibieron una inyección IP del inhibidor periférico de la descarboxilasa carbidopa (200 mg/kg). A continuación los animales recibieron L-Dopa oral (0, 20 o 30 mg/kg) o L-Dopa pulmonar (0, 0,5, 1,0 o 2,0 mg de L-Dopa) y se sometieron a prueba 15, 30 60 y 120 minutos más tarde. Durante la prueba con administración oral y pulmonar de L-Dopa, cada animal recibió toda la combinación de fármacos posible de una forma aleatorizada.

10 La farmacodinámica de la "tarea de colocación" requería que los animales realizaran un movimiento dirigido de las patas delanteras como respuesta a estímulos sensoriales. Se dispuso a las ratas de manera que sus extremidades colgaran sin soporte. A continuación se elevó el lateral de una mesa de manera que sus cuerpos quedaran en paralelo al borde de la mesa. En cada rata se realizaron 10 ensayos consecutivos con cada pata delantera y se anotó el número total de veces que la rata colocó la pata delantera en la parte superior de la mesa.

15 Los resultados de las pruebas de la "tarea de colocación" se muestran en las Fig. 15A y 15B. En el valor basal (t = 0; inmediatamente antes de la administración de L-Dopa), los animales realizaron esta tarea casi perfectamente con la extremidad no afectada, lo que supuso más de 9/10 respuestas correctas. En cambio, los animales se vieron afectados claramente en su capacidad para realizar la misma tarea con la extremidad afectada, para lograr  
20 aproximadamente 1 respuesta correcta en los 10 ensayos.

La L-Dopa oral (Fig. 15A) produjo una mejora relacionada con la dosis en el rendimiento de la extremidad afectada. Para las dosis máximas probadas (30 mg/kg), el rendimiento mejoró con respecto al control con suero salino, en 30 minutos y alcanzó un máximo entre 1-2 horas después de la administración del fármaco. La dosis más baja (20  
25 mg/kg) también mejoró el rendimiento ligeramente con efectos máximos a los 60 minutos y un rendimiento estable posteriormente. No se observaron cambios después de la administración del control con suero salino.

A diferencia de la administración oral, el rendimiento en la "tarea de colocación" mejoró rápidamente después de la administración pulmonar de L-Dopa, tal como se aprecia en la Fig. 15B. Para las dosis más altas probadas se  
30 produjeron mejoras significativas en 10 minutos, con los beneficios máximos observados en 15-30 minutos (a diferencia de 1-2 horas con la administración oral). Estos efectos estuvieron relacionados con la dosis, con mejoras importantes en dosis de apenas 0,5 mg de L-Dopa. En comparación con la recuperación mostrada con el suministro oral, las mejoras en la conducta se observaron con dosis acusadamente más bajas usando la vía pulmonar. Por ejemplo, la magnitud de la recuperación con 30 mg/kg de L-Dopa suministrada oralmente fue comparable a la  
35 recuperación observada con 1 mg de L-Dopa suministrada por la vía pulmonar (obsérvese que 1 mg de L-Dopa pulmonar es equivalente a aproximadamente 3 mg/kg, dado que el peso corporal de los animales fue de aproximadamente 300 g). En consecuencia, cuando se normalizaron las dosis de L-Dopa por peso corporal, esto representó una diferencia de casi 10 veces en el fármaco requerido para producir una eficacia equivalente. Finalmente, la persistencia de las mejoras conductuales fue comparable usando las dos vías de suministro.

40 En las Fig. 16A y 16B se muestran los resultados de una prueba de sujeción. Esta prueba se realizó usando los mismos animales y al mismo tiempo que la prueba de la "tarea de colocación" descrita anteriormente. Se colocaron las ratas en una superficie lisa de acero inoxidable y se les empujó con suavidad lateralmente 90 cm a aproximadamente 20 cm/segundo. Se anotó el número de pasos que dio la rata con la pata delantera en el lado en  
45 que se estaba moviendo a la rata. Cada ensayo incluyó el movimiento de la rata 2 veces en cada dirección.

Los animales mostraron un deterioro profundo en su capacidad para realizar esta tarea con la extremidad afectada, para producir aproximadamente 3 respuestas en comparación con las aproximadamente 7 con la extremidad no afectada, tal como se aprecia en la Fig. 16A. Una vez más, la administración oral mejoró el rendimiento en esta tarea  
50 de una forma relacionada con la dosis. La administración de 30 mg/kg (aproximadamente 10 mg de L-Dopa) mejoró el rendimiento en 30 minutos. Los efectos máximos se observaron en 60 minutos y se mantuvieron estables con posterioridad. Una dosis menor de L-Dopa oral (20 mg/kg o aproximadamente 7 mg de L-Dopa) mejoró ligeramente el rendimiento. De nuevo, la administración del control con suero salino no influyó en el rendimiento.

55 A diferencia de la administración oral, el rendimiento en esta tarea mejoró rápidamente después de la administración pulmonar de L-Dopa, tal como se muestra en la Fig. 16B. Se observaron mejoras significativas en 10 minutos, y los beneficios máximos se observaron en 15-30 minutos (a diferencia de 30-60 minutos con administración oral). Estos efectos estuvieron relacionados con la dosis, con mejoras moderadas pero estadísticamente significativas observadas con apenas 0,5 mg (equivalente a aproximadamente 1,5 mg/kg). En cuanto a las demás pruebas

funcionales, la mejora conductual alcanzada después de la L-Dopa pulmonar se produjo en dosis bastante inferiores a las requeridas para alcanzar una magnitud similar del efecto después del suministro oral. Finalmente, la persistencia de las mejoras conductuales fue comparable usando las dos vías de suministro.

5 Se llevó a cabo también un estudio farmacodinámico de acinesia funcional. Los resultados se muestran en las Fig. 17A y 17B. Esta prueba se llevó a cabo usando los mismos animales y al mismo tiempo que las dos pruebas precedentes. En esta tarea, se sostuvo al animal de manera que quedaba de pie sobre una pata delantera y se le permitió que se moviera a su antojo. Se anotó el número de pasos dados con la pata delantera con la rata de pie durante un ensayo de 30 segundos para cada pata delantera.

10

Al igual que se observó con las pruebas de colocación y sujeción, los animales mostraron un deterioro profundo en su capacidad para realizar la prueba de acinesia con la extremidad afectada. Mientras los animales dieron aproximadamente 17 pasos con la extremidad normal, dieron la mitad de esta cifra con la extremidad afectada (intervalo = 0-10 pasos). La administración oral (Fig. 17A) mejoró el rendimiento en esta tarea de una forma relacionada con la dosis. La administración de 30 mg/kg (aproximadamente 10 mg de L-Dopa) mejoró el rendimiento en 30 minutos y los efectos máximos se observaron en 60 minutos. Una dosis menor de L-Dopa oral (20 mg/kg o aproximadamente 6,8 mg de L-Dopa) produjo el mismo patrón de recuperación aunque la magnitud absoluta de la mejora fue ligeramente menor que la observada con la dosis más alta de L-Dopa. El rendimiento se mantuvo estable entre 60 y 120 minutos después de la administración de las dos dosis. La administración del control con suero salino no influyó en el rendimiento.

20

A diferencia de la administración oral, el rendimiento en esta tarea mejoró rápidamente después de la administración pulmonar de L-Dopa, tal como se representa en la Fig. 17B. Se observaron mejoras significativas en 10 minutos, con los beneficios máximos observados en 15-30 minutos (a diferencia de los 60 minutos con administración oral). Estos efectos estuvieron relacionados con la dosis y mostraron mejoras estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con apenas 1,0 mg. En lo que se refiere a las otras pruebas funcionales, la mejora conductual alcanzada después de la L-Dopa pulmonar tuvo lugar en dosis bastante inferiores a las requeridas para conseguir una magnitud similar del efecto después del suministro oral. Finalmente, la persistencia de las mejoras conductuales fue comparable usando las dos vías de suministro.

30

Los animales se sometieron a ensayo también en una prueba de rotación de farmacodinámica estándar conocida por su medición sensible y fiable de la actividad de la dopamina en el encéfalo. Para esta prueba, los animales recibieron L-Dopa oral (30 mg/kg o aproximadamente 10 mg en total) o L-Dopa pulmonar (2 mg en total). Estas dosis se eligieron para la prueba debido a que representan las dosis de L-Dopa mostradas para producir una eficacia máxima en las pruebas funcionales previas. Después de la dosis, se colocó a los animales en un cubo cilíndrico de plexiglás. Se contó cada rotación de 360 grados y se agrupó en grupos de 5 minutos en el curso de un periodo de prueba de 120 minutos. También se sometió a ensayo la conducta de rotación de los animales con y sin pretratamiento con carbidopa.

35

40 Todos los animales usados en estos estudios recibieron inyecciones unilaterales de 6-OHDA. Dado que las depleciones de dopamina son unilaterales, el lado no inyectado se mantuvo intacto y capaz todavía de responder a los cambios en la actividad de la dopamina. Cuando en estos animales se inyectó un agonista de la dopamina (es decir, L-Dopa) la actividad de la dopamina en el encéfalo se estimuló preferentemente en el lado intacto. A consecuencia de ello se produjo una estimulación asimétrica de la actividad motora que se manifestó como una conducta de giro o rotacional. El inicio y el número de rotaciones proporcionó una medida del curso temporal así como de la magnitud del aumento de la actividad de la dopamina.

45

Los resultados se muestran en la Fig. 18. La administración oral de L-Dopa produjo una acusada conducta de rotación en sentido horario que fue moderada durante los primeros 10-15 minutos después de la administración de L-Dopa (<5 rotaciones/animal). Durante los 20 minutos siguientes, el número de rotaciones aumentó de forma acusada, donde los valores máximos alcanzados aproximadamente 30 minutos después de L-Dopa indicaban el aumento de la actividad de la dopamina en el estriado intacto del encéfalo. Durante los 90 minutos siguientes, el número de las rotaciones disminuyó gradualmente, pero esta disminución, con respecto a los valores máximos, no alcanzó significación estadística ( $p > 0,05$ ).

55

A diferencia de la administración oral, la administración pulmonar de L-Dopa aumentó rápidamente la conducta de rotación indicando una conversión mucho más rápida de L-Dopa en dopamina en el estriado intacto. Las rotaciones en este grupo fueron superiores a 3 veces las producidas por suministro oral en los primeros 10-15 minutos. Los números de rotaciones aumentaron ligeramente, alcanzaron un máximo a los 25-30 minutos y se mantuvieron

relativamente estables con posterioridad. Aunque se apreció una tendencia hacia un aumento de las rotaciones, con respecto al suministro oral, 120 minutos después de la administración de la dosis, no alcanzó significación estadística ( $p > 0,05$ ). La conducta de rotación se eliminó virtualmente en los animales que no recibieron pretratamiento con carbidopa (datos no mostrados).

5

### Ejemplo de referencia 3

Se evaluaron los efectos farmacodinámicos de un fármaco de tipo benzodiazepina pulmonar con respecto al oral, el alprazolam, usando una prueba preclínica estándar de acción ansiolítica. En esta prueba, se administró a las ratas el convulsivo químico pentilentetrazol (PZT), que según se sabe produce convulsiones bien caracterizadas en roedores. La prueba se seleccionó basándose en su sensibilidad a una amplia variedad de benzodiazepinas y en el hecho de que, según se cree, la potencia relativa de las benzodiazepinas en el bloqueo de convulsiones inducidas por el PZT es similar a la magnitud de sus efectos contra la ansiedad en seres humanos. La capacidad del alprazolam para bloquear las convulsiones inducidas por PZT se usó para medir los efectos farmacodinámicos del alprazolam.

Las determinaciones de la actividad antiansiolítica del alprazolam se realizaron después de alimentación forzada por vía oral o insuflación directamente en los pulmones de las ratas. El alprazolam (Sigma, St. Louis, MO) se administró por medio de partículas ligeras aerodinámicamente que incluían el 10% de alprazolam, el 20% de citrato de sodio, el 10% de cloruro de calcio y el 60% de DPPC. Para el suministro oral, se puso en suspensión el alprazolam en jarabe de maíz ligero y se administró por alimentación forzada. Para la administración pulmonar se usó una técnica de insuflación. Se anestesió brevemente a los animales con isoflurano (1-2%) y se usó un laringoscopio para visualizar la epiglotis y se introdujo el dispositivo de insuflación de punta roma (dispositivo de suministro de polvo PennCentury Insufflation) en la vía respiratoria. Se usó un bolo de aire (3 cc), de una jeringa acoplada, para suministrar el polvo precargado de la cámara del dispositivo en los pulmones de los animales. Las dosis para administración pulmonar fueron de 0 (partículas de la muestra de referencia que incluían el 20% de citrato de sodio, el 10% de cloruro de calcio y el 70% de DPPC), 0,088, 0,175 ó 0,35 mg de alprazolam total, y las dosis para suministro oral fueron de 0, 0,088, 0,175, 0,35, 0,70, 1,75 ó 3,50 mg de alprazolam total. Estas dosis se eligieron para comprender el intervalo de dosis eficaces e ineficaces. En consecuencia, cualquier beneficio potencial de la administración pulmonar podría compararse directamente con la curva de respuesta de la dosis oral para el alprazolam.

Para administración oral y pulmonar, el alprazolam se administró 10 ó 30 minutos antes del PZT, obtenido de Sigma, St. Louis, MO, (60 mg/kg suministrados i.p). Para controlar las posibles interacciones entre el alprazolam y el isoflurano, todos los animales que recibieron alprazolam oral recibieron también isoflurano inmediatamente después de la dosis tal como se describe anteriormente. Para todos los animales, se registró el número de convulsiones y el tiempo hasta el inicio de las convulsiones y la duración de las convulsiones durante 45 minutos después de la administración de PZT. A cualquier animal que no mostrara actividad convulsiva se le asignó el tiempo máximo posible para el inicio de las convulsiones (45 minutos) y el tiempo mínimo posible para la duración de las convulsiones (0 segundos).

La administración pulmonar del alprazolam produjo una disminución rápida y robusta de la incidencia de convulsiones, tal como se muestra en la Tabla 11. Mientras el 80% de los animales de control (partículas de la muestra de referencia) mostraron convulsiones, el alprazolam pulmonar produjo una disminución robusta y relacionada con la dosis en el número de animales que manifestaban convulsiones cuando se administró 10 minutos antes del PZT. Con dosis de alprazolam de apenas 0,088 mg, sólo el 33% de los animales tuvieron convulsiones. Con una ampliación posterior de la dosis a 0,35 mg de alprazolam, la actividad convulsiva se eliminó virtualmente donde sólo el 13% de los animales mostraron convulsiones.

A diferencia de los efectos rápidos y robustos del alprazolam pulmonar, los efectos del suministro oral fueron retardados (Tabla 11). Cuando se suministró 30 minutos antes del PZT, el alprazolam oral produjo una disminución relacionada con la dosis en las convulsiones. Mientras sólo el 27% de los animales tuvo convulsiones después de las dosis más altas ensayadas (0,35 mg), esta misma dosis de alprazolam fue ineficaz cuando se administró sólo 10 minutos antes del PZT (es decir, una dosis que tuvo una eficacia máxima cuando se administró por la vía pulmonar). Estos estudios demostraron también que cuando se suministró 10 minutos antes del PZT, se necesitaba aproximadamente 10 veces la dosis oral de alprazolam para conseguir una supresión de las convulsiones comparable a la administración pulmonar. Mientras sólo el 13% de los animales que recibieron 0,35 mg de partículas que incluían alprazolam tuvo convulsiones, la dosis oral requerida para producir este efecto fue de 3,50 mg.

Los beneficios de la administración pulmonar con respecto a la administración oral también fueron evidentes cuando

se analizó el tiempo hasta el inicio de las convulsiones (Tabla 11 y Fig. 19A). Los efectos del alprazolam oral se retrasaron de nuevo con respecto a la administración pulmonar. Tal como se muestra anteriormente, el suministro oral fue marcadamente menos eficaz cuando se suministró alprazolam 10 minutos en comparación con 30 minutos antes del PZT. En cambio, todas las dosis de alprazolam pulmonar produjeron efectos rápidos y robustos cuando se suministraron sólo 10 minutos antes del PZT. No sólo los efectos de la administración pulmonar fueron más rápidos, sino que las dosis pulmonares eficaces fueron acusadamente menores que la dosis oral eficaz. Por ejemplo, cuando se administraron dosis comparables de alprazolam (0,35 mg) por las vías oral y pulmonar 10 minutos antes del PZT, la administración pulmonar produjo tiempos hasta el inicio de las convulsiones que fueron casi máximos (>42 minutos). La administración oral de la misma dosis de alprazolam no incrementó, sin embargo, la latencia hasta el inicio de las convulsiones con respecto a los animales de control. De hecho, el alprazolam oral no incrementó significativamente el tiempo hasta el inicio de las convulsiones hasta que se aumentó la dosis a 1,75 mg y los efectos comparables a los obtenidos con administración pulmonar necesitaron una dosis oral que fue 10 veces superior que la dosis pulmonar (0,35 frente a 3,50 mg).

Se observaron también resultados similares cuando se cuantificaron los efectos de la vía de administración del alprazolam en la duración de las convulsiones (Tabla 11 y Fig. 19B). La administración pulmonar ejercía un efecto más rápido y requería además sustancialmente menos fármaco total que el alprazolam oral. De nuevo, el suministro oral fue marcadamente menos eficaz para reducir la duración de las convulsiones cuando el alprazolam se suministró 10 minutos con respecto a 30 minutos antes del PZT. Por otra parte, la dosis oral eficaz máxima, suministrada 10 minutos antes del PZT, fue de 3,50 mg de alprazolam. En cambio, la administración pulmonar de sólo 0,088 mg de alprazolam (casi 40 veces menos que la dosis oral eficaz máxima) produjo una disminución comparable en la duración de las convulsiones.

Un análisis de la evolución temporal reveló que mientras las ventajas relativas del alprazolam pulmonar con respecto al oral disminuían a medida que aumentaba el intervalo entre alprazolam y PZT, la administración pulmonar mantuvo la misma eficacia que la administración oral. Mientras el alprazolam oral se hizo cada vez más eficaz a medida que aumentaba el intervalo entre el tratamiento con alprazolam y PZT de 10 a 30 minutos, los efectos de la administración pulmonar se mantuvieron relativamente constantes durante el mismo periodo de tiempo. De hecho, no se observaron diferencias en la actividad convulsiva cuando se suministraron dosis oral y pulmonar comparables de alprazolam 30 minutos antes del PZT. Si bien se apreció una tendencia hacia menos convulsiones con la administración pulmonar, estas diferencias fueron moderadas y no alcanzaron significación estadística (Tabla 11B;  $p > 0,05$ ). Por otra parte, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre cualquier dosis oral y pulmonar cuando se comparó el tiempo hasta el inicio de las convulsiones o la duración de estas convulsiones (Fig. 20A y 11B).

Las Fig. 21A y 21B muestran además que los efectos del alprazolam pulmonar se mantuvieron relativamente constantes a medida que aumentaba el tiempo entre el tratamiento de alprazolam y PZT. También es importante saber que un análisis detallado de los resultados indicó que el alprazolam era moderadamente más eficaz cuando el intervalo entre el alprazolam y el PZT se mantenía al mínimo. Para cada dosis sometida a ensayo, menos animales tenían convulsiones cuando el alprazolam se suministraba 10 minutos que cuando se suministraba 30 minutos antes del PZT (aunque este efecto no alcanzó significación estadística,  $p > 0,05$ ). La ventaja de mantener una estrecha relación temporal entre el alprazolam y el PZT empezó también a descubrirse cuando se analizó el tiempo hasta el inicio de las convulsiones y la duración de la actividad convulsiva. Aunque no se observaron diferencias en las dosis más altas de alprazolam (0,175 y 0,35 mg), los animales que recibieron las dosis mínimas de alprazolam (0,088 mg) 10 minutos antes del PZT mostraron tiempos significativamente mayores para el inicio de las convulsiones y duraciones de las convulsiones significativamente menores que los animales tratados 30 minutos antes del PZT (Fig. 3).

Tabla 11

| Efectos del alprazolam en convulsiones inducidas por PZT |                           |       |   |        |   |         |
|--|---------------------------|-------|---|--------|---|---------|
| Vía  | Animales con convulsiones |       | Minutos hasta el inicio de las convulsiones |        | Duración de las convulsiones (segundos) |         |
| Pulmonar   |                           |       |   |        |   |         |
| 10 minutos antes del PZT                                 |                           |       |   |        |   |         |
| Muestra de referencia                                    | 12/15                     | (80%) | 11,72                                       | (4,63) | 83,0                                    | (26,04) |
| 0,088 mg   | 5/15                      | (33%) | 36,71                                       | (3,93) | 7,0                                     | (3,53)  |
| 0,175 mg   | 3/15                      | (20%) | 38,61                                       | (3,81) | 8,0                                     | (4,3)   |
| 0,35 mg  | 2/15                      | (13%) | 42,28                                       | (1,98) | 4,0                                     | (2,60)  |

ES 2 621 549 T3

|                          |       |             |        |        |        |          |
|--------------------------|-------|-------------|--------|--------|--------|----------|
| 30 minutos antes del PZT |       |             |        |        |        |          |
| Muestra de referencia    | 15/15 | (100%) 9,58 | (2,25) |        | 120,13 | (49,33)  |
| 0,088 mg                 | 9/15  | (60%)       | 18,47  | (5,50) | 82,67  | (33,0)   |
| 0,175 mg                 | 5/15  | (33%)       | 34,05  | (4,20) | 16,07  | (6,89)   |
| 0,35 mg                  | 2/15  | (13%)       | 41,98  | (2,18) | 2,69   | (1,90)   |
| <u>Oral</u>              |       |             |        |        |        |          |
| 10 minutos antes del PZT |       |             |        |        |        |          |
| 0,35 mg                  | 13/15 | (87%)       | 11,49  | (3,80) | 88,0   | (49,22)  |
| 0,70 mg                  | 13/15 | (87%)       | 9,24   | (3,93) | 62,07  | (14,588) |
| 1,75 mg                  | 7/15  | (47%)       | 29,03  | (4,41) | 14,47  | (4,04)   |
| 3,50 mg                  | 2/14  | (14%)       | 43,37  | (1,52) | 5,40   | (3,47)   |
| 30 minutos antes del PZT |       |             |        |        |        |          |
| 0 mg                     | 13/15 | (87%)       | 8,75   | (3,95) | 96,0   | (26,08)  |
| 0,088 mg                 | 11/15 | (73%)       | 18,38  | (4,55) | 46,0   | (14,48)  |
| 0,175 mg                 | 7/15  | (47%)       | 33,10  | (4,07) | 15,0   | (6,75)   |
| 0,35 mg                  | 4/15  | (27%)       | 37,58  | (3,50) | 19,0   | (12,36)  |

Nota: todos los datos presentados para el tiempo hasta el inicio de las convulsiones y duración de las convulsiones se presentan en forma de media  $\pm$  ECM

**REIVINDICACIONES**

1.            Uso de levodopa en la fabricación de un medicamento para administración pulmonar con el fin de proporcionar una terapia de rescate en un paciente con enfermedad de Parkinson, donde la levodopa se incorpora en partículas que tienen una densidad aparente inferior a aproximadamente  $0,4 \text{ g/cm}^3$  y un diámetro aerodinámico medio en masa inferior a aproximadamente 5 micrómetros.
2.            El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde las partículas tienen una densidad aparente inferior a aproximadamente  $0,1 \text{ g/cm}^3$  y tienen un diámetro aerodinámico medio en masa inferior a aproximadamente 3 micrómetros.
3.            El uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el paciente está en distrés agudo.
4.            El uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde la levodopa se suministra al lugar de acción en menos de 15 minutos.
5.            El uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde la levodopa se suministra al sistema nervioso central en un lapso de 10 minutos desde el suministro.

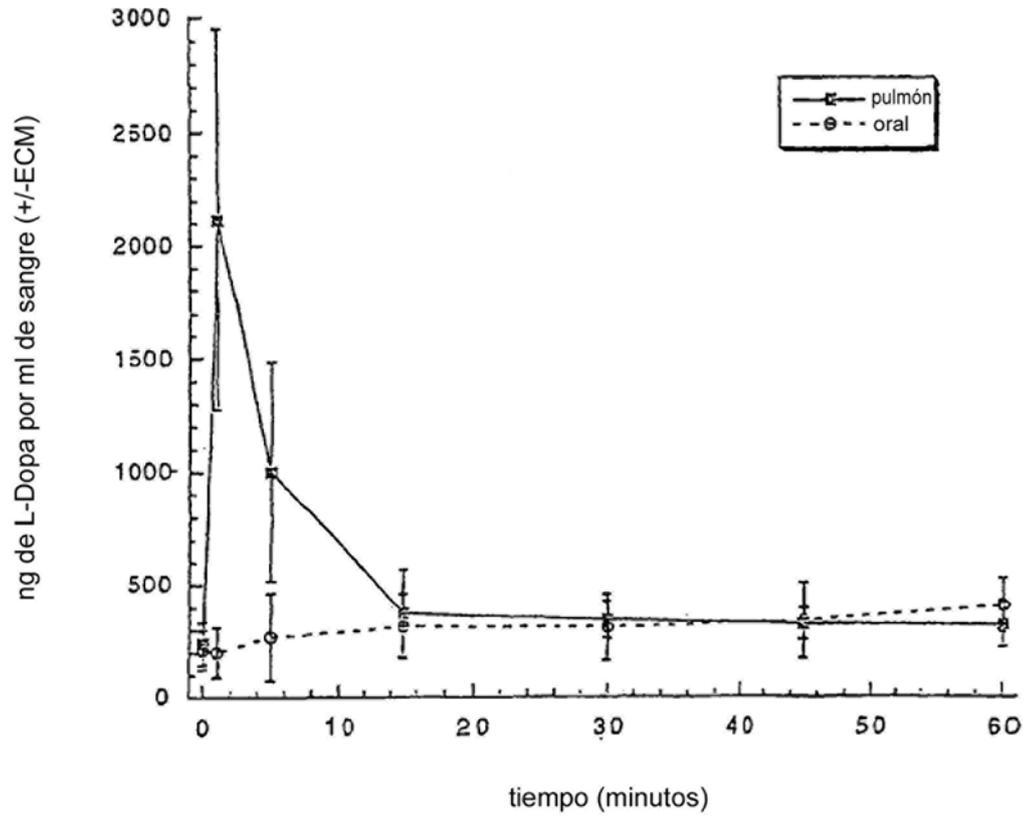


FIG. 1A

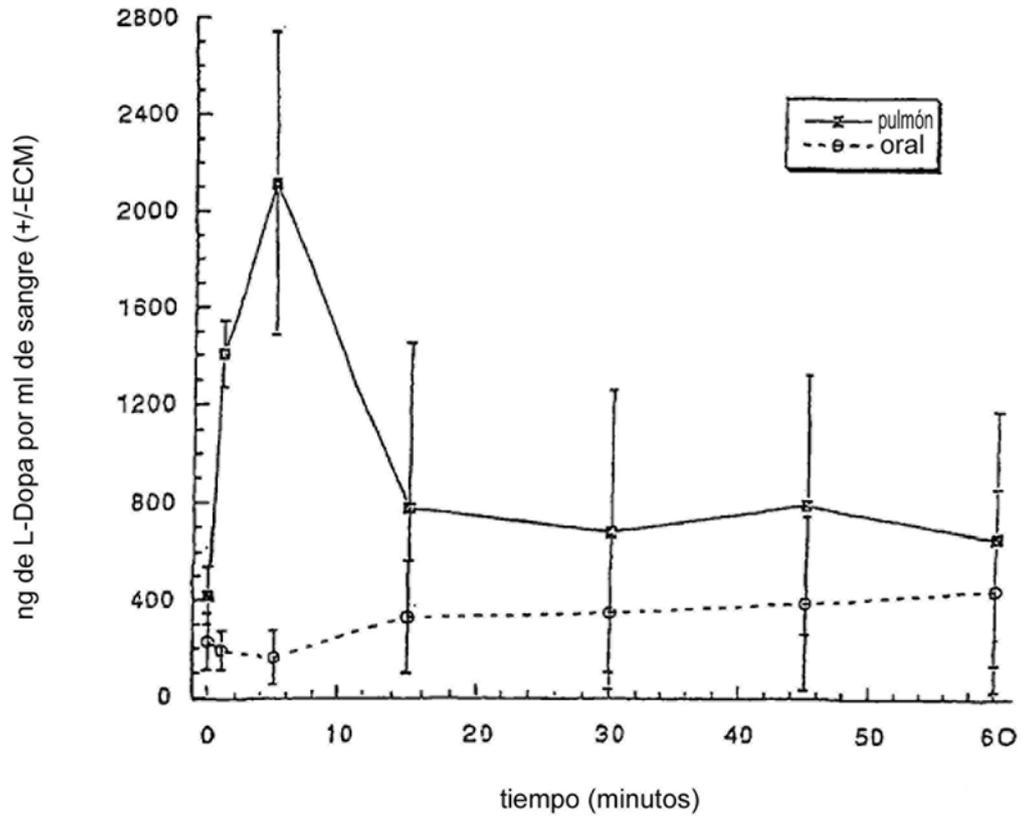


FIG 1R

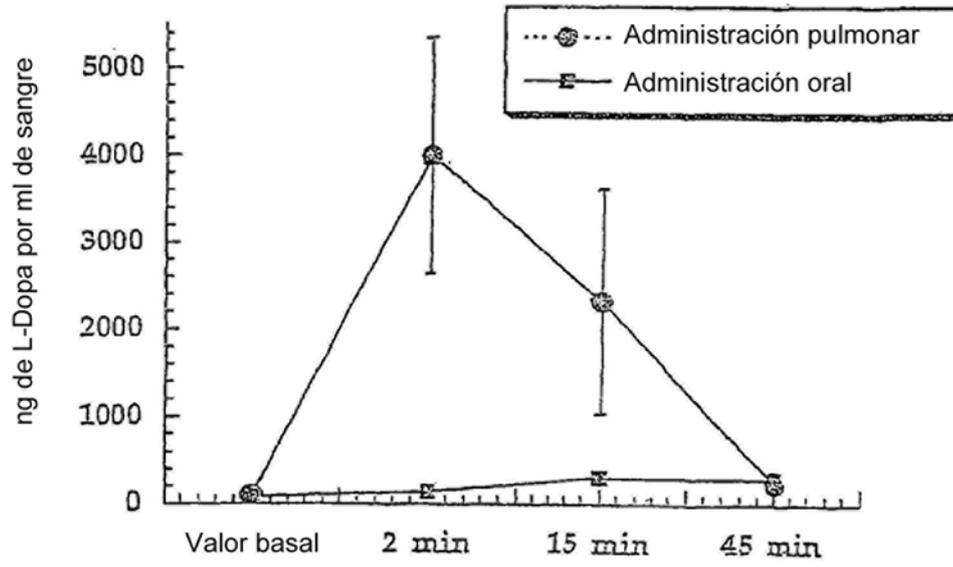


FIG. 2A

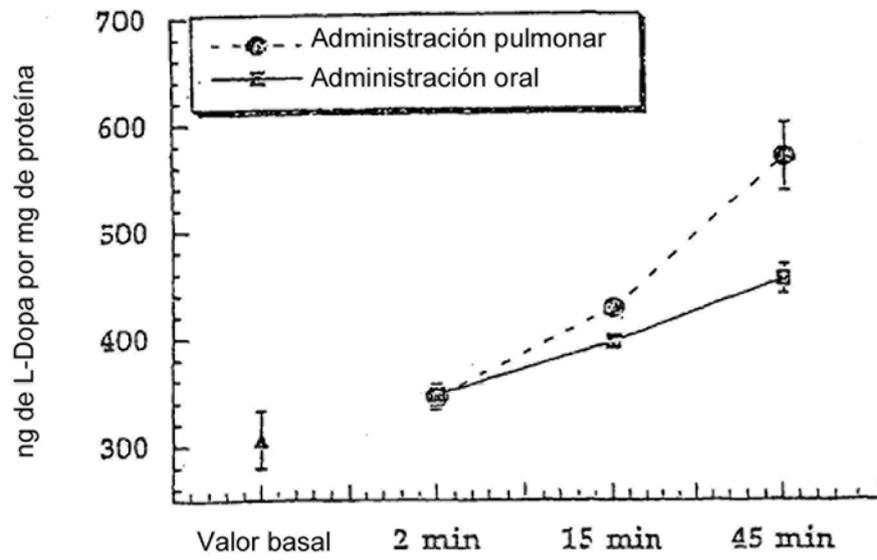


FIG. 2B

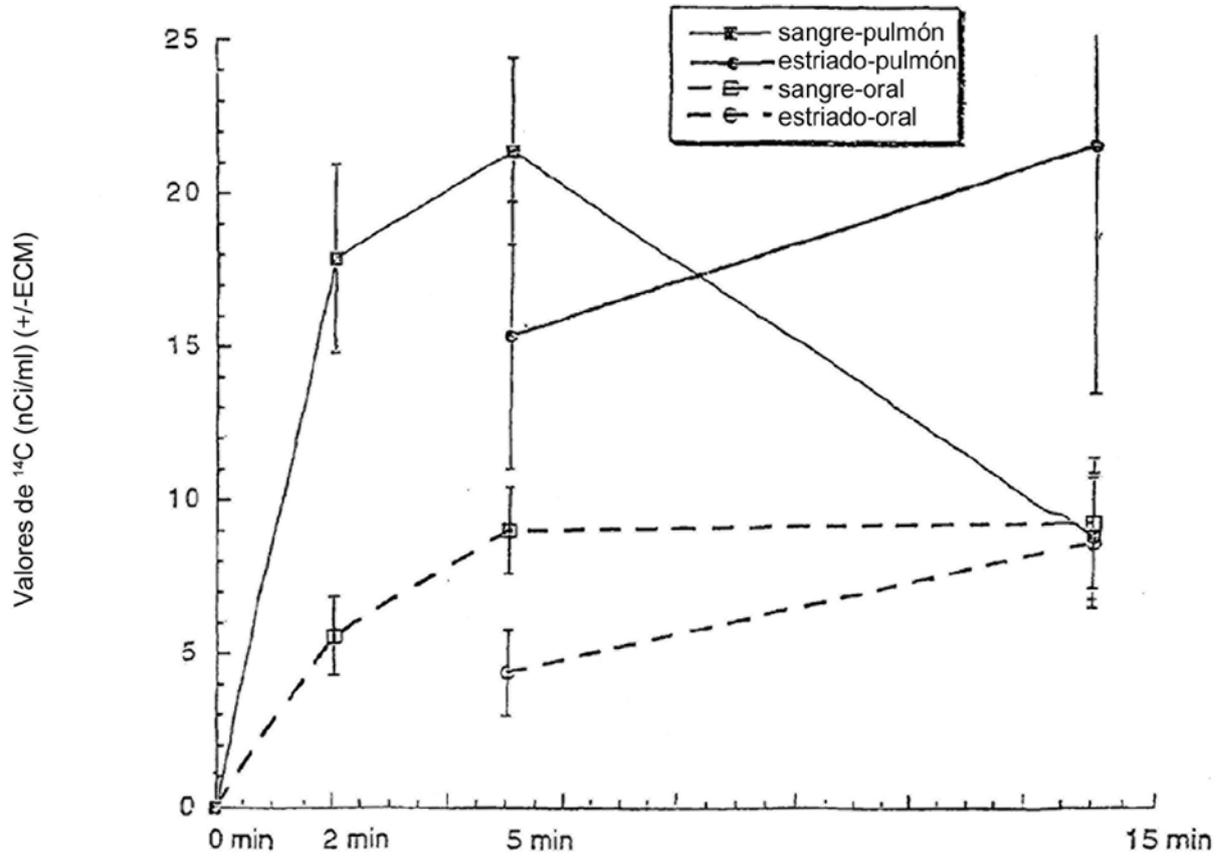


FIG. 3

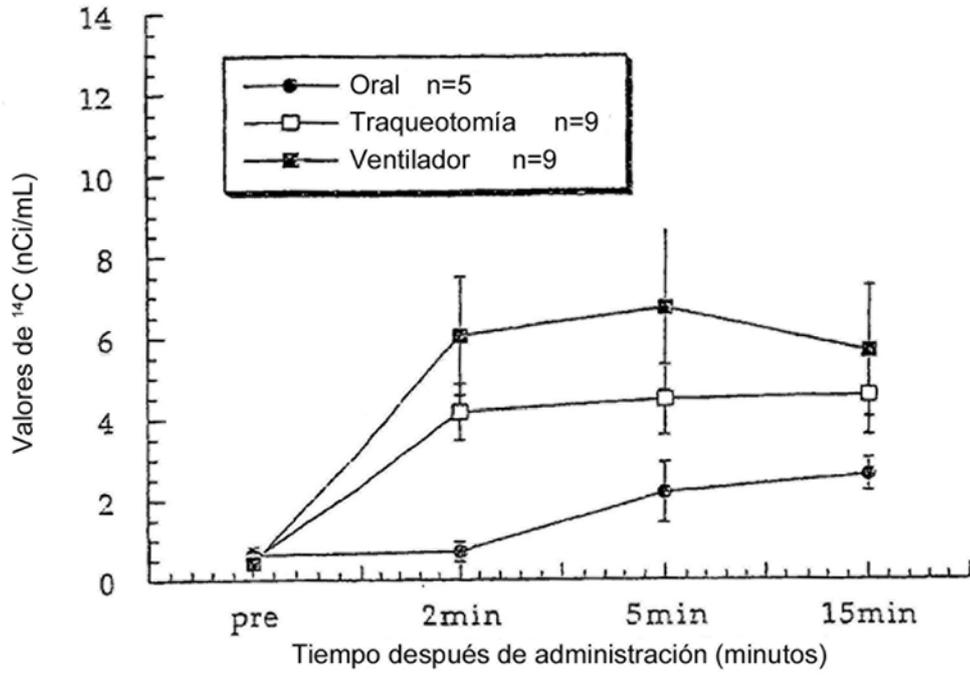


FIG. 4

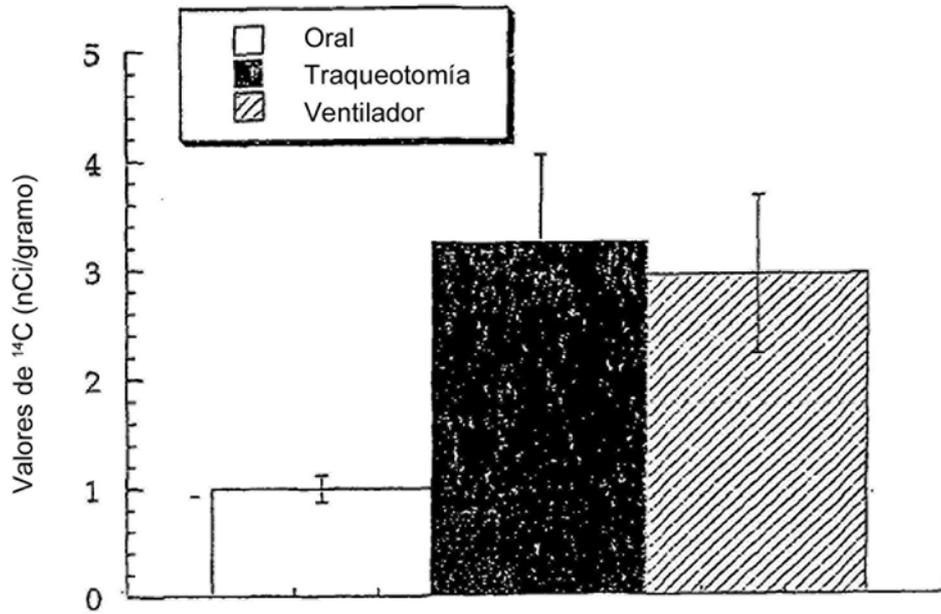


FIG. 5

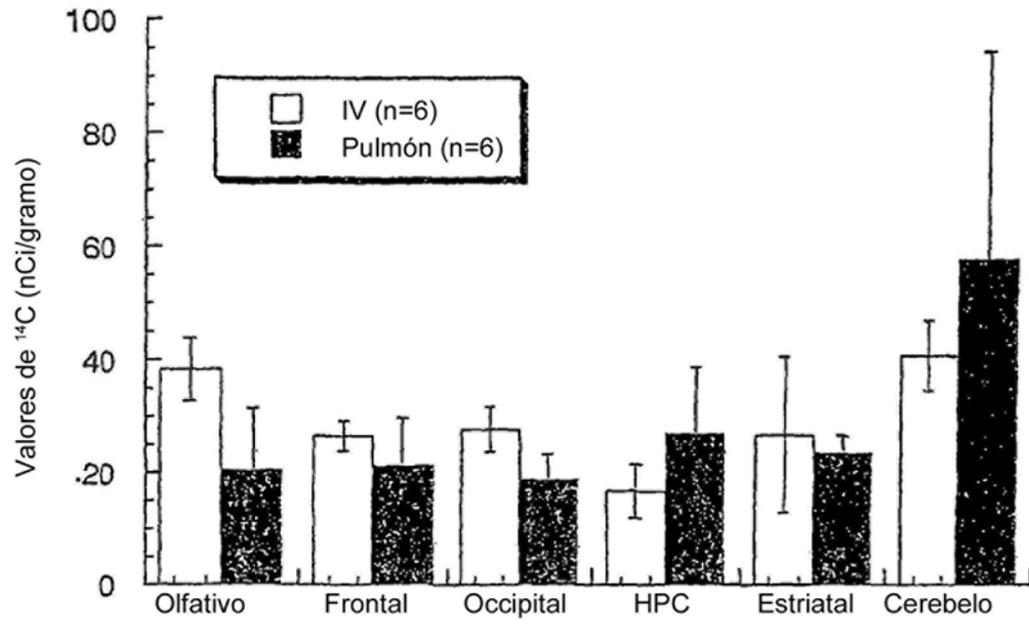


FIG. 6A

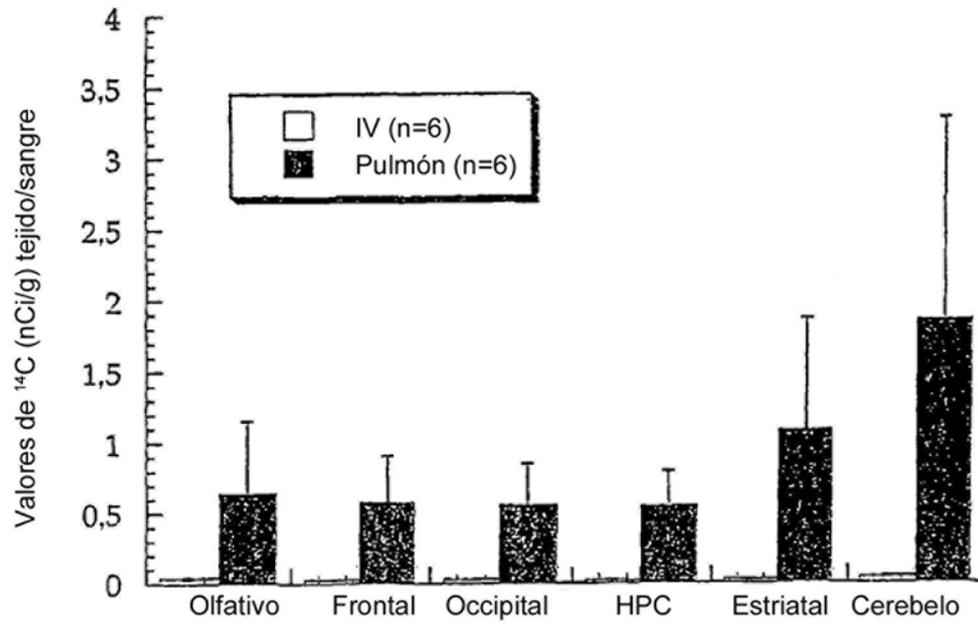


FIG. 6B

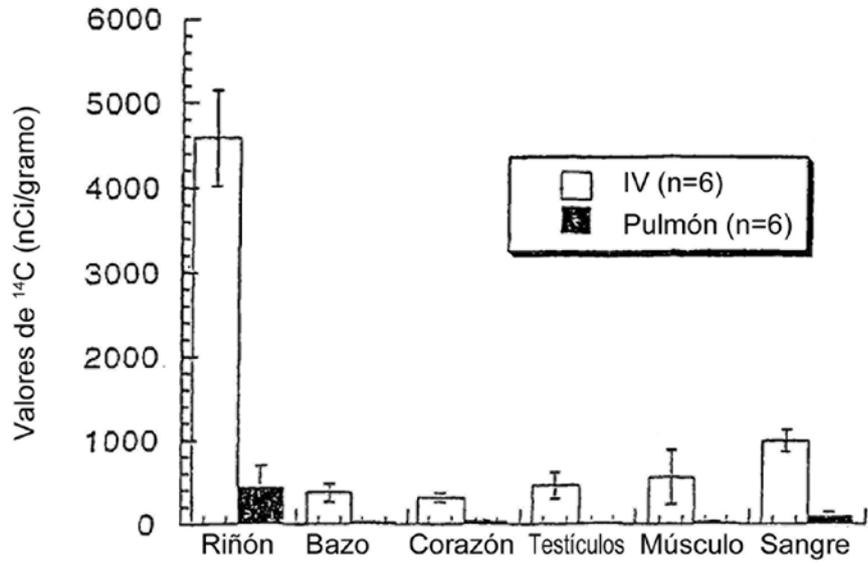


FIG. 7A

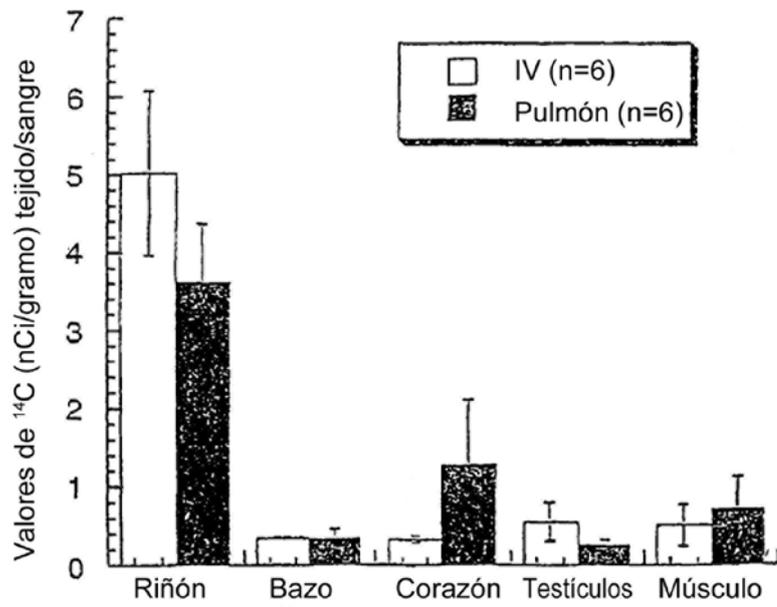


FIG. 7B

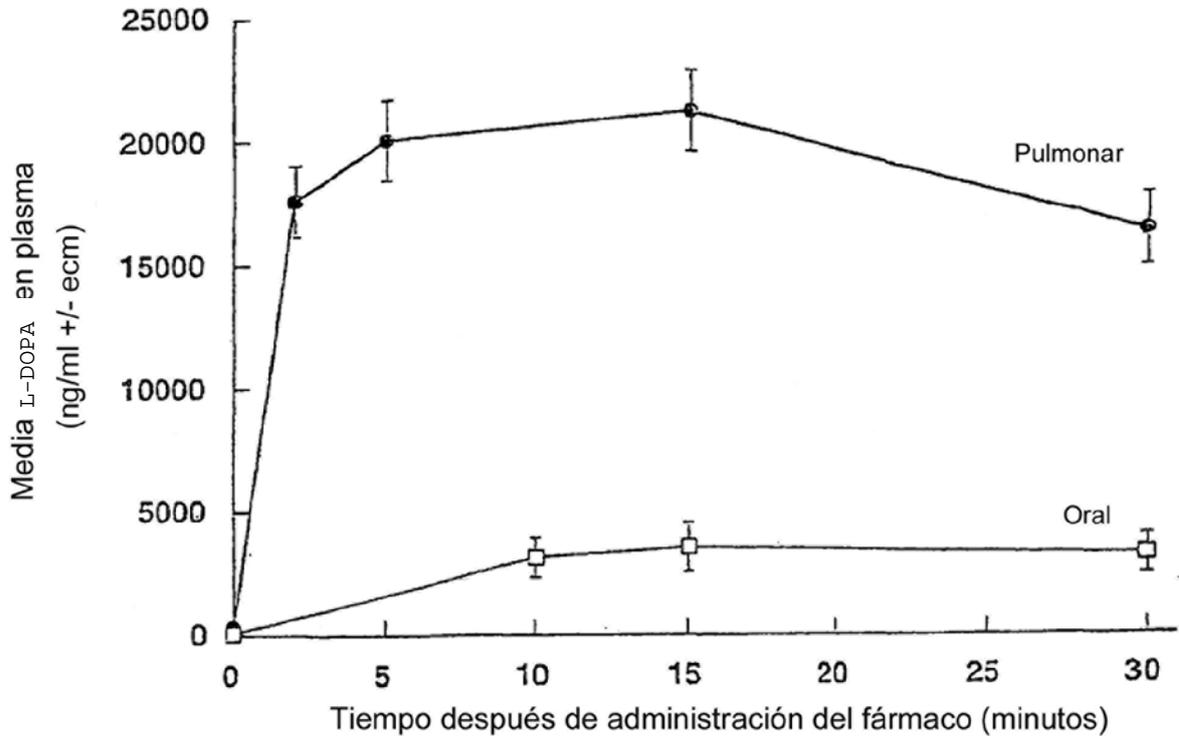


FIG. 8

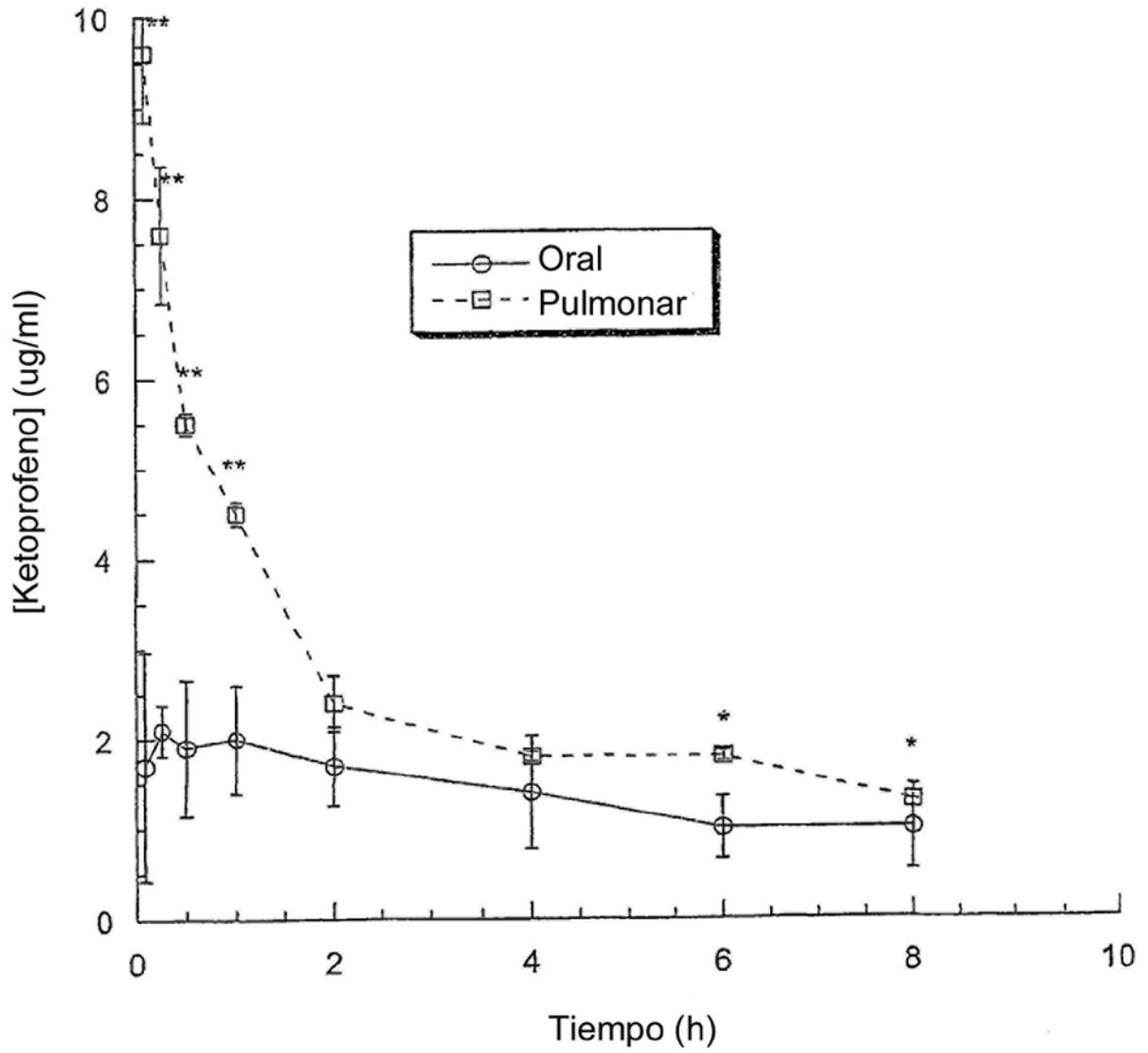


FIG. 9

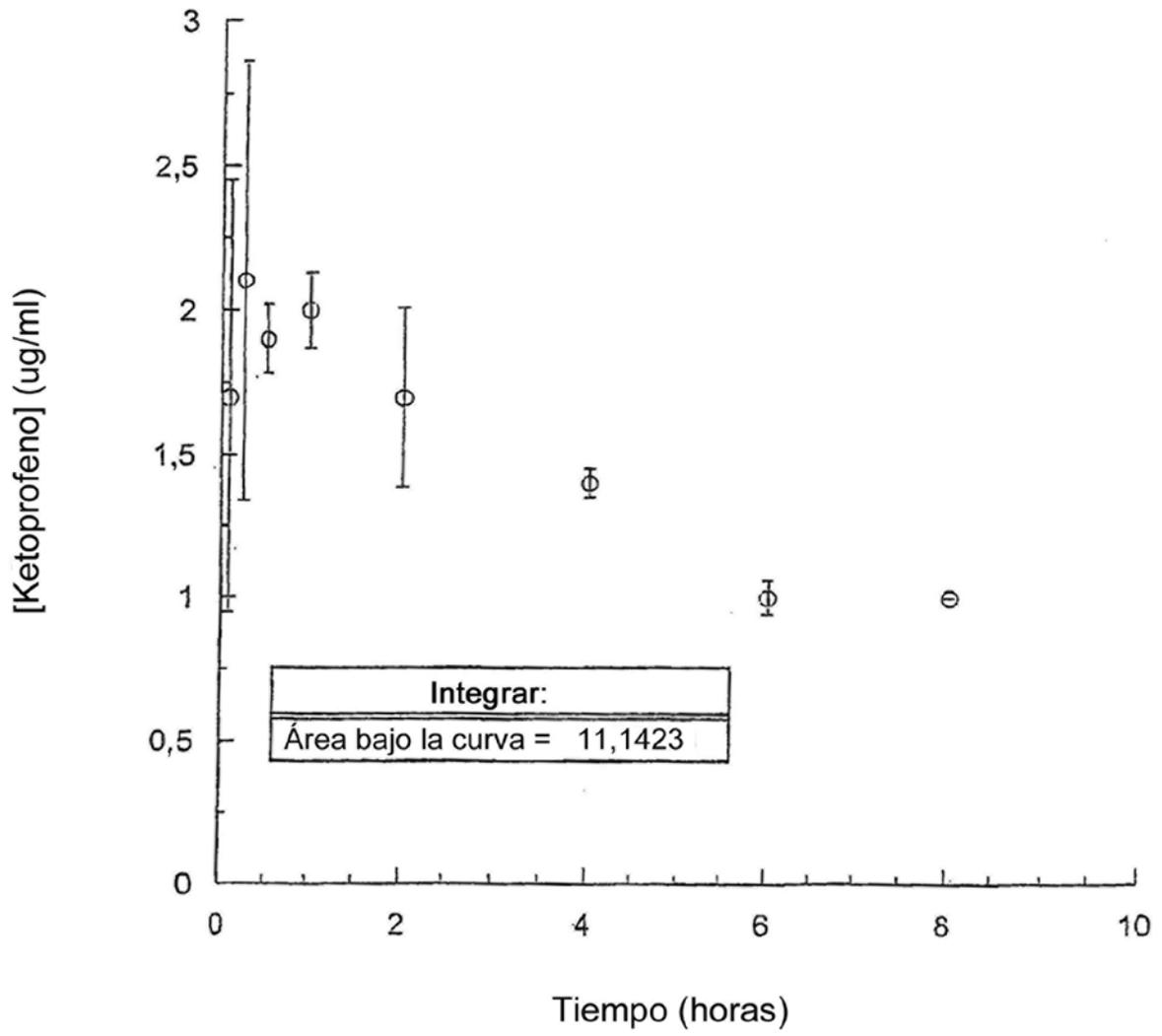


FIG. 10

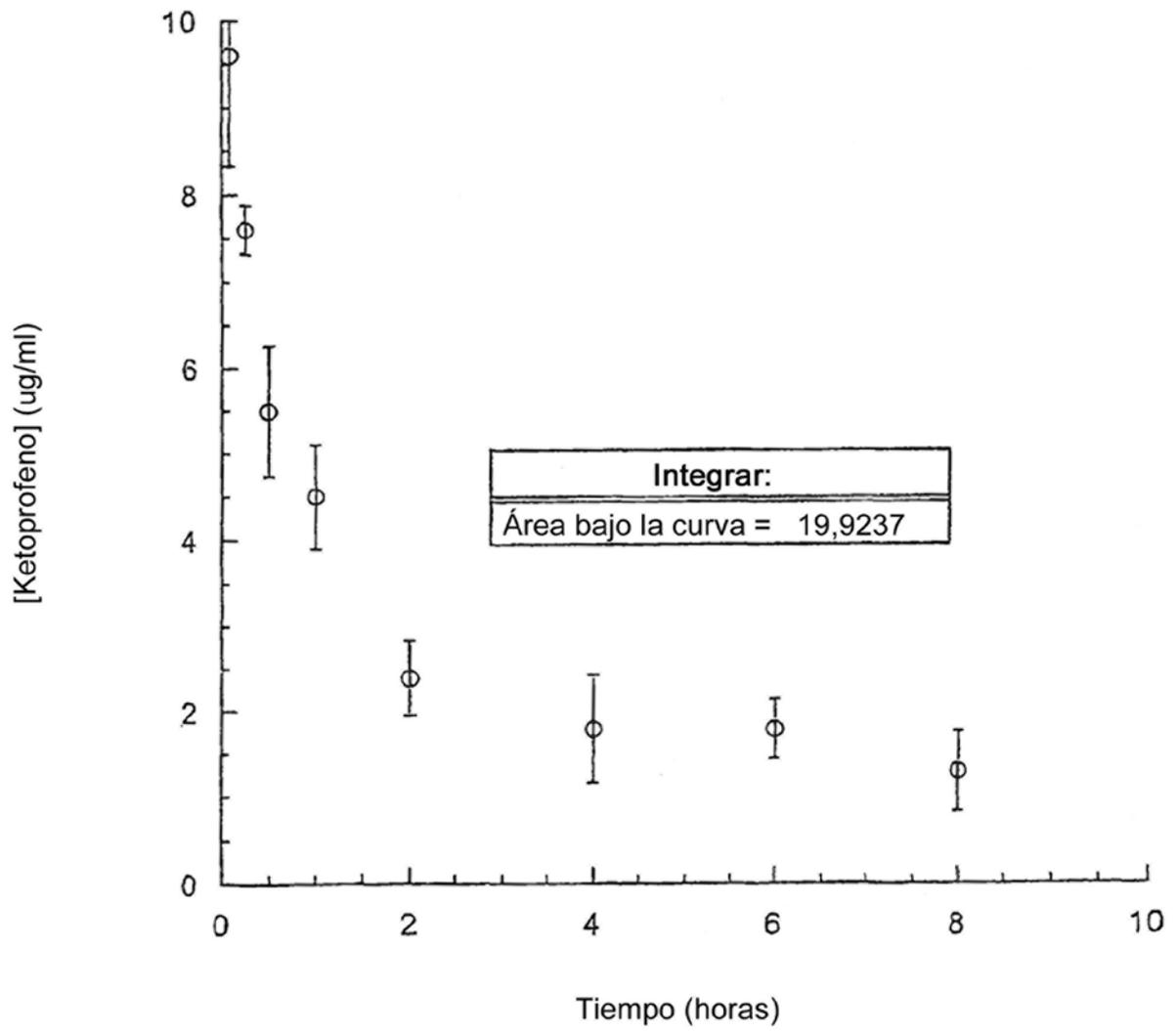


FIG. 11

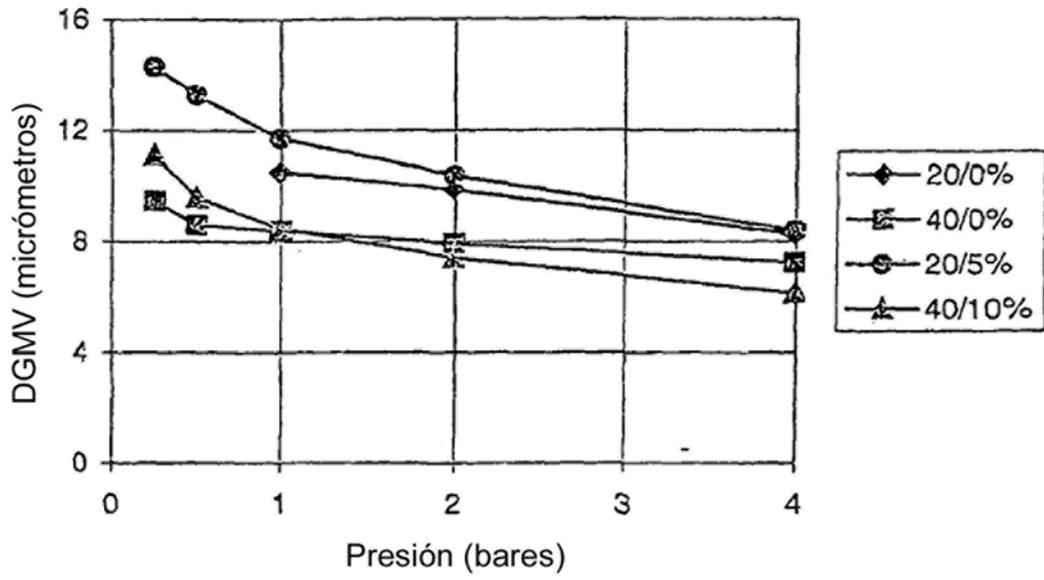


FIG. 12

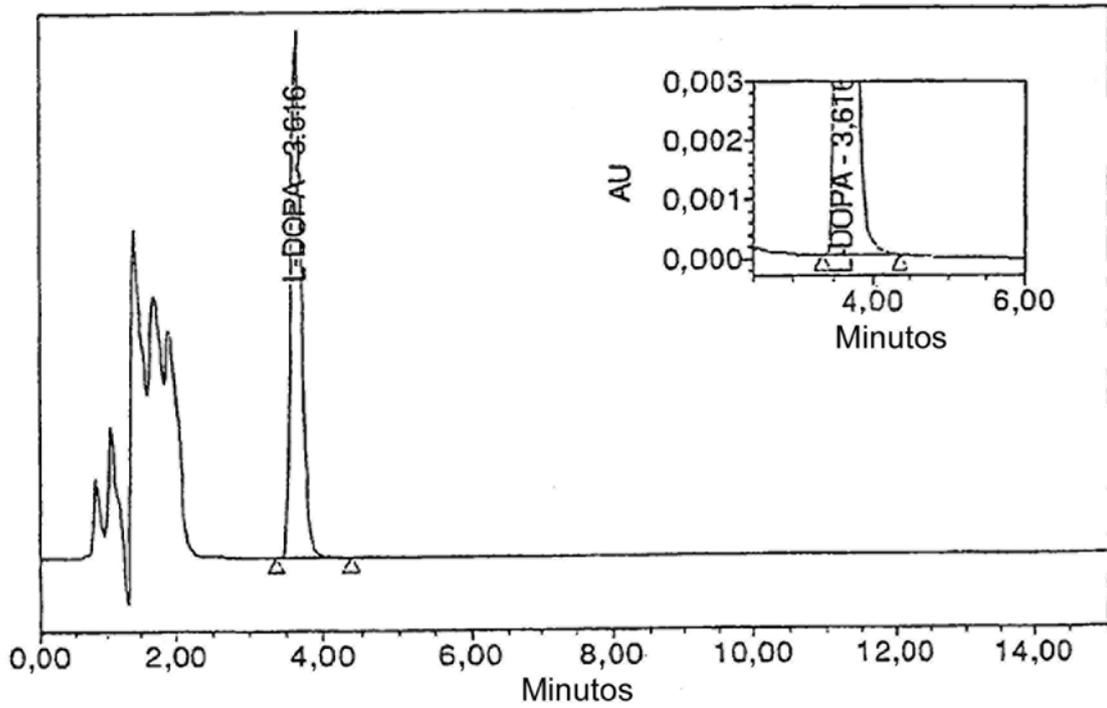


FIG. 13A

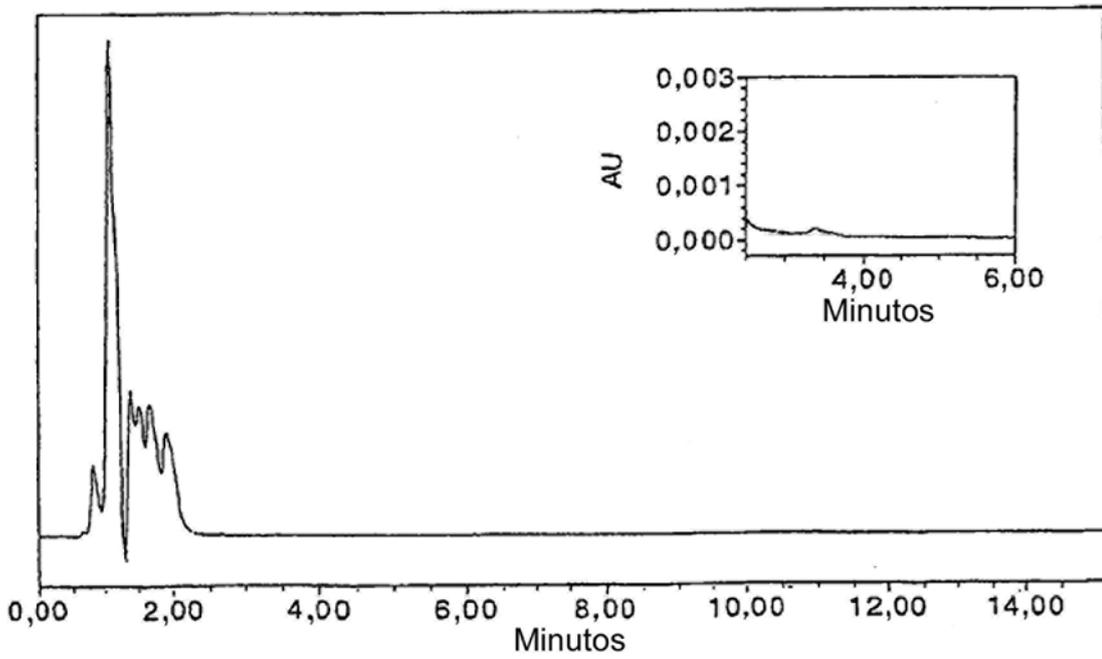


FIG. 13B

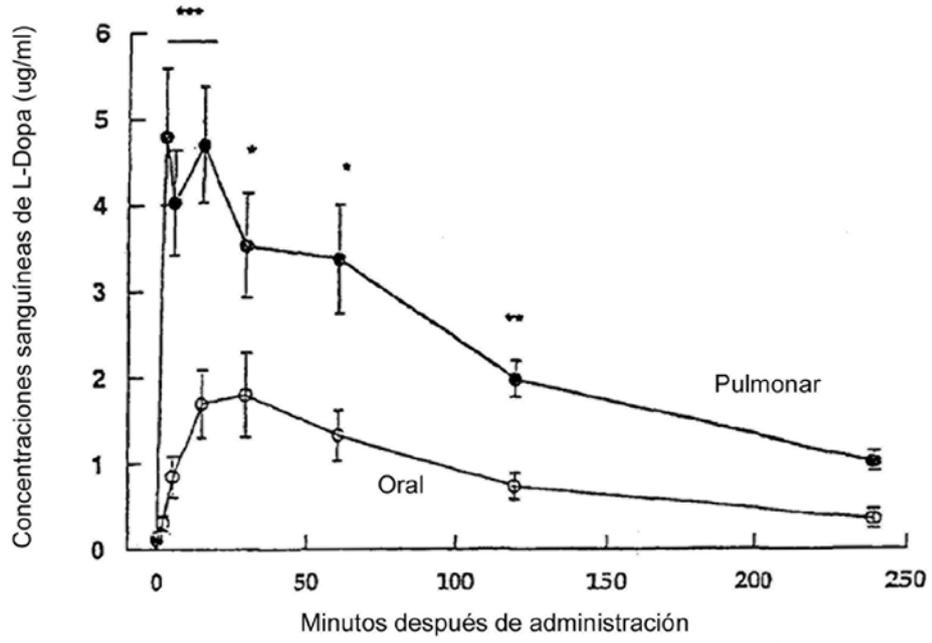


FIG. 14A

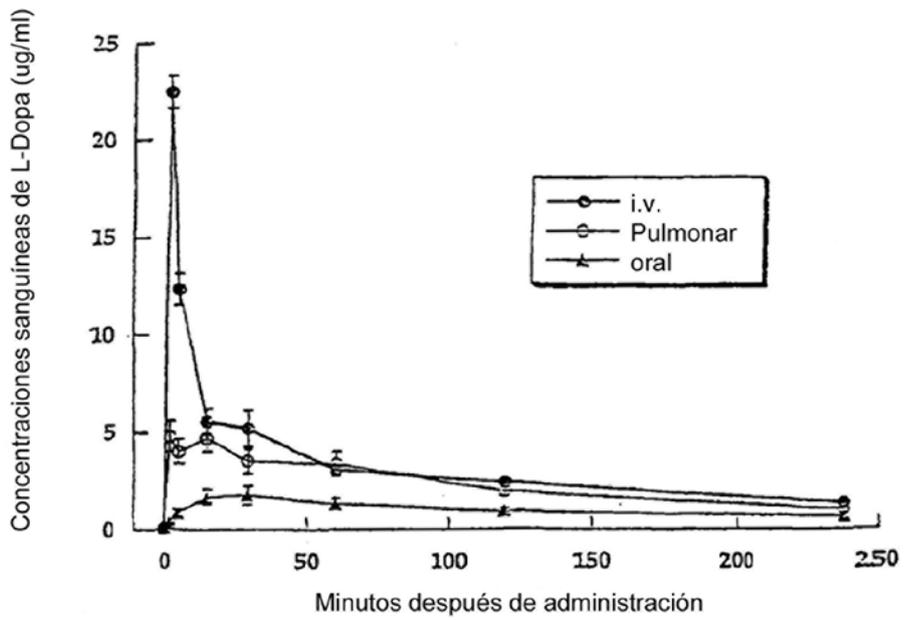


FIG. 14B

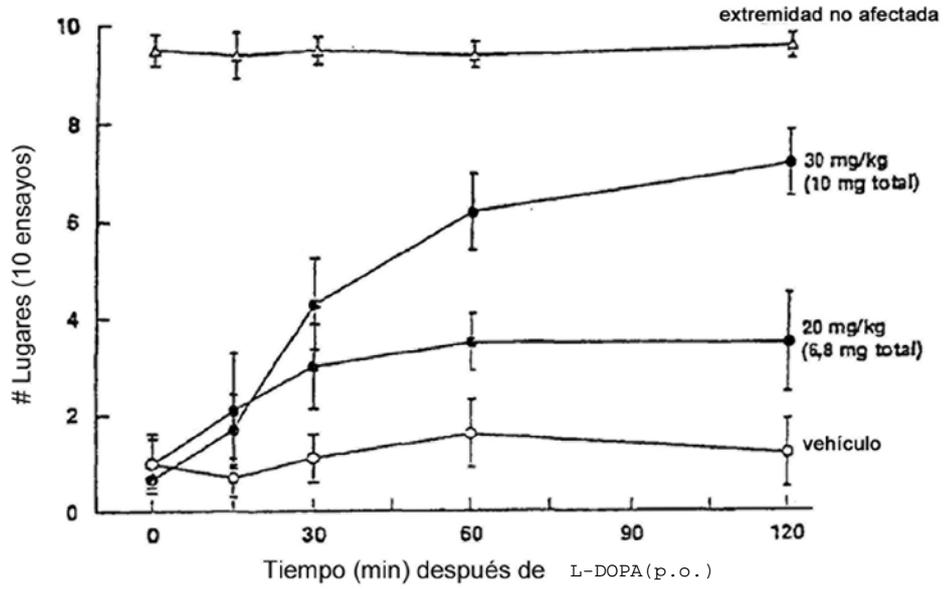


FIG. 15A -

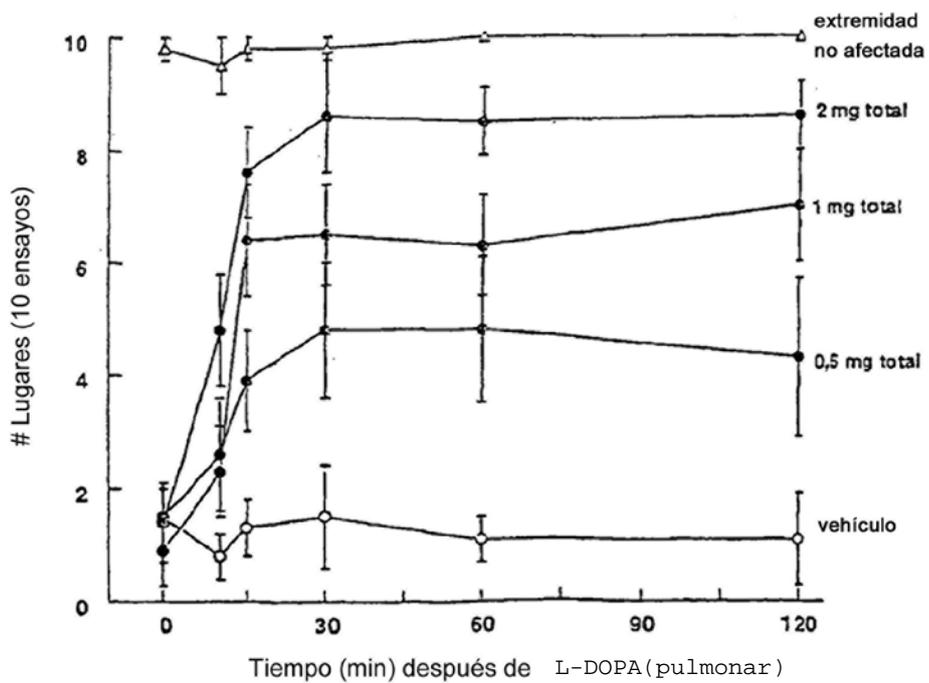


FIG. 15B

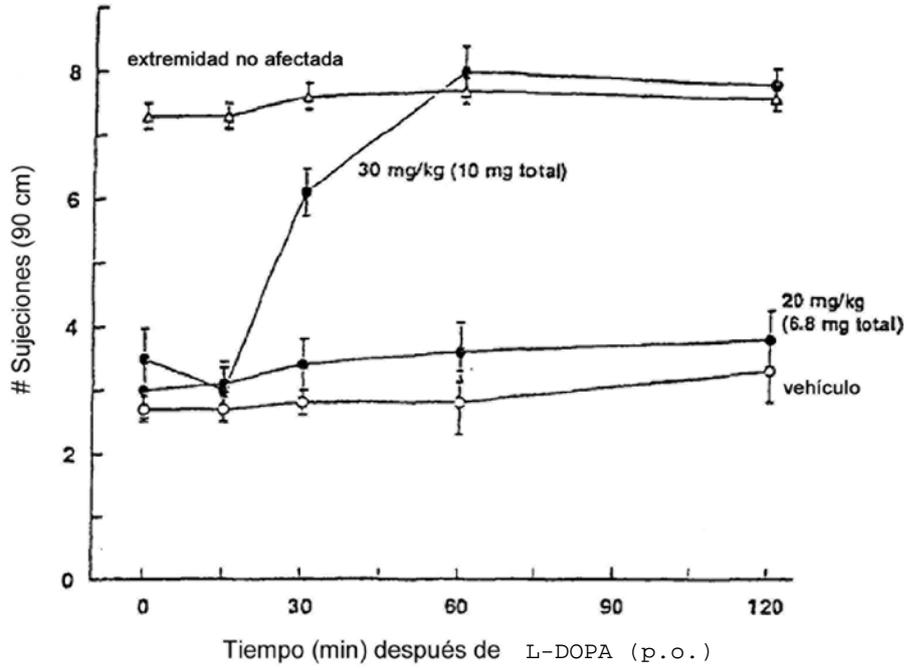


FIG. 16A

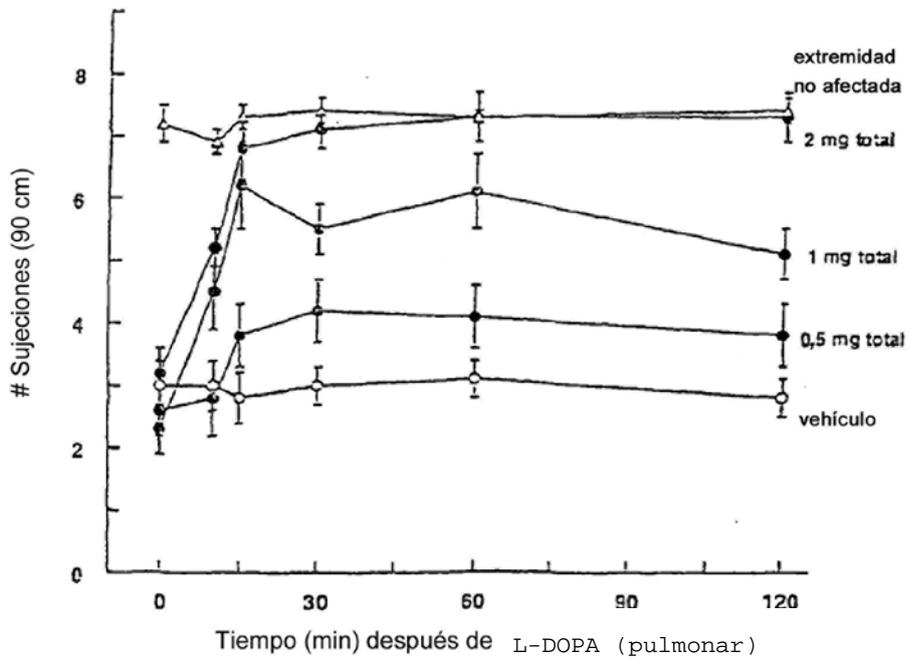


FIG. 16B

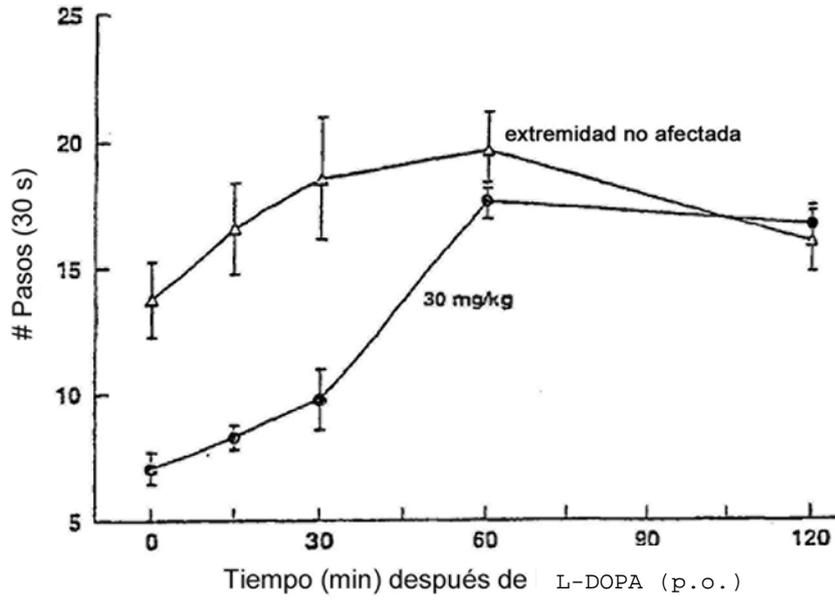


FIG. 17A

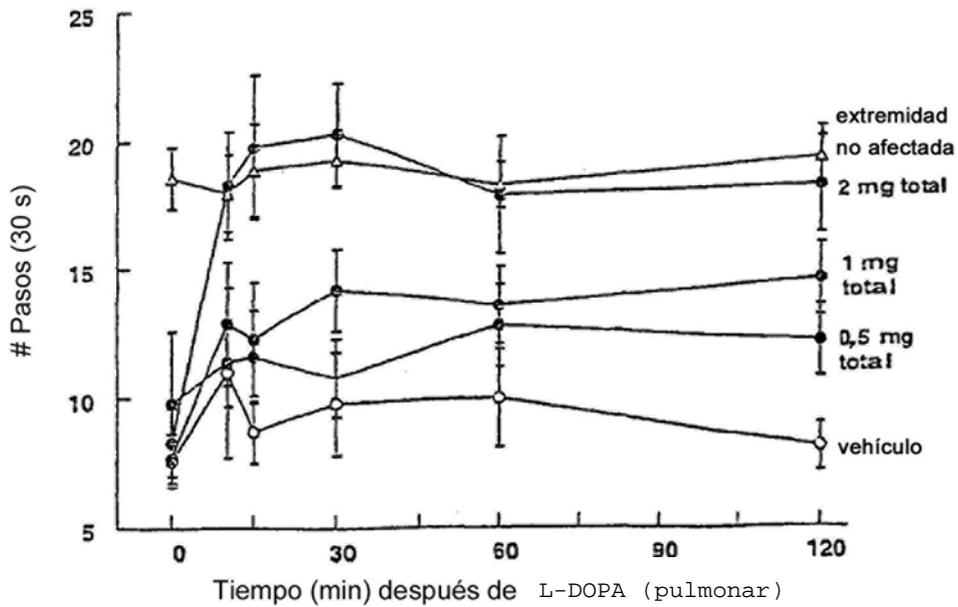


FIG. 17B

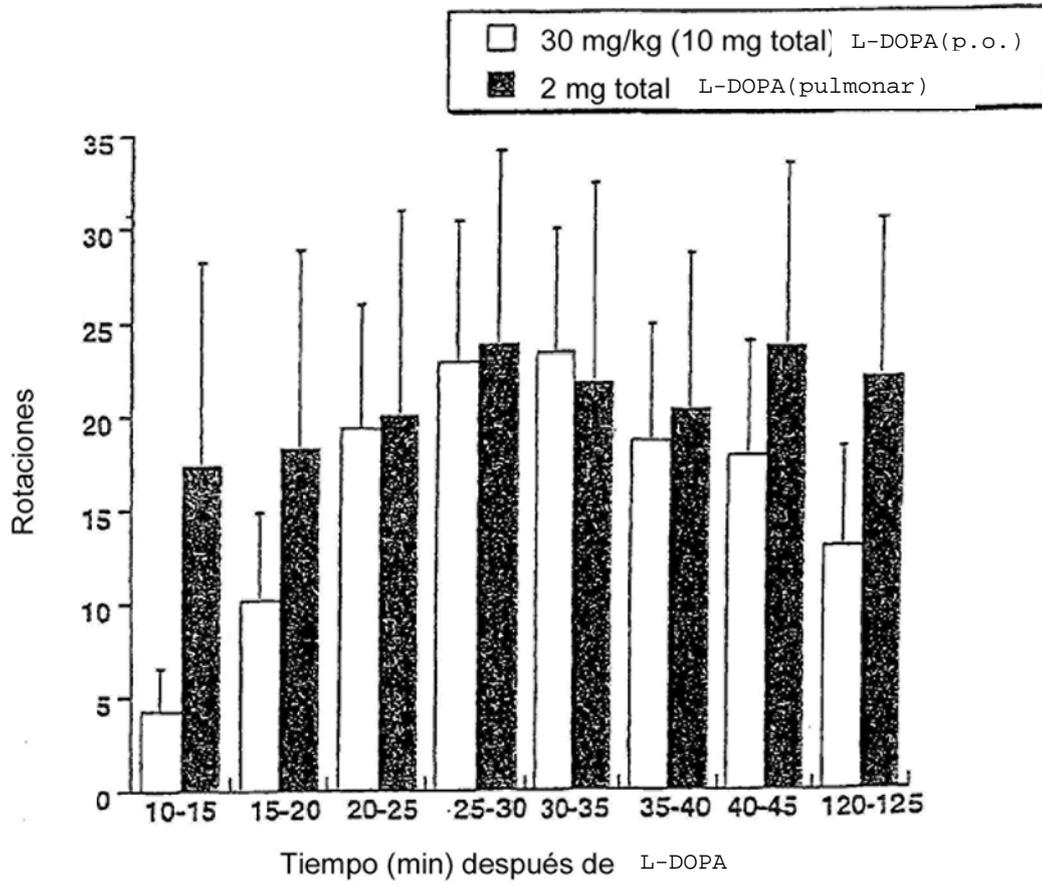


FIG. 18

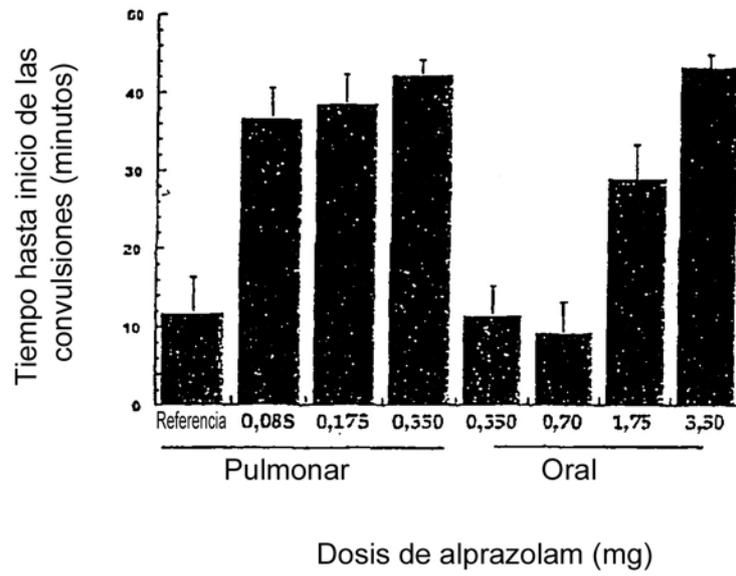


Fig. 19A

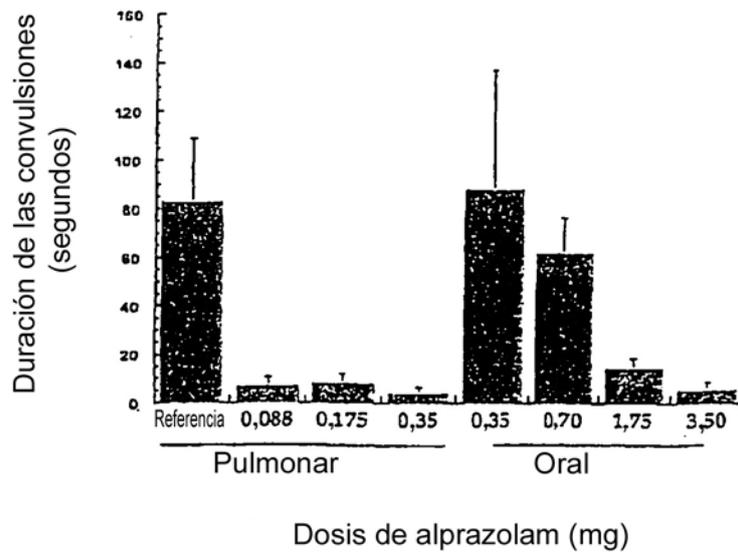


Fig. 19B

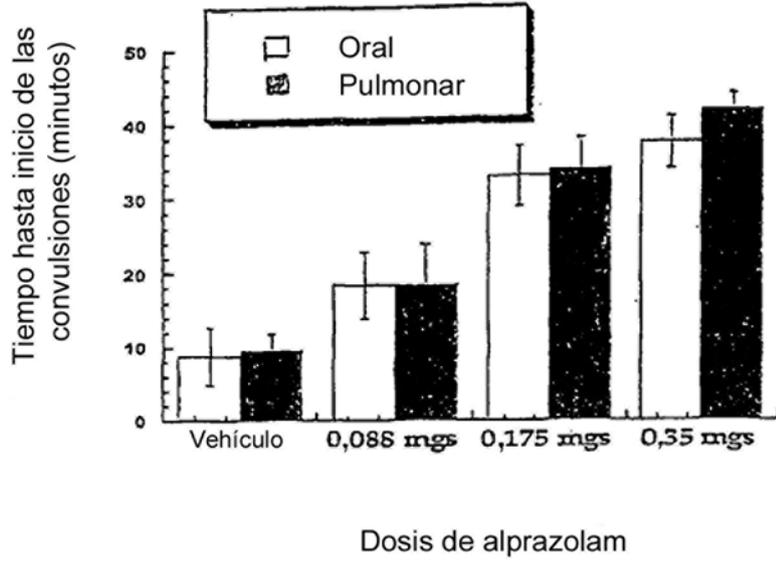


Fig. 20A

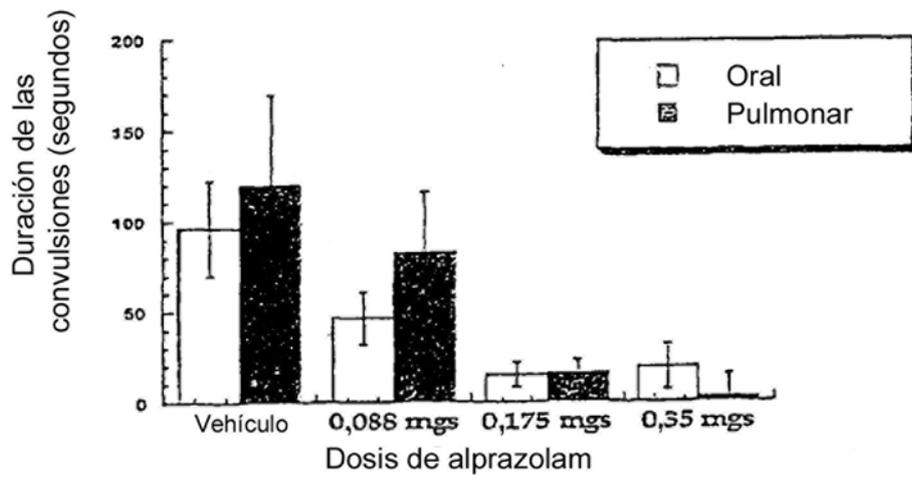


Fig. 20B

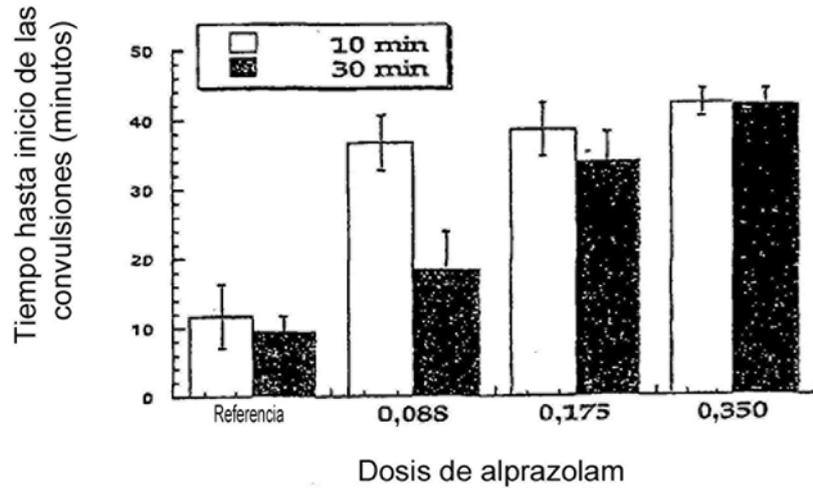


Fig. 21A

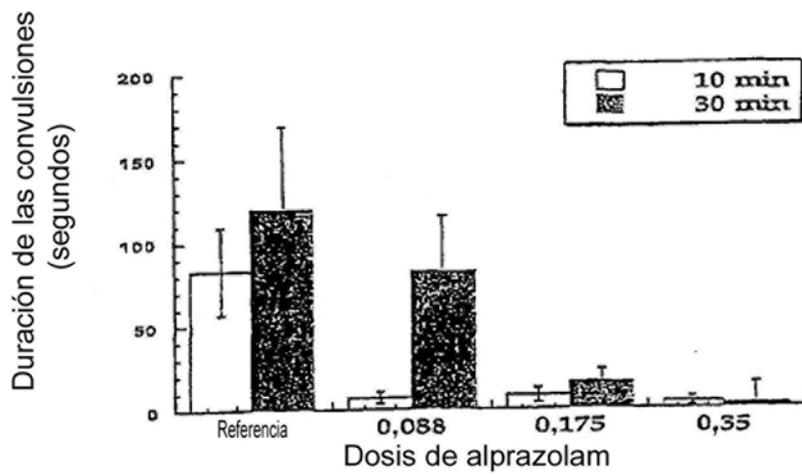


Fig. 21B