

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 315**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5383 (2006.01)

A61K 31/538 (2006.01)

A61K 31/4375 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 9/12 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 33/06 (2006.01)

A61K 33/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2006 E 12007354 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2594272**

54 Título: **Fluoroquinolonas en aerosol y sus usos**

30 Prioridad:

18.05.2005 US 682530 P

01.07.2005 US 696160 P

13.02.2006 US 773300 P

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

08.10.2018

73 Titular/es:

HORIZON ORPHAN LLC (100.0%)

150 South Saunders Road

Lake Forest, IL 60045, US

72 Inventor/es:

BOSTIAN, KEITH A.;

DUDLEY, MICHAEL N.;

SURBER, MARK;

GRIFFITH, DAVID C. y

LOMOVSKAYA, OLGA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 685 315 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

Fluoroquinolonas en aerosol y sus usos

Descripción de la técnica relacionada

5 Los antibióticos han sido herramientas efectivas en el tratamiento de enfermedades infecciosas durante el último medio siglo. Desde el desarrollo de la terapia antimicrobiana a finales de los 1980, la mayoría de las infecciones bacterianas presentes en los pacientes en los países desarrollados podían controlarse a menos que la infección ocurriera en un órgano o medio donde los antibióticos fueran ineficaces o difíciles de suministrar, tales como las infecciones bacterianas del sistema circulatorio en pacientes con sepsis o infecciones bacterianas de los pulmones en la fibrosis quística. Sin embargo, incluso en las infecciones ordinarias, en respuesta a la presión del uso de antimicrobianos, se han generalizado múltiples mecanismos de resistencia y amenazan la utilidad clínica incluso de la terapia antibacteriana más agresiva. El aumento de cepas antimicrobianas resistentes ha sido particularmente común en los principales hospitales y centros sanitarios. Las consecuencias del aumento de cepas resistentes incluyen una mayor morbilidad y mortalidad, la hospitalización más prolongada del paciente, y un aumento en los costos de tratamiento. Se describen métodos alternativos, compuestos y composiciones para inhibir el crecimiento de microbios patógenos *in vitro* y para el tratamiento de infecciones bacterianas patógenas *in vivo* mediante el uso de compuestos antibacterianos de quinolina, por ejemplo, en el documento WO 02/18345. Las bacterias han desarrollado varios mecanismos diferentes para superar la acción de los antimicrobianos. Estos mecanismos de resistencia pueden ser específicos para una molécula o una familia de antimicrobianos, o pueden ser inespecíficos e involucrarse en la resistencia a los antimicrobianos no relacionados. Varios mecanismos de resistencia pueden existir en una única cepa bacteriana, y estos mecanismos pueden actuar de forma independiente o pueden actuar de forma sinérgica para superar la acción de un antimicrobiano o una combinación de antimicrobianos. los mecanismos específicos incluyen la degradación del fármaco, la inactivación del fármaco por modificación enzimática, y la alteración del objetivo del fármaco. Existen, sin embargo, mecanismos más generales de resistencia a los fármacos, en los que se evita o reduce el acceso del antimicrobiano al objetivo mediante la disminución del transporte del antimicrobiano a la célula o mediante el aumento de la salida del fármaco a partir de la célula al medio exterior. Ambos mecanismos pueden reducir la concentración del fármaco en el sitio objetivo y permitir la supervivencia bacteriana en presencia de uno o más antimicrobianos que de cualquier otra forma podrían inhibir o destruir las células bacterianas. Algunas bacterias utilizan ambos mecanismos, combinando una baja permeabilidad de la pared celular (que incluye las membranas) con una salida activa de los antimicrobianos.

30 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un método para producir un aerosol de una solución que comprende levofloxacina u ofloxacina y un catión divalente o trivalente, y dicho método comprende: obtener una solución que comprende levofloxacina u ofloxacina y un catión divalente o trivalente; y aerosolizar dicha solución para conseguir un aerosol que comprende un diámetro aerodinámico mediano de masa de 5 μm o menos, en el que dicho aerosol es adecuado para la inhalación en un pulmón.

Los aspectos particulares del método de producción del aerosol según la invención se exponen en las reivindicaciones 2 a 11.

Un aspecto adicional de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una solución acuosa de levofloxacina u ofloxacina y un catión divalente o trivalente, en la que la solución es adecuada para la inhalación en un pulmón. En una realización, la composición farmacéutica comprende una solución acuosa de levofloxacina u ofloxacina y un catión divalente o trivalente. En una realización, el catión divalente o trivalente se selecciona de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , y Al^{3+} . En otra realización, el catión es un catión divalente seleccionado de magnesio o calcio. En otra realización, el catión es Mg^{2+} .

La administración en aerosol directamente a los compartimentos nasal, seno, tracto respiratorio y pulmonar a través de inhalación intranasal u oral permite el suministro de fármacos a alta concentración en un sitio de infección respiratoria con disminución del riesgo de toxicidad extra-respiratoria asociado con las rutas no respiratorias de suministro de fármacos. Además, la administración directa en el sitio de infección permite niveles de fármaco locales muy altos, una propiedad que permite un efecto de destrucción con "administración rápida, alta concentración, exposición local" para esta clase de antibiótico. En consecuencia, debido a que el efecto de la destrucción microbiana de un compuesto antibiótico en particular y la composición terapéutica varía dependiendo de los parámetros de formulación y suministro, pueden desarrollarse nuevas composiciones y métodos de suministro para los compuestos farmacológicos existentes que se reformulan y administran a través de nuevas técnicas de suministro existentes. Los miembros de la clase de fármacos de fluoroquinolonas exhiben propiedades farmacológicas únicas, que incluyen la biodisponibilidad (F), tiempo de absorción medio (MAT) de los pulmones, concentraciones de fármaco máxima en el fluido del revestimiento epitelial, fluido de lavado bronquial, esputo y/o tejido pulmonar ($\text{C}_{\text{máx}}$) después de la administración de aerosol, tiempo de retención pulmonar, área bajo la curva (AUC), concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del antibiótico requeridas para la actividad antibacteriana, la relación AUC/CMI, y seguridad local y sistémica. Es específico de la invención el uso de la administración rápida en aerosol, a corto plazo, que suministra una exposición al fármaco de alta concentración directamente en el tejido afectado (ELF, esputo, BAL, tejido) a través

del suministro en aerosol para el tratamiento de la infección bacteriana en animales y seres humanos.

Además de los requisitos clínicos y farmacológicos presentes en cualquier composición destinada a la administración terapéutica, se deben considerar también muchos factores fisicoquímicos únicos para un compuesto farmacéutico. Estos incluyen, pero sin limitación, la solubilidad acuosa, viscosidad, coeficiente de partición (LogP), estabilidad prevista en varias formulaciones, osmolalidad, tensión superficial, pH, pKa, pKb, velocidad de disolución, permeabilidad en el esputo, unión/inactivación en el esputo, sabor, irritabilidad de la garganta y tolerancia aguda.

Otros factores a considerar al diseñar la forma del producto incluyen la química física de la fluoroquinolona y la actividad antibacteriana, indicación de la enfermedad, aceptación clínica, y conformidad del paciente. Como ejemplo no limitante, si se desea, el producto de fluoroquinolona en aerosol puede estar en forma de un líquido simple (p.ej., fluoroquinolona soluble con excipientes/sales solubles no encapsulantes), un líquido complejo (p.ej., fluorocloroquina encapsulada o complejada con excipientes solubles tales como lípidos, liposomas, ciclodextrinas, microencapsulaciones, y emulsiones), una suspensión compleja (p.ej., fluorocloroquina en forma de una nanosuspensión estable de baja solubilidad solamente, complejos co-cristal/co-precipitado, y mezclas con lípidos de baja solubilidad tales como nanopartículas sólido-lípido), o un polvo seco (fluoroquinolona en polvo seco solamente o en un complejo co-cristal/co-precipitado/secado por aspersion o mezcla con excipientes/sales de baja solubilidad o mezclas fácilmente solubles tales como lactosa).

Combinado con la forma del producto está la consideración del envasado. Como ejemplo no limitante, las consideraciones para envasar incluyen la estabilidad intrínseca del producto, la necesidad de liofilización que proporciona estabilidad, la selección del dispositivo (por ejemplo, nebulizador líquido, inhaladores de polvo seco, inhalador de dosis medida), y la forma de envasado (por ejemplo, formulación líquida simple o líquida compleja en un frasco en forma de líquido o liofilizado que se disuelve antes o después de la inserción en el dispositivo; las formulaciones complejas en suspensión en un frasco como un líquido o liofilizado con o sin un componente de sal/excipiente soluble que se disuelve antes o después de la inserción en el dispositivo, o en un envasado por separado de los componentes líquidos y sólidos; las formulaciones de polvo seco en un frasco, cápsula o envase tipo blíster, y otras formulaciones empacadas como agentes sólidos de baja solubilidad o fácilmente solubles en recipientes separados solos o junto con agentes sólidos fácilmente solubles o de baja solubilidad. Cualquier agente envasado por separado se fabricará para mezclarlo antes o después de la inserción en el dispositivo de suministro).

También se describe el aerosol y el suministro tópico de antimicrobianos de la fluoroquinolona, tales como levofloxacina. La levofloxacina tiene características de solubilidad favorables que permiten la administración de niveles de fluoroquinolona clínicamente deseables en aerosol (por ejemplo, a través de la nebulización de líquido, dispersión de polvo seco o administración de dosis medida) o de forma tópica (por ejemplo, suspensión acuosa, preparación oleosa o similares o como un goteo, pulverización, supositorio, ungüento, o una pomada o similares) y puede usarse en métodos para el tratamiento agudo o profiláctico de un vertebrado infectado, por ejemplo, una infección bacteriana, o un sujeto en riesgo de una infección. La fluoroquinolona también puede ser ofloxacina.

El método terapéutico descrito pero no reivindicado puede tratar una infección bacteriana en un sujeto usando levofloxacina en aerosol concentrada administrada a un sujeto infectado con una bacteria patógena en los pulmones.

El método terapéutico puede incluir además una etapa de diagnóstico, tal como la identificación de un paciente infectado con una bacteria patogénica particular, o una bacteria resistente. En algunas realizaciones, el método incluye además identificar un paciente colonizado con una bacteria que es capaz de desarrollar resistencia a los antimicrobianos de la fluoroquinolona. En algunas realizaciones, la cantidad suministrada de la levofloxacina en aerosol es suficiente para superar la resistencia o prevenir el desarrollo de resistencia a la levofloxacina. En una realización, la CMI del compuesto antibacteriano de la fluoroquinolona para el microbio es mayor que aproximadamente 2 µg/ml.

De forma adecuada, la cantidad suministrada de la levofloxacina en aerosol es suficiente para superar la resistencia o prevenir además la resistencia de un organismo que presenta una CMI del compuesto antibacteriano de la fluoroquinolona que es mayor que aproximadamente 4 µg/ml.

De forma adecuada, la cantidad suministrada de fluoroquinolona en aerosol es suficiente para superar la resistencia o prevenir además la resistencia de un organismo que presenta una CMI del compuesto antibacteriano de la fluoroquinolona que es mayor de aproximadamente 8 µg/ml.

De forma adecuada, la cantidad suministrada de fluoroquinolona en aerosol es suficiente para superar la resistencia o prevenir además la resistencia de un organismo que presenta una CMI del compuesto antibacteriano de la fluoroquinolona que es mayor de aproximadamente 16 µg/ml.

De forma adecuada, la cantidad suministrada de fluoroquinolona en aerosol es suficiente para superar la resistencia o prevenir además la resistencia de un organismo que presenta una CMI del compuesto antibacteriano de la fluoroquinolona que es mayor de aproximadamente 32 µg/ml.

También se describe pero no se reivindica un método para el tratamiento profiláctico de un sujeto, que incluye administrar a un sujeto, susceptible a la infección microbiana o un portador crónico de una infección microbiana

asintomática o poco sintomática, un antimicrobiano de la fluoroquinolona para lograr una concentración mínima inhibitoria del antimicrobiano en un sitio de infección potencial o actual. En una realización, el método comprende además identificar un sujeto como un sujeto en riesgo de una infección bacteriana o en riesgo de una exacerbación de una infección.

5 También se describe pero no se reivindica un método para el tratamiento agudo o profiláctico de un paciente a través de la administración de la fluoroquinolona en aerosol para producir y mantener las concentraciones umbrales del fármaco en el pulmón, que pueden medirse como los niveles del fármaco en el fluido del revestimiento epitelial (ELF), esputo, tejido pulmonar o fluido de lavado bronquial (BAL). Una realización incluye el uso de la administración rápida en aerosol, a corto plazo, que suministra una exposición al fármaco de alta concentración directamente en el tejido
10 afectado para el tratamiento de infecciones bacterianas en animales y seres humanos.

También se describe pero no se reivindica un método para tratar una infección microbiana en un sujeto, que incluye administrar a un sujeto infectado con un microbio, un antimicrobiano de la fluoroquinolona para lograr una concentración mínima inhibitoria del antimicrobiano en un sitio de infección. En una realización, el método comprende además, identificar al sujeto como infectado por un microbio que es resistente a un agente antimicrobiano.

15 En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, la concentración mínima inhibitoria antimicrobiana de la fluoroquinolona permanece en el sitio de la infección durante al menos un período de aproximadamente 5 minutos, al menos aproximadamente un período de 10 min, al menos aproximadamente un período de 20 min, al menos aproximadamente un período de 30 min, al menos aproximadamente un período de 1 hora, un período de 2 horas, al menos aproximadamente un período de 4 horas o de otros valores de tiempo en el intervalo del cuarto de
20 hora. La concentración mínima inhibitoria (CMI) efectiva de antimicrobiano de la fluoroquinolona es suficiente para causar un efecto terapéutico y el efecto puede localizarse en el sitio de infección. En algunas realizaciones, una o más administraciones de la levofloxacina logran una concentración de la fluoroquinolona en ELF, BAL, y/o esputo de al menos 1 vez a 5000 veces la CMI de los organismos infectantes o potencialmente infectantes, que incluyen todos los valores enteros en el mismo, tal como 2 veces, 4 veces, 8 veces, 16 veces, 32 veces, 64 veces, 128 veces, 256 veces,
25 512 veces, 1028 veces, 2056 veces, y 4112 veces las CMI microbianas.

En algunas realizaciones, tal como un sitio pulmonar, el antimicrobiano de la fluoroquinolona se administra en una o más administraciones para lograr una dosis respirable suministrada diaria de al menos aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg, que incluyen todos los valores enteros en la misma tal como 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 miligramos. Del mismo modo, el agente antimicrobiano de la fluoroquinolona se administra en una o más
30 administraciones para lograr una dosis respirable suministrada diaria de al menos aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mg que incluyen todos los valores enteros en la misma, tales como 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, y 95 mg. En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el antimicrobiano de la fluoroquinolona se administra en una o más administraciones para lograr una dosis diaria respirable suministrada de hasta 150 mg que incluyen todos los valores enteros en la misma, tales como 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140 y 145 mg. El
35 antimicrobiano de la fluoroquinolona se administra en la dosis respirable suministrada descrita en menos de 20 minutos, menos de 10 minutos, menos de 7 minutos, menos de 5 minutos, en menos de 3 minutos y en menos de 2 minutos. En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el agente antimicrobiano es ofloxacina, aunque se prefiere levofloxacina.

En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, la bacteria es una bacteria gram-negativa tal como
40 *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas hydrophilia*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Francisella tularensis*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia intermedia*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus ducreyi*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Branhamella catarrhalis*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Borrelia burgdorferi*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Kingella*, *Moraxella*, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides distasonis*, grupo de homología *Bacteroides 3452A*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides ovalus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides eggerthii*, y *Bacteroides splanchnicus*. En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, la bacteria es una bacteria anaerobia gramnegativa, como ejemplo no limitante, estas incluyen *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides distasonis*, grupo de homología *Bacteroides 3452A*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides ovalus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides eggerthii*, y *Bacteroides splanchnicus*. En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, la bacteria es una bacteria grampositiva, como ejemplo no limitante estas incluyen: *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus milleri*; *Streptococcus* (Grupo G); *Streptococcus* (Grupo C/F); *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus*

hominis, y *Staphylococcus saccharolyticus*. En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, la bacteria es una bacteria Grampositiva anaerobia, como ejemplo no limitante, estas incluyen *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetini*, y *Clostridium botulinum*. En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, la bacteria es una bacteria ácido resistente, como ejemplo no limitante, estas incluyen *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, y *Mycobacterium leprae*. En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, la bacteria es una bacteria atípica, como ejemplo no limitante, estas incluyen *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*.

En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el sujeto es un ser humano con fibrosis quística. En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el sujeto es un ser humano con neumonía, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, o sinusitis, o un ser humano ventilado mecánicamente.

También se describe una composición farmacéutica que incluye una formulación antimicrobiana de la fluoroquinolona líquida simple (por ejemplo, la fluoroquinolona soluble con excipientes solubles en agua no encapsulantes) como se describió anteriormente que tiene una osmolalidad de aproximadamente 200 mOsmol/kg a aproximadamente 1250 mOsmol/kg. En una de tales realizaciones, la solución tiene una concentración de ion permeante de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM. En una realización, la osmolalidad es de aproximadamente 250 mOsmol/kg a aproximadamente 1050 mOsmol/kg. En una realización, la osmolalidad es preferiblemente de aproximadamente 350 mOsmol/kg y aproximadamente 750 mOsmol/kg y lo más preferiblemente aproximadamente de 300 mOsmol/kg.

También se describe una composición farmacéutica que incluye una formulación antimicrobiana de la fluoroquinolona líquida simple que tiene una concentración de ion permeante de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM y preferiblemente de aproximadamente 50 mM a 200 mM. En tal realización, uno o más iones permeantes de la composición se seleccionan del grupo que consiste en cloruro y bromuro.

También se describe una composición farmacéutica que incluye una formulación antimicrobiana de fluoroquinolona líquida compleja (p.ej. fluoroquinolona encapsulada o complejada con excipientes solubles en agua tales como lípidos, liposomas, ciclodextrinas, microencapsulaciones, y emulsiones) como se describió anteriormente que tiene una osmolalidad de la solución de aproximadamente 200 mOsmol/kg a aproximadamente 1250 mOsmol/kg. En tal realización, la solución tiene una concentración de ión permeante de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM. En una realización, la osmolalidad es de aproximadamente 250 mOsmol/kg a aproximadamente 1050 mOsmol/kg. En una realización, la osmolalidad es preferiblemente de aproximadamente 350 mOsmol/kg a aproximadamente 750 mOsmol/kg, y lo más preferiblemente aproximadamente 300 mOsmol/kg.

También se describe una composición farmacéutica que incluye una formulación antimicrobiana de fluoroquinolona líquida compleja que tiene una concentración de ion permeante de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM. En tal realización, uno más de los iones permeantes de la composición se seleccionan del grupo que consiste en cloruro y bromuro.

También se describe una composición farmacéutica que incluye una formulación antimicrobiana de fluoroquinolona líquida compleja que tiene una concentración de ión permeante de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM. En tal realización, el o los iones permeantes de la composición se seleccionan del grupo que consiste en cloruro y bromuro.

También se describe, pero no se reivindica, una composición farmacéutica que incluye un agente enmascarador del sabor. Como ejemplo no limitante, un agente enmascarador del sabor puede incluir un azúcar, un catión divalente o trivalente que forma complejos con una fluoroquinolona, osmolalidad optimizada, y/o una concentración de ion permeante optimizada.

También se describe, pero no se reivindica, un sistema para administrar un antimicrobiano de la fluoroquinolona que incluye un recipiente que comprende una solución de un antimicrobiano de la fluoroquinolona y un nebulizador físicamente acoplado o coempaquetado con el recipiente y adaptado para producir un aerosol de la solución que tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 2 micras a aproximadamente 5 micras de diámetro aerodinámico mediano de masa y una desviación estándar geométrica de tamaño de partícula de menos de o igual a aproximadamente 2,5 micras de diámetro aerodinámico mediano de masa. En una realización, la desviación estándar geométrica del tamaño de partícula es menos de o igual a aproximadamente 2,0 micras. En una realización, la desviación estándar geométrica del tamaño de partícula es menos de o igual a aproximadamente 1,8 micras.

También se describe, pero no se reivindica, un kit que incluye un recipiente que comprende una formulación farmacéutica que comprende un agente antimicrobiano de la quinolona y un aerosolizador adaptado para aerosolizar la formulación farmacéutica y suministrarla al tracto respiratorio inferior y al compartimento pulmonar después de la administración intraoral. La formulación también se puede administrar en forma de un polvo seco o por medio de un inhalador de dosis medida.

También se describe, pero no se reivindica, un kit que incluye un recipiente que comprende una formulación farmacéutica que comprende un agente antimicrobiano de la quinolona y un aerosolizador adaptado para aerosolizar la formulación farmacéutica y suministrarla a la cavidad nasal después de la administración intranasal.

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son sólo ejemplares y explicativas y no son restrictivas de la invención reivindicada.

Descripción de las figuras

- 5 La Figura 1 es un gráfico que muestra la relación dosis : CMI de las fluoroquinolonas y otros antibióticos para destruir las bacterias.
- La Figura 2 es un gráfico que muestra las concentraciones en suero de la ciprofloxacina después de la administración oral tanto en pacientes CF como en los controles sanos.
- La Figura 3 es un gráfico que muestra las concentraciones de la ciprofloxacina en el esputo y suero después de la administración oral.
- 10 La Figura 4A es un gráfico que muestra que la destrucción en el tiempo de la levofloxacina repercute en células PAM1020 en fase estacionaria.
- La Figura 4B es un gráfico que muestra que la destrucción en el tiempo de la levofloxacina repercute en células PAM1032 en fase estacionaria.
- 15 La Figura 5A es un gráfico que muestra que la destrucción en el tiempo de Levofloxacina repercute en células PAM1020 en fase estacionaria.
- La Figura 5B es un gráfico que muestra que la destrucción en el tiempo de Levofloxacina repercute en células PAM1032 en fase estacionaria.
- La Figura 6A es un gráfico que muestra el re-crecimiento de PAM 1020 después de una exposición a Levofloxacina de 10 minutos.
- 20 La Figura 6B es un gráfico que muestra el re-crecimiento de PAM 1020 después de una exposición a Levofloxacina de 160 minutos.
- La Figura 6C es un gráfico que muestra el re-crecimiento de PAM 1032 después de una exposición a Levofloxacina de 10 minutos.
- 25 La Figura 6D es un gráfico que muestra el re-crecimiento de PAM 1032 después de una exposición a Levofloxacina de 160 minutos.
- La Figura 7A es un gráfico que muestra que la destrucción en el tiempo de la Levofloxacina repercute en células PAM1020 en fase logarítmica tardía bajo condiciones limitantes de oxígeno.
- La Figura 7B es un gráfico que muestra que la destrucción en el tiempo de la Levofloxacina en células PAM1032 en fase logarítmica tardía bajo condiciones limitantes de oxígeno.
- 30 La Figura 8A es un gráfico que muestra la cinética de destrucción con Levofloxacina de PAM1032 en caldo Mueller-Hinton (MHB).
- La Figura 8B es un gráfico que muestra la cinética de destrucción con Levofloxacina de PAM1032 en el esputo de fibrosis quística.
- La Figura 9 es un gráfico que muestra que la destrucción de la Levofloxacina afecta biopelículas en *Pseudomonas*.
- 35 La Figura 10 es un gráfico que muestra los efectos bactericidas de la Levofloxacina con una $C_{m\acute{a}x}$ de 1000 $\mu\text{g/ml}$ y una vida media de 10 minutos en un modelo de fibra hueca.
- La Figura 11 es un gráfico que muestra los efectos bactericidas de la Levofloxacina con una $C_{m\acute{a}x}$ de 600 $\mu\text{g/ml}$ y una vida media de 10 minutos en un modelo de fibra hueca.
- La Figura 12 es un gráfico que muestra el perfil de solubilidad de pH de la Levofloxacina mediante titulación con ácido.
- 40 La Figura 13 es un gráfico que mide el pH, mientras se titula la Levofloxacina con HCl.
- La Figura 14 es un gráfico que muestra el $V_t[\text{OH}]$ frente a V_t de la Levofloxacina.
- La Figura 15 es un gráfico que mide el pH, mientras se titula la Levofloxacina con NaOH.
- La Figura 16 es un gráfico que mide dpH/dV frente al volumen de NaOH titulante (V_t) para la titulación de la Levofloxacina.
- 45 La Figura 17 es un gráfico que mide la absorbancia de una solución de la Levofloxacina a 257 nm frente al pH.

- La Figura 18 es un gráfico que muestra la complejación de la Levofloxacin con cationes divalentes y trivalentes.
- La Figura 19 es un gráfico que muestra la titulación doble de la complejación de la Levofloxacin con Mg^{2+} .
- La Figura 20 es un gráfico que muestra la titulación doble de la complejación de la Levofloxacin con Fe^{2+} .
- La Figura 21 es un gráfico que muestra la titulación doble de la complejación de la Levofloxacin con Ca^{2+} .
- 5 La Figura 22 es un gráfico que muestra la titulación doble de la complejación de la Levofloxacin con Zn^{2+} .
- La Figura 23 es un gráfico que muestra la Levofloxacin complejada con Ca^{2+} frente a Levofloxacin libre.
- La Figura 24 es un gráfico que muestra la Levofloxacin complejada con Mg^{2+} frente a Levofloxacin libre.
- La Figura 25 es un gráfico que muestra la Levofloxacin complejada con Fe^{2+} frente a Levofloxacin libre.
- La Figura 26 es un gráfico que muestra la Levofloxacin complejada con Zn^{2+} frente a Levofloxacin libre.
- 10 La Figura 27 es un gráfico que muestra la solubilidad de la Levofloxacin en presencia de Mg^{2+} .
- La Figura 28 es un gráfico que muestra la solubilidad de la Levofloxacin en presencia de Mg^{2+} a una fuerza iónica constante.
- La Figura 29 es un gráfico que muestra la complejación de la Levofloxacin con Fe^{2+} , medida mediante espectrofluorometría.
- 15 La Figura 30 es un gráfico que muestra la complejación de la Levofloxacin con Zn^{2+} medida mediante espectrofluorometría.

Descripción Detallada

- Muchos de los problemas asociados con patógenos resistentes a los antimicrobianos podrían aliviarse si la concentración del antimicrobiano pudiera aumentarse de forma segura en el sitio de la infección. Por ejemplo, las infecciones pulmonares pueden tratarse mediante la administración directamente del agente antimicrobiano, a altas concentraciones directamente en el sitio de la infección, sin incurrir en grandes concentraciones sistémicas del antimicrobiano. En consecuencia, algunas realizaciones descritas en la presente memoria son métodos mejorados para suministrar composiciones de fármacos para tratar las infecciones bacterianas pulmonares. Más específicamente, como se describe en la presente memoria, se ha descubierto que la levofloxacin en aerosol y otras fluoroquinolonas
- 20 pueden suministrarse de forma segura mediante la inhalación a niveles suficientes para destruir las infecciones bacterianas sensibles, para disminuir la frecuencia de la resistencia antimicrobiana y para aumentar la eficacia contra infecciones pulmonares resistentes.
- 25

Definiciones

- El término "administración" o "administrar" se refiere a un método para administrar una dosis de una composición farmacéutica antimicrobiana a un vertebrado. El método preferido de administración puede variar dependiendo de diversos factores, por ejemplo, los componentes de la composición farmacéutica, el sitio de la infección bacteriana potencial o real, el microbio implicado, y la gravedad de una infección microbiana real.
- 30

- Un "vehículo" o "excipiente" es un compuesto o material usado para facilitar la administración del compuesto, por ejemplo, para aumentar la solubilidad del compuesto. Los vehículos sólidos incluyen, por ejemplo, almidón, lactosa, fosfato dicálcico, sacarosa y caolín. Los vehículos líquidos incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina, tampones, tensioactivos no iónicos y aceites comestibles tales como aceite, aceites de cacahuete y de sésamo. Además, pueden incluirse diversos adyuvantes, tales como los usados comúnmente en la técnica. Estos y otros tales compuestos se describen en la bibliografía, por ejemplo, en el Índice de Merck, Merck & Company, Rahway, NJ. Se describen consideraciones para la inclusión de diversos componentes en las composiciones farmacéuticas, por ejemplo, en Gilman y otros. (Eds). (1990); Goodman y Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8ª Ed., Pergamon Press.
- 35
- 40

- Un "diagnóstico" como se usa en la presente memoria es un compuesto, método, sistema o dispositivo que ayuda en la identificación y caracterización de un estado de salud o enfermedad. El diagnóstico puede usarse en ensayos estándar como se conoce en la técnica.
- 45

- El término "mamífero" se usa en su sentido biológico habitual. Por lo tanto, se incluyen específicamente los seres humanos, ganado vacuno, caballos, perros, y gatos, pero además se incluyen muchas otras especies.

- El término "infección microbiana" se refiere a la proliferación no deseada o la presencia de invasión de microbios patógenos en un organismo huésped. Esto incluye el crecimiento excesivo de microbios que normalmente están presentes en o sobre el cuerpo de un mamífero u otro organismo. Más generalmente, una infección microbiana puede ser cualquier situación en la que la presencia de una/varias población(es) microbiana(s) es perjudicial para un
- 50

mamífero huésped. Por lo tanto, existe una infección microbiana cuando un número excesivo de una población microbiana está presente en o sobre el cuerpo de un mamífero, o cuando los efectos de la presencia de una/varias población(es) microbiana(s) dañan las células u otros tejidos de un mamífero.

5 El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de absorción retardada y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

10 El término "sal" o "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que retienen las propiedades y la efectividad biológica de los compuestos de esta invención, y que no sean biológicamente o de cualquier otra manera indeseables. En muchos casos, los compuestos de esta invención son capaces de formar sales ácidas y/o básicas en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos. Las sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables pueden formarse con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos. Los ácidos inorgánicos a partir de los que pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Los ácidos orgánicos a partir de los que pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, el ácido acético, ácido propiónico, ácido naftoico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido pamoico (embónico), ácido esteárico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucoheptónico, ácido glucurónico, ácido láctico, ácido lactoico, ácido tartárico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, y similares. Las sales de adición básica farmacéuticamente aceptables pueden formarse con bases inorgánicas y orgánicas. Las bases inorgánicas a partir de las que pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio, y similares; son particularmente preferidas las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las bases orgánicas a partir de las que pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, y similares, específicamente tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, histidina, arginina, lisina, benetamina, N-metil-glucamina, y etanolamina. Otros ácidos incluyen ácido dodecilsulfúrico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, y sacarina.

20 "Solvato" se refiere al compuesto formado por la interacción de un disolvente y antimicrobiano de la fluoroquinolona, un metabolito, o sal de este. Los solvatos adecuados son solvatos farmacéuticamente aceptables, que incluyen los hidratos.

25 En el contexto de la respuesta de un microbio, tal como una bacteria, a un agente antimicrobiano, el término "susceptibilidad" se refiere a la sensibilidad del microbio a la presencia del agente antimicrobiano. De esta manera, aumentar la susceptibilidad significa que el microbio será inhibido por una menor concentración del agente antimicrobiano en el medio que rodea a las células microbianas. Esto es equivalente a decir que el microbio es más sensible al agente antimicrobiano. En la mayoría de los casos se habrá reducido la concentración mínima inhibitoria (CMI) de dicho agente antimicrobiano.

30 Por "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad farmacéuticamente efectiva" se entiende un agente antimicrobiano de la fluoroquinolona, como se describe para esta invención, que tiene un efecto terapéutico. Las dosis del agente antimicrobiano de la fluoroquinolona que son útiles en el tratamiento son cantidades terapéuticamente efectivas. Por lo tanto, como se usa en la presente descripción una cantidad terapéuticamente efectiva significa aquellas cantidades del agente antimicrobiano de la fluoroquinolona que producen el efecto terapéutico deseado, como se juzga por los resultados de los ensayos clínicos y/o estudios de infección en el modelo animal. En realizaciones particulares, el agente antimicrobiano de la fluoroquinolona se administra en una dosis predeterminada, y por lo tanto, una cantidad terapéuticamente efectiva sería una cantidad de la dosis administrada. Esta cantidad y la cantidad del agente antimicrobiano de la fluoroquinolona pueden determinarse rutinariamente por un experto en la técnica, y variarán, dependiendo de varios factores, tales como la cepa microbiana particular implicada. Esta cantidad puede depender además de la altura, peso, sexo, edad e historia clínica del paciente. Para los tratamientos profilácticos, una cantidad terapéuticamente efectiva es aquella cantidad que sería efectiva para prevenir una infección microbiana.

35 Un "efecto terapéutico" alivia, en cierta medida, uno o más de los síntomas de la infección, e incluye la curación de una infección. "Curación" significa que los síntomas de la infección activa se eliminan, incluyendo la eliminación total o sustancial de los miembros excesivos de microbios viables de los implicados en la infección hasta un punto en o por debajo del umbral de detección por mediciones tradicionales. Sin embargo, pueden existir ciertos efectos a largo plazo o permanentes de la infección, incluso después de obtener una curación (tal como el daño tisular extenso). Como se usa en la presente descripción, un "efecto terapéutico" se define como una reducción estadísticamente significativa de la carga bacteriana en un huésped, aparición de resistencia, o mejora en los síntomas de infección, medido por resultados clínicos en seres humanos o estudios con animales.

60 "Trata", "tratamiento" o "tratar", como se usa en la presente descripción se refiere a administrar una composición

farmacéutica para propósitos profilácticos y/o terapéuticos. El término "tratamiento profiláctico" se refiere a tratar un paciente que todavía no está infectado, pero que es susceptible, o de cualquier otra forma está en riesgo de una infección en particular. El término "tratamiento terapéutico" se refiere a administrar tratamiento a un paciente que ya padece una infección. Por lo tanto, en realizaciones preferidas, tratar es la administración a un mamífero (con propósitos terapéuticos o profilácticos) de cantidades terapéuticamente efectivas de un agente antimicrobiano de la fluoroquinolona.

La farmacocinética (PK) se refiere a la evolución en el tiempo de la concentración de antimicrobiano en el cuerpo. La farmacodinámica (PD) se refiere a la relación entre la farmacocinética y la eficacia antimicrobiana *in vivo*. Los parámetros PK/PD correlacionan la exposición a los antimicrobianos con la actividad antimicrobiana. La velocidad de destrucción por el antimicrobiano es dependiente del modo de acción del antimicrobiano y se determina por el tiempo necesario para destruir (dependiente del tiempo) o por el efecto de aumentar las concentraciones (dependiente de la concentración). En consecuencia, para predecir la eficacia terapéutica de los antimicrobianos con diversos mecanismos de acción pueden usarse diferentes parámetros PK/PD.

La "relación AUC/CMI" es un ejemplo de un parámetro PK/PD. AUC se define como el área bajo la curva de concentración en el sitio de la infección o plasma / tiempo de un agente antimicrobiano *in vivo* (en animal o ser humano). La relación AUC/CMI se determina dividiendo las AUC de 24 horas para un antimicrobiano individual por la CMI para el mismo antimicrobiano determinada *in vitro*. La actividad de los antimicrobianos con la destrucción dependiente de la dosis (tal como las fluoroquinolonas) se predice bien por la magnitud de la relación AUC/CMI.

La relación "C_{máx}:CMI" es otro parámetro PK:PD. Describe la concentración máxima del fármaco en el plasma o tejido respecto de la CMI. Las fluoroquinolonas y aminoglicósidos son ejemplos donde la C_{máx}:CMI pueden predecir la destrucción bacteriana *in vivo* donde se puede suprimir la resistencia.

"Tiempo por encima de CMI" (T>CMI) es otro parámetro PK/PD. Se expresa un porcentaje de un intervalo de administración en el que el nivel en el plasma o sitio de la infección excede la CMI. La actividad de los antimicrobianos con la destrucción dependiente del tiempo (tales como las betalactamas u oxazolidinonas) es bien predecible por la magnitud de la relación T>CMI.

El término "intervalo de administración" se refiere al tiempo entre las administraciones de las dos dosis secuenciales de un producto farmacéutico durante los regímenes de administración múltiple. Por ejemplo, en el caso de la ciprofloxacina, que se administra dos veces al día (régimen tradicional de 400 mg dos veces por día) y la levofloxacina, que se administra una vez al día (500 mg o 750 mg cada día), los intervalos de administración son 12 horas y 24 horas, respectivamente.

Como se usa en la presente descripción, el "período máximo" de una concentración del producto farmacéutico *in vivo* se define como el tiempo del intervalo de administración farmacéutica cuando la concentración farmacéutica es no menos del 50 % de su máxima concentración en plasma o en el sitio de la infección. En algunas realizaciones, "período máximo" se usa para describir un intervalo de administración antimicrobiana.

La "dosis respirable suministrada" es la cantidad de fármaco inhalado durante la fase inspiratoria del simulador de la respiración que es igual a o menos de 5 micras usando un simulador programado para el patrón del Estándar Europeo de 15 respiraciones por minuto, con una relación inspiración a espiración de 1:1.

Ventajas del suministro de la Fluoroquinolona inhalada en aerosol y de uso tópico (No Oral)

La velocidad de destrucción del antibiótico es dependiente del modo de acción del antibiótico y se determina por el tiempo necesario para que el antibiótico destruya (dependiente del tiempo) o el efecto de aumentar la concentración de antibiótico (dependiente de la concentración). Las fluoroquinolonas se caracterizan por la actividad de destrucción dependiente de la concentración donde un efecto terapéutico requiere una alta concentración máxima local por encima de las CMI del patógeno infectante.

La eficacia de la fluoroquinolona en los seres humanos, animales y modelos de infección *in vitro* se vincula a la relación AUC:CMI y la relación C_{máx}:CMI. Dada la incertidumbre anterior de la farmacocinética de las fluoroquinolonas en el tejido pulmonar, se han realizado una serie de estudios *in vitro* para determinar si altas dosis de la levofloxacina con vidas medias muy cortas (como se predice a partir de un modelo PK de rata y de ser humano) dan como resultado la destrucción bacteriana superior a la observada en condiciones con tiempos de residencia más prolongados. En estos estudios, las concentraciones de la Levofloxacina que fueron 0,018 veces - 1024 veces la CMI se evaluaron en una curva estándar de destrucción y en el ensayo de fibra hueca *in vitro*. En ambos estudios, altas concentraciones de la levofloxacina fueron rápidamente bactericidas y alcanzaron su máximo nivel de destrucción en 10-20 minutos. Este nivel de destrucción se mantuvo si la levofloxacina se mantuvo a ese nivel o dando una vida media de 10 minutos. En consecuencia, las dosis altas y el suministro rápido de la levofloxacina especialmente formulada, tal como una dosis de la Levofloxacina respirable depositada en aerosol de 20-50 mg suministrada rápidamente (que producirá concentraciones ELF iniciales de 800 - 1600 µg/ml) es rápidamente bactericida para los organismos susceptibles y organismos resistentes con las CMI hasta 32 µg/ml. Se espera que estas propiedades antimicrobianas únicas de las fluoroquinolonas además se trasladarán a las administraciones tópicas, que incluyen, pero sin limitación, las infecciones o la profilaxis de la piel, ojo, oído, recto, vagina o tracto urinario.

Para medir la eficacia de diferentes modelos de administración, las formulaciones de la levofloxacina que mejoran la conformación de AUC se prepararon y midieron *in vivo* en comparación con las formulaciones de la Levofloxacina que no mejoran la conformación de AUC y otros antibióticos usando tanto la PK de rata como la eficacia de ratón después de la administración intratraqueal. Como se demostró previamente en un sistema de rata, hubo diferencias entre los fármacos en la farmacocinética pulmonar, con algunos agentes que muestran AUC inferiores (por ejemplo, la levofloxacina), mientras que otros como gemifloxacina o tobramicina muestran mayores concentraciones resultantes del aclaramiento pulmonar más lento. Los estudios en un modelo de infección de ratón de dosis única con dosis de aerosol han mostrado una eficacia variable entre los compuestos. Refiriéndose a la Figura 1, el análisis de los datos dividiendo la dosis en aerosol por la CMI indicó una fuerte correlación entre la relación dosis:CMI y la actividad bactericida ($R^2 = 0,89$). Estos datos sugieren que la actividad bactericida inicial en este modelo no se afecta por el aclaramiento pulmonar del fármaco. Aunque los aclaramientos pulmonares no se han estimado en ratones, puede esperarse que la transformación de la dosis para AUC usando los valores escalados de rata degrade la relación. Por lo tanto, estos datos sugieren que la optimización del perfil de AUC de la Levofloxacina puede no ser necesario para que la levofloxacina en aerosol sea efectiva en el tratamiento de las infecciones de las vías respiratorias y pulmonares.

Investigaciones recientes con las fluoroquinolonas dieron como resultado el desarrollo del concepto de una "ventana de selección de mutante" (MSW) para la resistencia bacteriana que surge durante la terapia. Este concepto ayuda a identificar un intervalo de concentración donde los mutantes se seleccionan más frecuentemente *in vitro* e *in vivo*. El límite inferior de la ventana es la concentración más baja que destruye la mayoría de células que infectan (aproximadamente por la CMI), mientras que el límite superior de la ventana es la concentración de fármaco que bloquea el crecimiento de al menos el mutante susceptible de la primera etapa. Por encima de la concentración del límite superior el crecimiento de las bacterias que infectan requiere la presencia de al menos dos mutaciones de resistencia. Este límite superior designa la concentración preventiva de mutante (MPC). Los valores de MPC varían dependiendo de las bacterias y las fluoroquinolonas, y pueden ser de 10 a 20 veces más elevados que la CMI. Varios estudios de modelaje han demostrado que cuanto más supere la concentración del fármaco la MPC en el sitio de la infección, el tratamiento será más efectivo para prevenir el desarrollo de la resistencia. Por el contrario, cuanto más permanezca la concentración de antibiótico dentro de la MSW, mayor es la probabilidad de seleccionar mutantes resistentes. Es importante destacar que el régimen de administración actualmente aprobado para la levofloxacina oral o intravenosa ha colocado este antibiótico en la MSW para más del 20 % del intervalo de administración de patógenos tales como *P. aeruginosa* (*Pa*) y *S. pneumonia*. En consecuencia, se informó un alto nivel de resistencia a la levofloxacina para ambos agentes patógenos.

Por lo tanto, en una realización descrita pero no reivindicada, se aumenta la concentración de la Levofloxacina en el sitio de la infección suministrándola directamente al pulmón usando la terapia de inhalación, lo que disminuye de ese modo la cantidad de tiempo que la Levofloxacina está en la MSW. Un enfoque terapéutico de ese tipo logra una cobertura más amplia de los patógenos (que incluyen cepas resistentes a la levofloxacina), impide además el desarrollo de resistencia, y da como resultado trayectos más cortos de la terapia con la levofloxacina.

Farmacocinética de las fluoroquinolonas administradas por vía oral en Poblaciones sin CF y con CF

Concentraciones de esputo en pacientes con CF

La farmacocinética de la ciprofloxacina ha sido ampliamente estudiada en pacientes con CF después de la administración oral. De hecho, se ha demostrado que el perfil PK sérico de la ciprofloxacina es muy similar en pacientes con CF respecto de los voluntarios sanos (Figura 2).

Además, el perfil de esputo frente al tiempo de la ciprofloxacina es muy similar a su perfil en suero después de la administración oral (Figura 3). Después de una dosis oral de 750 mg, se lograron concentraciones máximas de ~4,2 µg/ml y ~3,5 µg/ml para suero y esputo, respectivamente. Las concentraciones de fármaco en suero y esputo alcanzaron un máximo a las 1,5 y 4 horas, respectivamente. Mientras la cantidad total de la ciprofloxacina en el esputo es alta respecto de las concentraciones en el suero, las concentraciones absolutas son bajas en relación con las CMI de los organismos objetivo, tal como *Pa*. Este dato es coherente con un resultado clínico pobre debido al desarrollo de resistencia a estas bajas concentraciones de fármacos.

Aunque los datos de la farmacocinética intrapulmonar de la Levofloxacina en la fibrosis quística no están disponibles, se publicaron datos sobre la ofloxacina estrechamente relacionada en los años 1980 y 1990. La ofloxacina se compone de una mezcla racémica de dextro (microbiológicamente inactiva) y levo-rotatorio (levofloxacina microbiológicamente activa). Los estudios demostraron que las propiedades farmacocinéticas de los 2 componentes son similares. En estudios comparativos con la ciprofloxacina, la ofloxacina tuvo una vida media más larga y una mayor distribución en el esputo (79 % frente al 21 %) que la ciprofloxacina.

Fluido del revestimiento epitelial pulmonar

El más reciente énfasis en el uso y desarrollo de las fluoroquinolonas en infecciones grampositivas extrahospitalarias se ha centrado en los estudios farmacocinéticos intrapulmonares en el fluido del revestimiento epitelial pulmonar (ELF). Aunque la relevancia de la distribución del fármaco en este fluido no está clara en el contexto de la fibrosis quística, se puede obtener una nueva perspectiva sobre la farmacología del fármaco a partir de estos estudios. La levofloxacina

penetra bien en los tejidos del pulmón. Las concentraciones en los tejidos del pulmón son generalmente de 2 a 5 veces mayores que las concentraciones plasmáticas. Varios estudios recientes (que se resumen en la Tabla 1) demostraron que las concentraciones de la Levofloxacin en el ELF de sujetos sanos después de una dosis oral de 750 mg alcanzan una concentración máxima alrededor de 20 µg/mL. Se esperan concentraciones máximas similares en el esputo de pacientes con CF después de la administración oral o IV de 750 mg de la Levofloxacin. Por el contrario, la ciprofloxacina penetra los tejidos del pulmón mucho menos eficientemente que la levofloxacin. Basado en los estudios de la ventana de selección de mutante (MSW), estos niveles del fármaco de la fluoroquinolona en el ELF son insuficientes para lograr la concentración requerida para la prevención del mutante que es de 10 a 20 veces la CMI para el organismo infectante.

10 Tabla 1. Concentración de la levofloxacin en el Fluido del Revestimiento Epitelial en el Hombre.

Fármaco	Dosis	Ruta	Concentración del fármaco ELF (µg/ml)						
			0,5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h
Levofloxacin	500 mg	IV				11		2,5	1,24
Levofloxacin	500 mg	oral				9,9		6,5	0,7
Levofloxacin	500 mg	oral				9,94		6,46	0,7
Levofloxacin	500 mg	oral	4,74	10,8	9	10,9	9,6		
Levofloxacin	750 mg	IV				12,94		6,04	1,73
Levofloxacin	750 mg	oral				22,1		9,2	1,5
Levofloxacin	750 mg	oral				22,13		9,19	1,55
ciprofloxacina	500 mg	oral				1,9		0,4	

Métodos de Tratamiento o Profilaxis

Se describe, pero no se reivindica, un método para tratar una infección microbiana en un animal, que incluye específicamente un mamífero, tratando un animal que sufre una infección de este tipo con un agente antimicrobiano de la fluoroquinolona. En algunas realizaciones, los antimicrobianos de la fluoroquinolona pueden administrarse después de la formación e inhalación de un aerosol. Por lo tanto, este método de tratamiento es especialmente adecuado para el tratamiento de infecciones pulmonares que implican cepas microbianas que son difíciles de tratar con un agente antimicrobiano suministrado de forma parenteral debido a la necesidad de niveles altos de dosis parenterales (que pueden causar efectos secundarios no deseados), o debido a la falta de agentes antimicrobianos clínicamente eficaces. En una realización de este tipo, este método se puede usar para administrar un antimicrobiano de la fluoroquinolona directamente al sitio de infección. Un método de este tipo puede reducir la exposición sistémica y maximiza la cantidad de agente antimicrobiano en el sitio de la infección microbiana. Este método además es adecuado para tratar infecciones que implican los microbios que son susceptibles a los agentes antimicrobianos de la fluoroquinolona como una forma de reducir la frecuencia de la selección de los microbios resistentes. Este método es adecuado además para tratar las infecciones que implican los microbios que son de cualquier otra forma resistentes a los antimicrobianos de la fluoroquinolona como una manera de aumentar la cantidad de antimicrobiano en el sitio de la infección microbiana. Un sujeto puede identificarse como infectado con bacterias que son capaces de desarrollar resistencia mediante el diagnóstico del sujeto que tiene síntomas que son característicos de una infección bacteriana con una especie de bacteria que se sabe que tiene cepas resistentes o con una bacteria que es un miembro del grupo que se sabe que tienen cepas resistentes. Alternativamente, las bacterias pueden cultivarse e identificarse como una especie que se sabe que tiene cepas resistentes o una bacteria que es un miembro del grupo que se sabe que tiene cepas resistentes.

En algunas realizaciones, el agente antimicrobiano de la fluoroquinolona en aerosol se administra a un nivel suficiente para vencer la aparición de la resistencia en bacterias o aumentar la eficiencia de eliminación de manera que la resistencia no tiene la oportunidad de desarrollarse.

En algunas realizaciones, la terapia con la fluoroquinolona en aerosol puede administrarse como un tratamiento o profilaxis en combinación o alternando la secuencia terapéutica con otros antibióticos en aerosol, orales o parenterales. A modo de ejemplo no limitante, esto puede incluir tobramicina en aerosol y/u otro aminoglucósido, aztreonam en aerosol y/u otro beta o mono-bactamo, ciprofloxacina en aerosol y/u otras fluoroquinolonas, azitromicina

en aerosol y/u otros macrólidos o cetólidos, tetraciclina y/u otras tetraciclinas, quinupristina y/u otras estreptograminas, linezolidina y/u otras oxazolidinonas, vancomicina y/u otros glicopéptidos, y cloranfenicol y/u otros fenicoles, y colisitina y/u otras polimixinas.

Composiciones farmacéuticas

5 Para los fines del método descrito en la presente descripción, un agente antimicrobiano de la fluoroquinolona puede administrarse usando un inhalador. En algunas realizaciones, un agente antimicrobiano de la fluoroquinolona descrito en la presente descripción se produce como una composición farmacéutica adecuada para la formación de aerosoles, buen sabor, estabilidad en almacenamiento y seguridad y tolerancia del paciente.

10 En algunas realizaciones, el contenido de la isoforma de la fluoroquinolona fabricada se puede optimizar para la tolerancia, actividad antimicrobiana y estabilidad.

Administración

15 Los antimicrobianos de la fluoroquinolona descritos en la presente memoria pueden administrarse en una dosis terapéuticamente efectiva, por ejemplo, una dosis suficiente para proporcionar tratamiento para los estados patológicos descritos anteriormente. Mientras los niveles de dosis óptimos de los seres humanos aún no se han determinado para la administración en aerosol, generalmente, una dosis de aerosol diaria de la levofloxacina (y para la mayoría de los agentes antimicrobianos de la fluoroquinolona descritos en la presente memoria) es de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 0,20 a 5,0 mg/kg de peso corporal, y lo más preferiblemente aproximadamente 0,4 a 4,0 mg/kg de peso corporal. Así, para la administración a una persona de 70 kg, el intervalo de administración sería de aproximadamente de 7,0 a 700,0 mg por día, preferiblemente aproximadamente 14,0 a 350,0 mg por día, y lo más preferiblemente aproximadamente 28,0 a 280,0 mg por día. La cantidad de compuesto activo administrado, por supuesto, será dependiente del estado de la enfermedad y el sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección, la forma y calendario de administración, y la opinión del médico que prescribe; por ejemplo, un intervalo de dosis probable para la administración en aerosol de la levofloxacina sería de aproximadamente 20 a 400 mg por día.

25 La administración de los agentes antimicrobianos de la fluoroquinolona descritos en la presente memoria o las sales farmacéuticamente aceptables de éstos puede ser a través de cualquiera de los modos aceptados de administración para agentes que sirven utilidades similares, que incluyen, pero sin limitación, inhalación de aerosol.

30 Las composiciones farmacéuticamente aceptables incluyen formas farmacéuticas sólidas y en aerosol. Preferentemente, las composiciones se proporcionan en formas farmacéuticas unitarias adecuadas para la administración única de una dosis precisa. Las formas farmacéuticas unitarias además pueden montarse y envasarse juntas para proporcionar a un paciente un suministro semanal o mensual y además pueden incorporarse otros compuestos tales como solución salina, agentes de enmascaramiento del sabor, excipientes farmacéuticos, y otros ingredientes activos o vehículos.

35 El agente antimicrobiano de la fluoroquinolona puede administrarse solo o más típicamente en combinación con un vehículo farmacéutico convencional, excipiente o similares (por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, croscarmelosa de sodio, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, lactosa, sacarosa, glucosa y similares). Si se desea, la composición farmacéutica además puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes solubilizantes, agentes tamponantes del pH y similares (por ejemplo, acetato de sodio, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y similares). Generalmente, dependiendo del modo de administración pretendido, la formulación farmacéutica contendrá aproximadamente 0,005 % a 95 %, preferiblemente aproximadamente 0,5 % a 50 % en peso de un compuesto de la invención. Los métodos concretos para preparar esas formas farmacéuticas se conocen, o resultarán evidentes, para aquellos con experiencia en esta técnica; por ejemplo, ver Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

45 Las composiciones líquidas farmacéuticamente administrables pueden prepararse, por ejemplo, al disolver, dispersar, etc. un compuesto activo como se definió anteriormente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un vehículo (por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol, o similares) para formar una solución o suspensión. Las soluciones que están en aerosol pueden prepararse en formas convencionales, como soluciones líquidas o suspensiones, como emulsiones, o en formas sólidas adecuadas para la disolución o suspensión en el líquido antes de la producción en aerosol e inhalación. El porcentaje de compuesto activo contenido en tales composiciones de aerosoles es altamente dependiente de la naturaleza específica de este, así como de la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto. Sin embargo, pueden emplearse porcentajes de ingrediente activo de 0,01 % a 90 % en solución, y serán mayores si la composición es un sólido que posteriormente se diluirá a los porcentajes anteriores. En algunas realizaciones, la composición comprenderá 1,0 % - 50,0 % del agente activo en solución.

Las formulaciones de fluoroquinolona pueden separarse en dos grupos; los de formulación simple y formulaciones complejas que proporcionan propiedades de enmascaramiento del sabor, mejora de la tolerancia y/o una formulación

que mejora el perfil de AUC. Las formulaciones simples pueden separarse adicionalmente en tres grupos. 1. Las formulaciones simples pueden incluir formulaciones líquidas a base de agua para la nebulización. Como ejemplo no limitante, las formulaciones líquidas a base de agua pueden consistir en la fluoroquinolona sola o con excipientes solubles en agua no encapsulados. 2. Las formulaciones simples además pueden incluir las formulaciones líquidas a base de compuestos orgánicos para la nebulización. Como ejemplo no limitante, las formulaciones líquidas a base de compuestos orgánicos pueden consistir en fluoroquinolona o excipientes solubles orgánicos no encapsulados. Las formulaciones complejas pueden separarse además en cinco grupos. 1. Las formulaciones complejas pueden incluir formulaciones líquidas a base de agua para la nebulización. Como ejemplo no limitante, las formulaciones complejas líquidas a base de agua pueden consistir en la fluoroquinolona encapsulada o complejada con excipientes solubles en agua tales como lípidos, liposomas, ciclodextrinas, microencapsulaciones, y emulsiones. 2. Las formulaciones complejas además pueden incluir formulaciones líquidas a base de compuestos orgánicos para la nebulización. Como ejemplo no limitante, las formulaciones complejas líquidas a base de compuestos orgánicos pueden consistir en la fluoroquinolona encapsulada o complejada con excipientes solubles en compuestos orgánicos tales como lípidos, microencapsulaciones, y emulsiones a base de agua en fase inversa. 3. Las formulaciones complejas además pueden incluir formulaciones líquidas a base de agua, de baja solubilidad para la nebulización. Como ejemplo no limitante, las formulaciones complejas líquidas a base de agua de baja solubilidad pueden consistir en la fluoroquinolona sola como una nanosuspensión estable, poco soluble en agua o en complejos con excipiente cocristal/coprecipitado, o mezclas con lípidos de baja solubilidad, tales como nanosuspensiones de lípidos. 4. Las formulaciones complejas además pueden incluir formulaciones líquidas a base de compuestos orgánicos de baja solubilidad, para la nebulización. Como ejemplo no limitante, las formulaciones complejas líquidas a base de compuestos orgánicos de baja solubilidad, pueden consistir en la fluoroquinolona sola como una nanosuspensión estable, poco soluble en orgánicos o en complejos de excipientes cocristal/coprecipitado, o mezclas con lípidos de baja solubilidad, tales como nanosuspensiones de lípidos.

Suministro en Aerosol

Los agentes antimicrobianos de la fluoroquinolona como se describe en la presente descripción, preferiblemente se administran directamente como un aerosol a un sitio de infección en el tracto respiratorio. En algunas realizaciones, el suministro en aerosol se usa para tratar una infección en los pulmones, tal como una infección pulmonar por *Pseudomonas*.

Existen varias tecnologías de dispositivos para suministrar productos en aerosol líquido o en polvo seco. Las formulaciones de polvo seco generalmente requieren menos tiempo para la administración del fármaco, aunque esfuerzos más largos y más costosos para el desarrollo. Por el contrario, las formulaciones líquidas han sufrido históricamente tiempos más largos de administración, aunque tienen la ventaja de esfuerzos más cortos y menos costosos para el desarrollo. Los agentes antimicrobianos de la fluoroquinolona descritos en la presente memoria varían en solubilidad, son generalmente estables y tienen una variedad de sabores. En realizaciones de este tipo, el antimicrobiano de fluoroquinolona levofloxacina es soluble en agua a pH neutro, es estable en solución acuosa y se ha limitado a ningún sabor.

En consecuencia, en una realización, una formulación particular del agente antimicrobiano de la fluoroquinolona descrito en la presente memoria se combina con un dispositivo de aerosolización particular para proporcionar un aerosol para inhalación que se optimiza para la deposición máxima del fármaco en un sitio de infección y tolerancia máxima. Los factores que pueden optimizarse incluyen la formulación en solución o de partículas sólidas, velocidad de suministro, y tamaño de partícula y distribución producida por el dispositivo de aerosolización.

Tamaño de partícula y distribución

Generalmente, las partículas inhaladas están sujetas a la deposición por uno de dos mecanismos: impactación, que generalmente predomina para las partículas más grandes, y sedimentación, que es frecuente para las partículas más pequeñas. La impactación se produce cuando el impulso de una partícula inhalada es suficientemente grande para que la partícula no siga la corriente de aire y se encuentre con una superficie fisiológica. Por el contrario, la sedimentación se produce principalmente en el pulmón profundo cuando partículas muy pequeñas que han viajado con la corriente de aire inhalada se encuentran con superficies fisiológicas como resultado de la difusión aleatoria dentro de la corriente de aire.

Para la administración pulmonar, las vías respiratorias superiores se evitan a favor de las vías respiratorias medias e inferiores. El suministro de fármacos pulmonares puede realizarse por inhalación de un aerosol a través de la boca y la garganta. Las partículas que tienen un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de más de aproximadamente 5 micras generalmente no alcanzan el pulmón; en cambio, tienden a impactar en la parte posterior de la garganta y son tragadas y posiblemente absorbidas por vía oral. Las partículas que tienen diámetros de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 micras son lo suficientemente pequeñas para alcanzar la región pulmonar superior y media (vías respiratorias de conducción), pero son demasiado grandes para alcanzar los alvéolos. Las partículas más pequeñas, es decir, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 micras, son capaces de alcanzar la región alveolar. Las partículas que tienen diámetros menores de aproximadamente 0,5 micras pueden depositarse además en la región alveolar por sedimentación, aunque las partículas muy pequeñas pueden exhalarse. Las medidas de tamaño de partícula pueden referirse como diámetro medio volumétrico (VMD), diámetro medio de masa (MMD), o

MMAD. Estas mediciones pueden hacerse por impactación (MMD y MMAD) o por láser (VMD). Para partículas líquidas, VMD, MMD y MMAD pueden ser las mismas si se mantienen las condiciones ambientales, por ejemplo, humedad estándar. Sin embargo, si la humedad no se mantiene, las determinaciones por MMD y MMAD serán más pequeñas que por VMD debido a la deshidratación durante las mediciones del impactador. Para los propósitos de esta descripción, las mediciones por VMD, MMD y MMAD se consideran que son en condiciones estándar, de manera que las descripciones por VMD, MMD y MMAD serán comparables. Similarmente, las determinaciones del tamaño de las partículas de polvo seco por MMD y MMAD se consideran además comparables.

En algunas realizaciones, el tamaño de partícula del aerosol se optimiza para maximizar la deposición de agente antimicrobiano de la fluoroquinolona en el sitio de la infección y para maximizar la tolerancia. El tamaño de partícula del aerosol puede expresarse en términos del diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD). Las partículas grandes (por ejemplo, MMAD >5 µm) pueden depositarse en las vías respiratorias superiores debido a que son demasiado grandes para navegar por la curvatura de las vías respiratorias superiores. Las partículas pequeñas (por ejemplo, MMAD < 2µm) pueden depositarse mal en las vías respiratorias inferiores y así se convierten en exhalado, proporcionando la oportunidad adicional para la deposición en las vías respiratorias superiores. Por lo tanto, la intolerancia (por ejemplo, tos y broncoespasmo) puede producirse a partir de la deposición en las vías respiratorias superiores tanto por la impactación de la inhalación de las partículas grandes como por la sedimentación de las partículas pequeñas durante la inhalación y la espiración repetidas. Por lo tanto, en una realización, se usa un tamaño óptimo de partículas (por ejemplo, MMAD = 2-5 µm) para maximizar la deposición en un sitio de infección del pulmón medio y para reducir al mínimo la intolerancia asociada con la deposición en la vía respiratoria superior. Además, la generación de un tamaño de partícula definido con la desviación estándar geométrica limitada (GSD) puede optimizar la deposición y la tolerancia. La GSD estrecha limita el número de partículas fuera del intervalo de tamaño del MMAD deseado. En una realización, se proporciona un aerosol que contiene uno o más compuestos descritos en la presente memoria que tiene un MMAD de aproximadamente 2 micras a aproximadamente 5 micras con una GSD de menos de o igual a aproximadamente 2,5 micras. En otra realización, se proporciona un aerosol que tiene un MMAD de aproximadamente 2,8 micras a aproximadamente 4,3 micras con una GSD menos de o igual a 2 micras. En otra realización, se proporciona un aerosol que tiene un MMAD de aproximadamente 2,5 micras a aproximadamente 4,5 micras con una GSD menor de o igual a 1,8 micras.

Los agentes antimicrobianos de la fluoroquinolona descritos en la presente memoria destinados al suministro respiratorio (para la distribución sistémica o local) pueden administrarse como formulaciones acuosas, como suspensiones o soluciones en los propelentes de hidrocarburos halogenados. Las formulaciones acuosas pueden aerosolizar mediante nebulizadores líquidos que emplean la atomización hidráulica o ultrasónica. Puede obtenerse un tamaño y distribución de partículas deseados mediante la elección de un dispositivo adecuado.

Nebulizador líquido

En una realización, se selecciona un nebulizador sobre la base de permitir la formación de un aerosol de un agente antimicrobiano de la fluoroquinolona descrito en la presente memoria que tiene un MMAD predominantemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 5 micras. En una realización, la cantidad suministrada del agente antimicrobiano de la fluoroquinolona proporciona un efecto terapéutico para las infecciones respiratorias.

Anteriormente, dos tipos de nebulizadores de chorro y ultrasónico, han demostrado ser capaces de producir y suministrar partículas de aerosol que tienen tamaños entre 2 y 4 µm. Estos tamaños de partícula han mostrado ser óptimos para el tratamiento de la infección bacteriana pulmonar causada por bacterias gramnegativas tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, género *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylooxidans*, y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos. Sin embargo, a menos que se use una solución especialmente formulada, estos nebulizadores típicamente necesitan grandes volúmenes para administrar una cantidad suficiente de fármaco para obtener un efecto terapéutico. Un nebulizador de chorro utiliza la ruptura por la presión del aire de una solución acuosa en gotitas de aerosol. Un nebulizador ultrasónico utiliza el cizallamiento de la solución acuosa mediante un cristal piezoeléctrico. Típicamente, sin embargo, los nebulizadores de chorro son sólo aproximadamente un 10 % eficientes en las afecciones clínicas, mientras que el nebulizador ultrasónico es sólo aproximadamente un 5 % eficiente. La cantidad de producto farmacéutico depositado y absorbido en los pulmones es, por lo tanto, una fracción del 10 % a pesar de las grandes cantidades del fármaco colocado en el nebulizador.

En consecuencia, en una realización, se usa un nebulizador de malla vibratoria para suministrar un aerosol del agente antimicrobiano de la fluoroquinolona descrito en la presente memoria. Un nebulizador de malla vibratoria consiste en un recipiente de almacenamiento líquido en contacto fluido con un diafragma y válvulas de inhalación y exhalación. En una realización, se coloca aproximadamente 1 a aproximadamente 5 ml del agente antimicrobiano de la fluoroquinolona en el recipiente de almacenamiento y el generador de aerosol se dedica a la producción de aerosol atomizado de tamaños de partículas selectivamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 µm.

Como ejemplo no limitante, un agente antimicrobiano de la fluoroquinolona descrito en la presente descripción se coloca en un inhalador de nebulización líquida y se prepara en administraciones para suministrar de aproximadamente 7 a aproximadamente 700 mg a partir de una solución de administración de aproximadamente 1 a aproximadamente

5 ml, preferiblemente de aproximadamente 14 a aproximadamente 350 mg en aproximadamente 1 a aproximadamente 5 ml y lo más preferiblemente de aproximadamente 28 a aproximadamente 280 mg en aproximadamente 1 a aproximadamente 5 ml con tamaños de partículas MMAD entre aproximadamente 2 a aproximadamente 5 µm.

5 Como ejemplo no limitante, un antimicrobiano de la fluoroquinolona nebulizado puede administrarse en la dosis respirable suministrada descrita en menos de aproximadamente 20 min, preferiblemente menos de aproximadamente 10 min, con mayor preferencia menos de aproximadamente 7 min, con mayor preferencia menos de aproximadamente 5 min, con mayor preferencia menos de aproximadamente 3 min, y en algunos casos lo más preferiblemente menos de aproximadamente 2 min.

10 Como ejemplo no limitante, en otras circunstancias, un antimicrobiano de la fluoroquinolona nebulizada puede lograr una mejor tolerancia y/o exhibir una característica que mejora el perfil de AUC cuando se administra durante períodos más largos de tiempo. En estas condiciones, la dosis respirable suministrada descrita en más de aproximadamente 2 min, preferiblemente más de aproximadamente 3 min, con mayor preferencia más de aproximadamente 5 min, con mayor preferencia más de aproximadamente 7 min, con mayor preferencia más de aproximadamente 10 min, y en algunos casos lo más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 min.

15 Para los sistemas acuosos y otros líquidos no presurizados, una variedad de nebulizadores (que incluyen nebulizadores de pequeño volumen) están disponibles para aerosolizar las formulaciones. Los nebulizadores accionados por compresor incorporan tecnología de chorro y usan aire comprimido para generar el aerosol líquido. Tales dispositivos están disponibles comercialmente de, por ejemplo, Healthdyne Technologies, Inc.; Invacare, Inc.;
 20 Mountain Medical Equipment, Inc.; Pari Respiratory, Inc.; Mada Medical, Inc.; Puritan-Bennet; Schuco, Inc., DeVilbiss Health Care, Inc.; y Hospitak, Inc. Los nebulizadores ultrasónicos dependen de la energía mecánica en forma de vibración de un cristal piezoeléctrico para generar gotitas respirables de líquido y están disponibles comercialmente de, por ejemplo, Omron Healthcare, Inc. y DeVilbiss Health Care, Inc. Los nebulizadores de malla vibratoria dependen de pulsos piezoeléctricos o mecánicos para generar gotitas de líquido respirables. Otros ejemplos de nebulizadores para usar con agentes antimicrobianos de la fluoroquinolona descritos en la presente descripción se describen en las patentes de los Estados Unidos núms. 4,268,460; 4,253,468; 4,046,146; 3,826,255; 4,649,911; 4,510,929; 4,624,251; 5,164,740; 5,586,550; 5,758,637; 6,644,304; 6,338,443; 5,906,202; 5,934,272; 5,960,792; 5,971,951; 6,070,575; 6,192,876; 6,230,706; 6,349,719; 6,367,470; 6,543,442; 6,584,971; 6,601,581; 4,263,907; 5,709,202; 5,823,179; 6,192,876; 6,196,219; 6,644,304; 5,549,102; 6,083,922; 6,161,536; 6,264,922; 6,557,549; y 6,612,303. Los ejemplos comerciales de nebulizadores que pueden usarse con los agentes antimicrobianos de la fluoroquinolona descritos en la presente descripción incluyen Respirgard II®, Aeroneb®, Aeroneb® Pro, y Aeroneb® Go producidos por Aerogen; AERx® y AERx Essence™ producidos por Aradigm; Porta-Neb®, Freeway Freedom™, Sidestream, Ventstream y I-neb producidos por Respiroics, Inc.; y PARI LC-Plus®, PARI LC-Star®, y e-Flow™ producidos por PARI, GmbH.

En ciertas realizaciones, la solución de fármaco se forma antes del uso del nebulizador por parte de un paciente.

Formulaciones de solución/dispersión

35 Se describen además formulaciones acuosas que contienen partículas del fármaco solubles o nanopartículas. Para las formulaciones acuosas en aerosol, el fármaco puede presentarse a una concentración de aproximadamente 1 mg/mL hasta aproximadamente 700 mg/mL. Tales formulaciones proporcionan el suministro efectivo en las áreas apropiadas del pulmón, y la formulación de aerosol más concentrada tiene la ventaja adicional de permitir que se suministren grandes cantidades de la sustancia farmacológica al pulmón en un periodo de tiempo muy corto. En una
 40 realización, se optimiza una formulación para proporcionar una formulación bien tolerada. En consecuencia, en una realización, los agentes antimicrobianos de la fluoroquinolona descritos en la presente descripción se formulan para tener un buen sabor, pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7, osmolaridad de aproximadamente 200 a aproximadamente 1250 mOsmol/kg, concentración del ión permeante de aproximadamente 30 a aproximadamente 300 mM.

45 En una realización, la solución o diluyente usado para la preparación de formulaciones en aerosol tiene un intervalo de pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0. Este intervalo de pH mejora la tolerancia. Cuando el aerosol es ácido o básico, puede causar tos y broncoespasmo. Aunque el intervalo de seguridad de pH es relativo y algunos pacientes pueden tolerar un aerosol ligeramente ácido, otros experimentarán broncoespasmo. Cualquier aerosol con un pH de menos de aproximadamente 4,5 típicamente induce el broncoespasmo. Los aerosoles con un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5 causarán ocasionalmente el broncoespasmo. Cualquier aerosol que tenga un pH mayor que aproximadamente 7,5 puede tener baja tolerancia debido a que los tejidos corporales generalmente son incapaces de regular aerosoles alcalinos. Los aerosoles con pH controlado por debajo de aproximadamente 4,5 y por encima aproximadamente de 7,5 típicamente resultan en la irritación pulmonar acompañada por broncoespasmo severo, tos, y reacciones inflamatorias. Por estas
 55 razones, así como para la prevención del broncoespasmo, tos o inflamación en los pacientes, el pH óptimo para la formulación en aerosol se determinó que era de entre aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 7,0. Consecuentemente, en una realización, las formulaciones en aerosol para su uso como se describe en la presente memoria se ajustan a pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 7,5 con el intervalo de pH preferido de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5. El intervalo de pH más preferido es de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5.

Como ejemplo no limitante, las composiciones pueden incluir también un tampón o un agente de ajuste de pH, típicamente una sal preparada de un ácido o base orgánica. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, o tampones de ácido ftálico, Tris, trometamina, hidrócloruro, o fosfato.

- 5 Muchos pacientes han aumentado la sensibilidad a diversos sabores químicos, que incluyen las sensaciones amargas, salinas, dulces, metálicas. Para crear productos farmacológicos bien tolerados, como ejemplo no limitante, el enmascaramiento del sabor puede ir acompañado por la adición de excipientes enmascaradores del sabor, osmolaridad ajustada, y edulcorantes.

- 10 Muchos pacientes tienen una sensibilidad aumentada a diversos agentes químicos y tienen una alta incidencia de broncoespasmo, asma u otros incidentes de tos. Sus vías respiratorias son particularmente sensibles a las condiciones hipotónicas o hipertónicas y ácidas o alcalinas y a la presencia de cualquier ion permeable, tal como cloruro. Cualquier desequilibrio en estas condiciones o una presencia de cloruro por encima de cierto valor conduce a eventos broncoespásmicos o inflamatorios y/o tos que perjudican en gran medida el tratamiento con formulaciones inhalables. Estas dos condiciones impiden la administración eficiente de los medicamentos en aerosol en el espacio endobronquial.

- 15 En algunas realizaciones, la osmolaridad de las soluciones acuosas del agente antimicrobiano de la fluoroquinolona descritas en la presente descripción se ajustan proporcionando excipientes. En algunos casos, se necesita una cierta cantidad de cloruro u otro anión para el suministro exitoso y eficaz del antibiótico en aerosol. Sin embargo, se ha descubierto que tales cantidades son inferiores a las cantidades proporcionadas y típicamente usadas en los aerosoles de otros compuestos.

- 20 El broncoespasmo o reflejos de la tos no responden a la misma osmolaridad del diluyente para la aerosolización. Sin embargo, pueden controlarse y/o suprimirse suficientemente cuando la osmolaridad del diluyente está en un cierto intervalo. Una solución preferida para la aerosolización de compuestos terapéuticos que es segura y tolerada tiene una osmolaridad total de aproximadamente 200 a aproximadamente 1250 mOsmol/kg con un intervalo de concentración de cloruro de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM y preferiblemente de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. Esta osmolaridad controla el broncoespasmo, la concentración de cloruro, tal como un anión permeante, controla la tos. Debido a que ambos iones son permeantes, tanto los iones bromuro como yoduro pueden ser sustituidos por cloruro. Además, el bicarbonato puede sustituirse por el ion cloruro.

- 25 Como ejemplo no limitante, la formulación para un agente antimicrobiano de la fluoroquinolona en aerosol puede comprender de aproximadamente 7 a aproximadamente 700 mg, preferiblemente de aproximadamente 14 a aproximadamente 300 mg, o lo más preferiblemente de aproximadamente 28 a aproximadamente 280 mg de agente antimicrobiano de la fluoroquinolona por aproximadamente 1 a aproximadamente 5ml de solución salina diluida (entre 1/10 a 1/1 de solución salina normal). En consecuencia, la concentración de una solución de la levofloxacina puede ser mayor que aproximadamente 25 mg/ml, mayor que aproximadamente 35 mg/ml y preferiblemente, es mayor que aproximadamente 40 mg/ml, y es tan alta o mayor que 50 mg/ml.

- 30 En una realización, la osmolaridad de la solución es de aproximadamente 100 mOsmol/kg a aproximadamente 600 mOsmol/kg. En otras diversas realizaciones, la osmolaridad de la solución es de aproximadamente 2000 mOsmol/kg a aproximadamente 1250 mOsmol/kg; de aproximadamente 250 mOsmol/kg a aproximadamente 1050 mOsmol/kg; y de aproximadamente 350 mOsmol/kg a aproximadamente 750 mOsmol/kg.

- 35 En una realización, la concentración del ión permeante es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 400 mM. En otras diversas realizaciones, la concentración del ión permeante es de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 200 mM; y de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM.

Enmascaramiento del sabor, aromas, otros

- 45 Como ejemplo no limitante, las composiciones pueden incluir además agentes aromatizantes, agentes enmascaradores del sabor, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro de sodio), agentes antimicrobianos (por ejemplo, cloruro de benzalconio), edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos tales como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), ésteres de sorbitán, sacarina, ciclodextrinas, lípidos (por ejemplo, fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas), ácidos grasos y ésteres grasos, esteroides (por ejemplo, colesterol), y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA, zinc y otros cationes adecuados). Otros excipientes y/o aditivos farmacéuticos adecuados para su uso en las composiciones según la invención se enumeran en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams, (1995), y en "Physician's Desk Reference", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, Nueva Jersey (1998).

- 50 Como ejemplo no limitante, las clases de agentes enmascaradores del sabor para la formulación de fluoroquinolona incluyen la adición de aromatizantes, edulcorantes, and otras estrategias diversas de recubrimiento. Como ejemplos no limitantes, pueden elegirse de azúcares tales como sacarosa, dextrosa y lactosa), ácidos carboxílicos, sales, tales como magnesio y calcio (enmascaramiento del sabor de la fluoroquinolona a base de quelación o inespecífico), mentol, aminoácidos o derivados de aminoácidos tales como arginina, lisina, glutamato monosódico, y aceites aromatizantes

5 sintéticos y aromatizantes aromáticos y/o aceites naturales, extractos de plantas, hojas, flores, frutos, etc., y sus combinaciones. Estos pueden incluir aceites de canela, aceite de gaulteria, aceites de menta, aceite de clavo, aceite de laurel, aceite de anís, eucalipto, vainilla, aceite de cítricos, tales como aceite de limón, aceite de naranja, aceite de uva y pomelo, esencias de frutas que incluyen manzana, melocotón, pera, fresa, frambuesa, cereza, ciruela, piña, albaricoque, etc. Los edulcorantes adicionales incluyen sacarosa, dextrosa, aspartamo (Nutrasweet®), acesulfamo-K, sucralosa y sacarina, ácidos orgánicos (como ejemplo no limitante ácido cítrico y ácido aspártico). Tales sabores pueden presentarse en aproximadamente 0,05 a aproximadamente 4 porcentaje. Otro enfoque para mejorar o enmascarar el sabor desagradable de los fármacos inhalados es disminuir la solubilidad de los fármacos, por ejemplo, los medicamentos deben disolverse para interactuar con los receptores del sabor. Por lo tanto, suministrar las formas sólidas del fármaco puede evitar la respuesta del sabor y conseguir el efecto de sabor mejorado deseado. Los métodos no limitantes para disminuir la solubilidad de las fluoroquinolonas se describen en este documento, por ejemplo, las formas salinas de la levofloxacin o gemifloxacin con ácido xinafoico, ácido oleico, ácido esteárico y ácido pamoico. Los agentes adicionales co-precipitantes incluyen las dihidropiridinas y un polímero tal como la polivinilpirrolidona. Por otra parte, el enmascaramiento del sabor puede llevarse a cabo mediante la creación de vesículas lipofílicas. Los agentes de revestimiento o de encapsulación adicionales incluyen dextratos (como ejemplo no limitante, las ciclodextrinas pueden incluir, 2-hidroxi-propil-beta-ciclodextrina, 2-hidroxi-propil-gamma-ciclodextrina, beta-ciclodextrina aleatoriamente metilada, dimetil-alfa-ciclodextrina, dimetil-beta-ciclodextrina, maltosil-alfa-ciclodextrina, glucosil-1-alfa-ciclodextrina, glucosil-2-alfa-ciclodextrina, alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina, gamma-ciclodextrina y sulfobutiléter-beta-ciclodextrina), celulosas modificadas tales como etil celulosa, metilcelulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileo, azúcares y alcoholes de azúcares, ceras, lacas, acrílicos y sus mezclas. Como ejemplo no limitante, otros métodos para suministrar formas no disueltas de las fluoroquinolonas administran el fármaco solo o en formulación simple que no afecta la solubilidad, como una formulación de micronizado cristalino, en polvo seco, secada por aspersión, y de nanosuspensión. Sin embargo, un método alternativo es incluir agentes modificadores del sabor. Estos incluyen sustancias enmascaradoras del sabor que se mezclan con, revisten sobre o combinan de cualquier otra forma con el medicamento activo de la fluoroquinolona. Sin embargo, esta adición puede servir también para mejorar el sabor de otra adición del producto farmacológico elegido, por ejemplo, un agente mucolítico. Ejemplos no limitantes de tales sustancias incluyen los fosfolípidos ácidos, lisofosfolípido, polietilenglicol succinato de tocoferol y ácido embónico (pamoato). Muchos de estos agentes pueden usarse solos o en combinación con las fluoroquinolonas para la administración en aerosol.

30 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la manera de usar la invención anteriormente descrita, así como para exponer los mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos no sirven de ninguna manera para limitar el auténtico alcance de esta invención, sino que se presentan con fines ilustrativos.

35 Ejemplo de Referencia 1 - alta concentración local con corta duración de la exposición de la fluoroquinolona en aerosol.

La administración en aerosol de fluoroquinolonas tales como levofloxacin produce altas concentraciones en el fluido de revestimiento epitelial (ELF) de ratas y seres humanos. Sin embargo, se ha observado que esta dosis disminuye rápidamente después de la administración.

40 Para determinar si las altas concentraciones de la levofloxacin, de corta duración, pueden ser eficaces en el tratamiento de *P. aeruginosa* (PA), se realizaron estudios para medir su actividad bactericida sobre varias cepas de este organismo que se cultivaron en diferentes condiciones. Se eligieron basándose en lo que se conoce sobre las condiciones y el crecimiento de la PA en pulmón de fibrosis quística (CF) de pulmón. Se usaron cuatro cepas isogénicas de *P. aeruginosa* para estos experimentos (Tabla 2).

45 Tabla 2. Cepas de PA usadas en los experimentos de destrucción

Cepa	Genotipo	CMI de la levofloxacin (ug/ml)
PAM1020	Tipo silvestre	0,25
PAM1032	<i>nalB</i>	1

PAM1020 es la cepa de tipo silvestre original, PAM1032 contiene la mutación *nalB* que da como resultado una resistencia aumentada a la levofloxacin debido a la sobreexpresión de la bomba de salida MexAB-OprM que puede expulsar la levofloxacin fuera de las células.

50 Experimento 1. Actividad de la levofloxacin contra células en cultivo exponencial.

Métodos

Preparación del inóculo

Las cepas se cultivaron aeróbicamente durante la noche en caldo de Mueller-Hinton (MHB) a 35° C. A continuación, se diluyeron 1:1000 en 100 ml de MHB fresco y se cultivaron a $DO_{600} \sim 0,3$ hasta alcanzar la UFC/ml $\sim 10^8$. 10 ml de este cultivo se trasladó a frascos de 50 ml, que contenían cada uno 10 ml de caldo de MHB pre-calentado con concentraciones apropiadas de levofloxacina (2X, en comparación con las concentraciones de exposición).

Exposición

Todas las cepas se trataron durante 10 min., 20 min., 40 min., 80 min. y 160 minutos. Se usaron las siguientes concentraciones de la levofloxacina ($\mu\text{g/ml}$) para la exposición de PAM1020 y PAM1032: 16, 32, 64, 128 y 256. Todas las cepas se trataron a cada concentración durante 10 min., 20 min., 40 min., 80 min. y 160 minutos.

10 Determinación del número de células viables

En los intervalos de tiempo apropiados, 1 ml de cada cultivo expuesto se centrifugó durante 2 minutos, el sedimento se lavó dos veces con 1 ml de MHB libre de fármacos, y se re-suspendió en 1 ml de MHB. El número de células viables se enumeró colocando en placas muestras diluidas en serie (por duplicado) en placas MHB mediante el método de colocación de gotas en placas (10 μl). El límite de detección fue de 100 UFC/ml. La destrucción se presenta como el log de la reducción calculada respecto del recuento celular en el momento de inicio de la exposición a antibióticos. Se usa n las concentraciones relativas de antibiótico (respecto de la CMI de las cepas correspondientes). El número de células al inicio de la exposición a los antibióticos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Número de bacterias en el momento de la exposición bacteriana inicial.

Cepa	UFC/ml
PAM1020	4,03E+07
PAM1032	5,60E+07

20 Resultados

Para la cepa más susceptible, PAM1020, se logró la destrucción máxima (disminución 5,5 log en los recuentos de células viables) después de la incubación durante 10 minutos con la concentración de la levofloxacina correspondiente a la CMI de 256 veces (64 $\mu\text{g/ml}$ probado). 5-logs de destrucción ya se lograron con la concentración más baja probada (16 $\mu\text{g/ml}$ o CMI de 64 veces) (Figura 4A). Para la cepa PAM1032, siempre que se alcanzó la concentración por encima de 128 veces la CMI (128 $\mu\text{g/ml}$), 10 minutos de exposición fue suficiente para dar lugar a la máxima destrucción (más de 5 logs). En exposiciones de corta duración (10 o 20 minutos), se observó menos destrucción a concentraciones por debajo de 128 veces las CMI. En tiempos de exposición más largos, la concentración que corresponde a las CMI de 16 veces y superiores dieron como resultado una destrucción máxima similar (Figura 4B). Estos resultados indican que las células en fase logarítmica de *P. aeruginosa* se destruyen eficientemente después de exposiciones de corta duración a altas concentraciones de levofloxacina.

Experimento 2. Actividad de la levofloxacina contra células en fase estacionaria

Métodos

Preparación del inóculo

Las cepas se cultivaron aeróbicamente durante la noche en caldo de Mueller-Hinton (MHB) a 35° C (350 ml total). El medio agotado se obtuvo después de la centrifugación de los cultivos de una noche y se filtró el sobrenadante. Los cultivos se diluyeron a $DO=0,3$ en medio agotado. También se usó el mismo medio para preparar las concentraciones de antibiótico (el mismo que en el Experimento 1).

Exposición

Las concentraciones de antibiótico, el tiempo de exposición, como la determinación de los recuentos de células viables fueron los mismos que en el Experimento 1.

Resultados

El número de células al inicio de la exposición a antibióticos se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Números de bacterias en el momento de la exposición bacteriana inicial.

Cepa	UFC/ml
PAM1020	8,0E+08
PAM1032	8,50E+08

5 Para las células de PAM1020 en fase estacionaria, se observó la máxima destrucción en la concentración más baja que corresponde a 64 veces por encima de la CMI (16 µg/ml) y la duración más corta de la exposición, 10 minutos (Figura 5A). Sin embargo, PAM1032 demostró una evidente destrucción dependiente de la dosis con la destrucción máxima (4 logs) a concentraciones 64 de CMI en un tiempo de exposición corto. La ampliación de los tiempos de exposición no dio como resultado un mayor grado de destrucción. Sin embargo, se requirieron concentraciones más bajas de fármacos para lograr la misma destrucción en tiempos de exposición mayores (Figura 5B).

10 A continuación, se comparó el re-crecimiento del PAM1020 y PAM1032 después de 10 minutos o 160 minutos del tratamiento con diversas concentraciones de la levofloxacina. Después de los tratamientos correspondientes, las células se lavaron dos veces con medio libre de antibiótico. Se colocaron 150 µl de células en una placa de 96 pocillos y el crecimiento se monitorizó continuamente a A₆₆₀ usando SpectraMax (Molecular Devices). Los resultados se muestran en las Figuras 6A-6D.

15 Los resultados demuestran que se observó el re-crecimiento de ambas cepas en aproximadamente el mismo tiempo cuando las células se trataron con altas concentraciones de la levofloxacina durante 10 minutos o 160 minutos. Estos resultados apoyan aún más la eficiencia del tratamiento de corta duración con altas concentraciones de la levofloxacina.

Experimento 3. Actividad de la levofloxacina contra las células cultivadas en condiciones limitantes de oxígeno

Métodos

20 Preparación del inóculo

Los cultivos durante la noche se cultivaron aeróbicamente durante la noche en caldo Mueller-Hinton y se diluyeron después, 1: 10000 en MHB llenando los matraces de cultivo hasta la parte superior. Los cultivos se desarrollaron sin agitación a DO~0,3 a 37°C. En estas condiciones se requirió un promedio de ~20 horas para alcanzar una DO=0,3 en comparación con ~5 horas en condiciones de aireación (50 ml de medio en matraces de 250 ml, agitación vigorosa). Después del análisis, se constató que una DO=0,3 correspondió a una fase logarítmica tardía de crecimiento. Además de la aireación disminuida, la concentración de antibiótico, el tiempo de exposición, y la determinación de los recuentos de células viables fueron los mismos que en los Experimentos 1 y 2.

Resultados

El número de células al inicio de la exposición a los antibióticos se muestran en la Tabla 5.

30 Tabla 5. Número de bacterias en el momento de la exposición bacteriana inicial.

Cepa	UFC/ml
PAM1020	7,5E+07
PAM1032	8,5E+07

35 En el caso de PAM1020 cerca de la destrucción máxima (4 logs frente a 4,5 logs observados con aireación normal) se logró después de la exposición a la concentración más baja de la levofloxacina para la duración más corta de tiempo (10 minutos) (Figura 7A). En el caso de PAM1032 se observó la destrucción dependiente de la dosis durante 10 minutos o 20 minutos de exposición a la mayor destrucción observada a concentraciones correspondientes a 128 a 256 veces la CMI. Se observó una destrucción ligeramente más fuerte (menos de 1 log de diferencia) para los intervalos de exposición más largos (Figura 7B). Estos datos indican que bajo condiciones de limitación de oxígeno las células que se encuentran en la fase de crecimiento logarítmica tardía se destruyen eficientemente después de la exposición de corta duración con altas concentraciones de la levofloxacina.

40 Experimento 4. Actividad de la levofloxacina contra PAM1032 en esputo de CF.

Métodos

Las células de la cepa PAM1032 (MIC = 1 µg/ml) se cultivaron hasta DO=1 (fase exponencial tardía/estacionaria temprana del crecimiento) en MHB y después se concentraron 10 veces en MHB concentrado 10 veces. 10 µl de células se añadieron después a 90 µl de esputo o de agua en placas de 96 pocillos de fondo redondo, restaurándose el MHB a su concentración original. Las placas de cuantificación se pre-calentaron durante 5 minutos a 37°C y se añadieron diferentes concentraciones de la levofloxacina (512 µg/ml, 128 µg/ml, 32 µg/ml, 8 µg/ml, 2 µg/ml, y 0,5 µg/ml). En los momentos apropiados, 10 µl de cada cultivo de tratamiento se diluyó 100 veces en MHB para minimizar el arrastre de la levofloxacina. Los números de células viables se enumeraron mediante siembra de muestras diluidas en serie en placas de MHB por el método de colocación de gotas en placas (10 µl). El límite de detección fue de 10⁴ UFC/ml. La destrucción se presenta como el porcentaje del inóculo de partida que sobrevivió después del tratamiento con la levofloxacina. Los resultados se muestran en las Figuras 8A y 8B.

Resultados

Los resultados indican que mientras que el esputo afectó ligeramente al grado de destrucción por la levofloxacina, todavía se observó una destrucción rápida y extensa (hasta cinco órdenes de magnitud) por la levofloxacina en el esputo después del tratamiento de corta duración a altas concentraciones de antibiótico.

Experimento 4. Actividad de la levofloxacina contra las biopelículas de las colonias de PAM1032.

Métodos

Preparación de la biopelícula

Las biopelículas de colonias se cultivaron en filtros de membrana de policarbonato (diámetro, 25 mm; Poretics, Livermore, CA) que descansaban sobre placas de MHB. El cultivo durante la noche de PAM1032 se diluyó hasta DO=0,3, y después se diluyó 1:100 en MHB fresco. 5 µl de este cultivo se aplicó en un punto sobre el filtro de membrana. Las bacterias se incubaron a 37°C durante 48 horas (biopelículas maduras).

Exposición

Después del cultivo los filtros se colocaron en tubos que contenían 3 ml de solución salina o solución salina y levofloxacina a 128 µg/ml y 1024 µg/ml. Cada tubo se trató durante 10 minutos y 80 minutos. Aproximadamente 5 minutos antes de transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se agitaron con vórtice vigorosamente (A) o se sonicaron y se agitaron con vórtice (B) para separar las células. 1 ml de cada cultivo de exposición se centrifugó durante 2 minutos, el sedimento se lavó dos veces con 1 ml de MHB sin fármaco, y se resuspendió en 1 ml de MHB. El número de células viables se enumeró mediante siembra de muestras diluidas en serie (por duplicado) en placas de MHB mediante el método de colocación de gotas en placas (10 µl). Los resultados se muestran en la Figura 9.

Resultados

Los datos demuestran que se obtiene la destrucción máxima (~2 logs) después de 10 min con la concentración más baja de la levofloxacina probada (CMI 128 veces). Ninguna destrucción adicional se observó a la concentración más alta de levofloxacina. Estos datos indican que las biopelículas de las colonias son más resistentes a la destrucción en comparación con las células en fase logarítmica o estacionaria. Sin embargo, el máximo de actividad bactericida observado contra las biopelículas (99 % en estas condiciones) se logró después de 10 minutos de exposición a levofloxacina.

Experimento 5. Administración rápida en aerosol, a corto plazo simulada, administrando una exposición a fármaco a alta concentración en el modelo farmacodinámico in vitro.

Los modelos farmacodinámicos de infección in vitro permiten la exposición de un inóculo bacteriano en crecimiento a los cambios de concentraciones variables de fármaco como ocurriría in vivo. La fuerza de este enfoque es que el perfil de concentración en suero frente al tiempo de un fármaco en el hombre puede simularse en el laboratorio in vitro para determinar el perfil de exposición óptima (es decir, la dosis y el intervalo de administración) para un fármaco y patógeno objetivo.

El siguiente informe describe los experimentos diseñados para determinar la C_{máx} y AUC que proporcionarán efectos bactericidas máximos después de una dosis de aerosol de una fluoroquinolona.

Materiales y Métodos

Modelo farmacodinámico *in vitro* de infección

El modelo farmacodinámico in vitro consiste en un compartimiento central (compartimiento análogo de "suero") y periférico ("extravascular"). Los compartimientos periféricos consisten en unidades capilares artificiales (Unisyn, Hopkinton, MA) dispuestas en serie con el compartimiento central. Cada unidad capilar tiene un conjunto de pequeñas fibras semipermeables con una retención de tamaño molecular de cerca de 10.000 PM para permitir el paso de

nutrientes pero no de las bacterias. Todo el sistema está configurado en una incubadora de calor seco ajustada a 37°C.

Tanto el compartimiento central como el periférico se llenaron con caldo de Mueller-Hinton. Cada compartimiento periférico (unidad capilar y tubo) contuvieron cerca de 23 ml de medio de crecimiento.

5 Las bacterias se introdujeron en la cámara periférica del modelo y se dejaron crecer durante 2 horas antes de la primera "dosis" de fármaco. La dosis de los fármacos se administraron en el compartimiento central y se bombearon a las cámaras periféricas mediante una bomba peristáltica. Las concentraciones en el modelo se redujeron de acuerdo con una eliminación de primer orden (vida media) mediante la dilución del compartimiento central con medio libre de fármacos introducido mediante una bomba peristáltica adicional ajustada al aclaramiento deseado.

10 Se recogieron muestras (0,3 ml) de los compartimientos periféricos a diversos intervalos para la determinación de las concentraciones de bacterias y fármaco. Se recogieron muestras de los compartimientos periféricos y se ensayaron las concentraciones de fármaco por HPLC.

Cepas bacterianas de prueba

15 *Pseudomonas aeruginosa* PAM1032 y PAM1582. Las CMI de estas cepas para levofloxacin fueron 1,0 y 32 µg/ml, respectivamente.

Preparación del inóculo

20 Las cepas se cultivaron aeróbicamente durante la noche en caldo de Mueller-Hinton (MHB) a 35°C y se subcultivaron en MHB fresco y se reincubaron a 35°C durante 2 horas. Después de 2 horas, el inóculo se diluyó adicionalmente 1:1000 hasta una concentración final de aprox. $1,0 \times 10^6$ UFC/ml. De la dilución resultante, se inyectaron 2,3 ml en cada cámara periférica de los biorreactores de fibra hueca (Unisyn, Hopkinton, MA).

Farmacocinéticos

La vida media de la levofloxacin se ajustó para que fuera de 10 minutos para ser equivalente a la observada después de la administración de la levofloxacin en aerosol al compartimiento pulmonar del hombre. La $C_{m\acute{a}x}$ objetivo fue 1000 y 600 µg/ml en dos experimentos.

25 Resultados

Como se deseaba, el modelo mostró una vida media de la levofloxacin de 10 minutos y la $C_{m\acute{a}x}$ de 1000 µg/ml para el Experimento 5. En comparación, el Experimento 6 se modificó para conseguir la misma vida media que en el Experimento 5, pero con una $C_{m\acute{a}x}$ objetivo de 600 µg/ml.

30 Los efectos bactericidas de estos dos regímenes se correlacionaron con la $C_{m\acute{a}x}$. En el Experimento 5 con una $C_{m\acute{a}x}$ de 1000 µg/ml, se observó el máximo efecto bactericida como una reducción de 5 log en los recuentos bacterianos en 10 minutos con PAM1032 y una reducción de 4 log en los recuentos bacterianos en 20 minutos con PAM1582, y no se observó re-crecimiento durante las 2 horas restantes del experimento (Figura 10). Por el contrario, mientras que la $C_{m\acute{a}x}$ de 600 µg/ml usada en el Experimento 6 mantuvo la reducción de 5 log en los recuentos bacterianos para PAM1032, aunque tomando 30 minutos en lugar de los 10 min observados en el Experimento 1, sólo se observó una
35 reducción de 3 log en los recuentos bacterianos para PAM1582 después de 45 min (Figura 11). Además, PAM1582 exhibió un re-crecimiento inicial antes del fin de las 2 horas de la ventana experimental.

Conclusiones

40 La levofloxacin puede producir una reducción bacteriana de hasta el 99,9999 % con una $C_{m\acute{a}x}$ tanto de 600 como de 1000 µg/ml frente a una cepa con una CMI de 1 µg/ml. Sin embargo, la actividad bactericida máxima requiere 3X más tiempo a una $C_{m\acute{a}x}$ de 600 µg/ml. La levofloxacin puede producir además una reducción bacteriana de hasta el 99,99 % con una $C_{m\acute{a}x}$ de 600 µg/ml contra una cepa con una CMI de 32 µg/ml. Sin embargo, el tiempo para alcanzar el efecto máximo es de 45 minutos. Por el contrario, la levofloxacin puede producir hasta 99,999 % de la reducción bacteriana de esta cepa resistente con una $C_{m\acute{a}x}$ de 1000 µg/ml y el tiempo para un efecto máximo se reduce a 20 minutos. A partir de estos resultados, las exposiciones muy altas, pero de corta duración de la levofloxacin producen
45 una destrucción bacteriana rápida y sostenida, tanto en modelos de fibra hueca como de matraces. En conjunto, los resultados anteriores indican que el logro de una concentración inicial de 800 µg/ml de la levofloxacin u otra fluoroquinolona en esputo o ELF humano es suficiente para lograr que el antibiótico anterior repercuta sobre la población MIC99 como se representa por PAM1582 (CMI de 32 µg/ml).

Ejemplo 2 - Determinación de las propiedades de los aerosoles de las fluoroquinolonas antibacterianas.

50 Introducción

Objetivo. El propósito de estos estudios fue evaluar la capacidad de formular y administrar mediante nebulización una variedad de fluoroquinolonas para el tratamiento de infecciones bacterianas pulmonares mediante la administración

en aerosol. Las fluoroquinolonas evaluadas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Fluoroquinolonas Probadas.

Fluoroquinolona	Sp CMI ₉₀ (µg/mL)	MSSA CMI ₉₀ (µg/mL)	MRSA CMI ₉₀ (µg/mL)	Pa CMI ₉₀ (µg/mL)	estado de aprobación
Ciprofloxacina*	2	1	64	8	aprobado
Gemifloxacina*	0,06	0,06	2	8	aprobado
Levofloxacina	2	0,5	16	8	aprobado
Marbofloxacina*	2	2	ND	8	Veterinario
Gatifloxacina*	0,5	0,125	4	16	aprobado
Ofloxacina	2	1	>32	16	aprobado
Tosufloxacina*	0,5	0,125	>16	16	Japón
Lomefloxacina*	16	2	>32	32	aprobado
Moxifloxacina*	0,25	0,125	2	32	aprobado
Esparfloxacina*	0,5	0,125	16	32	retirado
Orbifloxacina*	2	2	ND	>32	Veterinario
Pefloxacina*	32	2	>32	>32	Europa
Trovafloxacina*	0,25	0,06	8	>32	retirado

*(descrito pero no reivindicado)

- 5 Estas fluoroquinolonas se eligieron basándose en su disponibilidad, estado de aprobación y propiedades antimicrobianas. Todas las fluoroquinolonas ensayadas están aprobadas en la actualidad en los Estados Unidos o se aprobaron pero después se retiraron debido a diversas reacciones adversas. Además, también se han evaluado varias fluoroquinolonas, que están en uso para aplicaciones veterinarias. Entre los patógenos bacterianos responsables de las infecciones del tracto respiratorio, *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) son los más resistentes al tratamiento con fluoroquinolonas. *Streptococcus pneumoniae* (Sp) es probablemente
- 10 el más importante patógeno responsable de infecciones de las vías respiratorias y numerosos informes demuestran altas tasas de resistencia a las fluoroquinolonas en estas bacterias. La CMI₉₀ para Pa se encuentra en el intervalo de 4 µg/ml a 32 µg/ml y de 2 µg/ml a >32 µg/ml para Pa y SARM, respectivamente. La ciprofloxacina, levofloxacina, gemifloxacina y gatifloxacina frente a gemifloxacina y moxifloxacina son los más potentes contra Pa y SARM, respectivamente.
- 15 La Tabla 7 contiene una lista de fluoroquinolonas adicionales (descritas pero no reivindicadas) para la evaluación potencial. Los compuestos más interesantes microbiológicamente de la lista son clinafloxacina y olamufloxacina, que se suspendió debido a las reacciones adversas, y sitofloxacina, que se encuentra en fase III de los ensayos clínicos.

Tabla 7. Fluoroquinolonas para la evaluación potencial.

Fluoroquinolona	Sp CMI ₉₀ (µg/mL)	Sa CMI ₉₀ (µg/mL)	MRSA CMI ₉₀ (µg/mL)	Pa CMI ₉₀ (µg/mL)	Estado de mercado
Clinafloxacina	0,06	0,06	2	4	descontinuado
Sitafloxacina	0,06	0,125	4	8	fase III
Olamufloxacina	0,06	1	2	16	descontinuado
Norfloxacina	16	1	>4	16	aprobado

Fluoroquinolona	Sp CMI ₉₀ (µg/mL)	Sa CMI ₉₀ (µg/mL)	MRSA CMI ₉₀ (µg/mL)	Pa CMI ₉₀ (µg/mL)	Estado de mercado
Prulifloxacin	1	0,25	32	16	Fase III
Danofloxacin	NA	0,125	NA	>16	Veterinario
Enrofloxacin	1	0,125	8	>16	Veterinario
Sarafloxacin	NA	0,25	>16	>16	Veterinario
Balofloxacin	0,5	0,25	8	32	Corea
Fleroxacin	8	1	>4	32	Europa
Difloxacin	2	0.5	NA	32	Veterinario
Rufloxacin	32	2	64	32	Europa, China
Enoxacin	16	1	>4	>32	retirado
Garenoxacin	0,06	0,06	8	>32	Fase III
Grepafloxacin	0,5	0,125	32	>32	retirado
Pazufloxacin	4	0,5	>16	>32	Japón

Las fluoroquinolonas en estas dos tablas representan un campo de opciones para un candidato de la fluoroquinolona en aerosol. Varias fluoroquinolonas potentes como DX-619 y DW-286, que están en las primeras etapas de desarrollo clínico, pueden ser de interés también para estudios futuros.

- 5 Las consideraciones físico-químicas específicas para la nebulización incluyen la solubilidad acuosa, la viscosidad y la tensión superficial. La solubilidad acuosa del fármaco debe ser ventajosamente suficiente para cumplir o exceder los requerimientos mínimos de administración. La concentración de carga de fármaco afecta además al tiempo de suministro. Los tiempos de suministro más largos pueden ser comercialmente inaceptables o conducir a una escasa conformidad del paciente. Aunque los tiempos de suministro más largos pueden, en efecto, modificar el perfil de AUC, como ejemplo no limitante, se ha descubierto que el dispositivo de PARI eFlow administra 4 ml de la levofloxacin acuosa en menos de 5 min. Además, usando un dispositivo eficiente de este tipo, la alta concentración de la levofloxacin puede ser capaz de suministrar las dosis efectivas descritas en la presente memoria en un marco de tiempo que permite además la administración rápida, los requerimientos de fármaco a concentración alta necesarios para la terapia óptima de la fluoroquinolona.
- 10
- 15 En el caso de las fluoroquinolonas, el pH afecta directamente a la solubilidad. En general, la solubilidad disminuye significativamente con el aumento de pH en el intervalo de 1,5 a 6,5. Debido a que el pH afecta además la tolerancia del paciente (ver más abajo), la elección óptima de la fluoroquinolona para la administración pulmonar a través de aerosol tiene ciertos niveles de solubilidad y pH.

20 Para el propósito de este estudio de factibilidad, la solubilidad objetivo se fijó en 10 mg/ml o más a un pH de 4,5 o más, basado en los cálculos de dosis terapéutica y de las métricas de suministro para los nebulizadores disponibles. Para superar la concentración preventiva del mutante (MPC), la concentración máxima de la fluoroquinolona después de la administración en aerosol alcanza ventajosamente de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 1000 µg/ml en el sitio de la infección, en espera de la CMI del organismo infectante. Basándose en estas consideraciones, la dosis mínima para estar en este intervalo terapéuticamente relevante se previó que fuera al menos

25 aproximadamente 30-40 mg de Dosis respirable suministrada (RDD). Dada la vida media relativa de la levofloxacin en el pulmón humano, la realización práctica de esta dosis por nebulización se puede obtener con una dosis de carga de al menos aproximadamente 100 mg en un volumen de aproximadamente 2 mL (aproximadamente 50 mg/mL) en un dispositivo de alta eficiencia de malla vibratoria que funciona a su máxima eficiencia de funcionamiento suministrando esta dosis en menos de 4 minutos. Un nebulizador ultrasónico o a chorro estándar puede requerir una

30 dosis de carga de al menos aproximadamente 400 mg en un volumen de aproximadamente 5 mL (aproximadamente 80 mg/mL). Sin embargo, la velocidad de administración mediante estos dispositivos menos eficientes puede no ser suficiente para lograr una alta concentración local con la exposición de corta duración. También se pueden lograr dosis eficaces similares mediante la administración de la levofloxacin como un polvo seco, donde las propiedades de

solubilidad rápida de la levofloxacina pueden permitir una rápida disolución que resulta en estas concentraciones deseadas del fármaco soluble. Sin embargo, pueden ser deseables concentraciones alternativas o la alteración del perfil de forma de AUC de la fluoroquinolona.

- 5 Alternativamente, aunque la solubilidad acuosa es importante, es razonable predecir una formulación que utiliza la tecnología de partículas o formación de complejos para permitir la nebulización de fluoroquinolonas menos solubles. Desafortunadamente, las formulaciones más complejas aumentan tanto la complejidad como el costo de desarrollo de fármacos, y en el caso de los nebulizadores ultrasónicos y de chorro, provocan una reducción significativa en la eficiencia del suministro, y limitan la capacidad de introducir otros elementos de diseño en un producto farmacológico final.
- 10 Además de la solubilidad del fármaco, para los dispositivos de malla vibratoria la nebulización también es sensible a la tensión superficial de la formulación del fármaco. Por lo tanto, en una realización, la tensión superficial se ajusta durante la formulación mediante la modificación de la concentración del fármaco, la concentración de excipiente y/o la adición del tensioactivo.
- 15 Además de los factores que afectan a la nebulización eficiente, que se pueden considerar otros factores para la tolerancia y conformidad del paciente. Como ejemplo no limitante, estos factores pueden incluir la osmolalidad, pH y sabor. La osmolalidad afecta a la tolerancia aguda en el tracto respiratorio y puede optimizarse para la mayoría de los fármacos durante la formulación. Similarmente, el pH de un aerosol contribuye además a la tolerancia, sin embargo, sólo negativamente cuando el pH de la formulación es menor que 4,5. Por lo tanto, debido a que el pH contribuye directamente a la solubilidad de la fluoroquinolona, las fluoroquinolonas que requieren un pH menor de 4,5 para la solubilidad es probable que sean pobremente toleradas. Por último, el sabor de las fluoroquinolonas puede afectar a la mejor conformidad del paciente. Las fluoroquinolonas se conocen generalmente por asociarse con un sabor desagradable, a veces muy intenso. Si bien existen tecnologías disponibles que pueden enmascarar el mal sabor de los fármacos, estas tecnologías aumentan la complejidad y costo de desarrollo, y pueden no ser totalmente eficaces en el caso de las fluoroquinolonas. Por lo tanto, de forma similar al pH, el sabor puede considerarse para identificar una fluoroquinolona adecuada para la nebulización.
- 20
- 25

Preparación y caracterización de las soluciones de prueba

Los antibióticos se adquirieron de varias fuentes, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Preparación de soluciones de prueba de la fluoroquinolona (descrito, pero no reivindicado).

No.	Fluoro-quinolona	Fuente ^a	Pureza ^b	Cantidad	Volumen H ₂ O	Conc. Final.
1	Gatifloxacina	LKT	99,6	8,7 mg	0,87 mL	10 mg/mL
2	Gemifloxacina	LG	99,6	9,5 mg	0,95 mL	10 mg/mL
3	Levofloxacina	LKT	99,2	10,3 mg	1,03 mL	10 mg/L
4	Moxifloxacina	LKT	99,5	12,5 mg	1,25 mL	10 mg/mL
5	Ciprofloxacina	LKT	99,3	19,5 mg	1,95 mL	10 mg/mL
6	Ofloxacina	LKT	99,1	11,7 mg	1,17 mL	10 mg/mL
7	Lomefloxacina	MPI	NA	17,0 mg	1,70 mL	10 mg/mL
8	Marbofloxacina	Vetoquino	NA	4,8 mg	0,48 mL	10 mg/mL
9	Orbifloxacina	MPI	NA	4,2 mg	0,42 mL	10 mg/mL
10	Pefloxacina	MPI	NA	15,0 mg	1,50 mL	10 mg/mL
11	Esparfloxacina	MPI	NA	14,5 mg	1,45 mL	10 mg/mL
12	Tosufloxacina	MPI	NA	15,2 mg	1,52 mL	10 mg/mL
13	Trovafloxacina	MPI	NA	2,0 mg	0,20 mL	10 mg/mL

a. LKT: LKT Laboratories. LG: LG Chem. NA Fuente no disponible.

ES 2 685 315 T3

No.	Fluoro-quinolona	Fuente ^a	Pureza ^b	Cantidad	Volumen H ₂ O	Conc. Final.
b. Pureza del material probado. Descrito como GMP o en porcentaje de API.						
c. Solución de 25 mg/ml.						

Una muestra de 2-20 mg de cada antibiótico se pesó en tubos de plástico estériles y se completó con un volumen de agua estéril para obtener una solución o suspensión del antibiótico de 10 mg/mL. Las muestras se incubaron durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente con mezclado ocasional, antes de su posterior manipulación.

- 5 Después del período de incubación, se observaron las soluciones de antibióticos con respecto a su apariencia visible, y los resultados se muestran en la Tabla 9.

- 10 Cinco de las fluoroquinolonas probadas fueron visiblemente solubles, y, o bien sin color, o con una sombra de color amarillo. Ocho fueron visiblemente insolubles, con apariencias nubosas (partículas finas), opacas (partícula densa de fina a media), o turbias (suspensión de partículas gruesa, grandes), en todos los casos con un sedimento visible. Se determinó el El pH de estas soluciones iniciales, y el intervalo fue de 3,5 a 7,0. Las soluciones insolubles se titularon con HCl 1 N hasta el punto de solubilidad visible, y se determinó el pH de la solución solubilizada. En tres casos, marbofloxacin, esparfloxacin y tosufloxacin, la solubilidad no se alcanzó con el pH 1,5, y se detuvo además la adición de ácido. Con excepción de la ofloxacin, el pH de estas soluciones valoradas estuvo en el intervalo de 1,5 a 3,0.

- 15 Tabla 9. Características de la solución fluoroquinolona (descritas, pero no reivindicadas).

No.	Fluoroquinolona	Solución inicial		Después del ajuste de pH		
		Apariencia	pH	HCl 1 N (uL)	Apariencia ^a	pH
	Gatifloxacin	blanco, nuboso, sedimento visible	7,0	5	color ligeramente amarillo, transparente, sin precipitado	3,0
	Gemifloxacin	incoloro, transparente, sin sedimento	4,7		NR	-
	Levofloxacin	color ligeramente amarillo, transparente, sin sedimento	4,7		NR	-
	Moxifloxacin	color amarillo brillante, transparente, sin sedimento	4,7		NR	-
	Ciprofloxacin	blanco, opaco (muy denso), sedimento visible	5,5	60	incoloro, transparente, sin sedimento	2,0
	Ofloxacin	nuboso, sedimento visible	6,5	10	color ligeramente amarillo, transparente, sin sedimento	5,2
	Lomefloxacin	nuboso, sedimento visible	4,2	-	transparente, sin precipitado, después de 10 min. a temperatura ambiente.	-
	Marbofloxacin	blanco, muy turbio, sedimento visible	6,5	40	blanco, turbio, sedimento visible	1,5
9	Orbifloxacin	blanco, nuboso, sedimento visible		20	incoloro, transparente, sin sedimento	1,7
10	Pefloxacin	incoloro, transparente, sin precipitado	4,5		NR	-
11	Esparfloxacin	amarillo brillante, turbio, sedimento visible	5,0	20	amarillo brillante, densamente turbio, sedimento visible	1,5

ES 2 685 315 T3

No.	Fluoroquinolona	Solución inicial		Después del ajuste de pH		
		Apariencia	pH	HCl 1 N (uL)	Apariencia ^a	pH
12	Tosufloxacin	blanco, turbio, sedimento visible	3,5	20	blanco, nuboso, menos turbio, sedimento visible	1,5
13	Trovafloxacin	incoloro, ligeramente nuboso, sin precipitado	4,2		NR	-

a. NR: ajuste de pH innecesario. Fluoroquinolona fue soluble a un pH ≥ 4 en la solución inicial.

Después del ajuste de pH, y seguido de un período de incubación adicional de 10 minutos con mezclado ocasional, se determinó la apariencia final de las soluciones, justo antes de la prueba de tolerancia y sabor del aerosol. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

5 Tabla 10. Apariencia de la solución final de las fluoroquinolonas (descrito, pero no reivindicado).

No.	Fluoroquinolona	pH	Solubilidad	Color	Sedimento	Opacidad
1	Gatifloxacin	3,0	+	C	Ninguno	ninguno a muy ligero
2	Gemifloxacin		+	C	Ninguno	ninguno a muy ligero
3	Levofloxacin	4,7	+	VLY	Ninguno	Ninguno
4	Moxifloxacin	4,7	+	Y	+/-	Ninguno
5	Ciprofloxacina	2,0	+	C	Ninguno	Ninguno
6	Ofloxacin	5,2	+	LY	+/-	Ninguno
7	Lomefloxacina	4,2	+	C	+/-	ninguno a muy ligero
8	Marbofloxacina	1,5	--	W	++	++
9	Orbifloxacin	1,7	+	C	Ninguno	ligero
10	Pefloxacin	4,5	+	C	Ninguno	ligero
11	Esparfloxacin	1,5	---	DY	+++	++++
12	Tosufloxacin	1,5	--	W	++	+++
13	Trovafloxacin	4,2	+	C	+	ligero

Y=amarillo; LY= amarillo ligero; VLY=amarillo muy ligero; DY=amarillo oscuro; C= incoloro; W = blanco.

Los compuestos que exhiben la solubilidad preferida de las soluciones adecuadas para la administración por inhalación (10 mg/mL a un pH de 4,5 o superior), fueron la levofloxacin, gemifloxacin, moxifloxacin, ofloxacin y pefloxacin. La levofloxacin, ofloxacin y moxifloxacin exhibieron las mejores características de solubilidad/pH.

10 Evaluación del Gusto y Tolerancia (descrito pero no reivindicado)

Se realizaron dos evaluaciones para determinar la idoneidad de las soluciones de la fluoroquinolona con respecto al sabor y la tolerancia.

En primer lugar, en una prueba de sabor por vía oral se determinó el sabor de una porción de 20 μ l de la muestra prueba en un solo voluntario humano, sano colocando el material directamente en la parte central delantera de la

lengua. El sabor se monitorizó a continuación, durante un período de 1 minuto. Esta prueba se realizó con las soluciones iniciales preparadas, así como las soluciones finales tras el ajuste del pH. Los datos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Prueba del sabor de la fluoroquinolona oral.

No.	Fluoroquinolona	Solución inicial	Solución final
1	Gatifloxacina	sabor amargo moderado desagradable, ligeramente aromático	sabor fuerte amargo, parecido a almendras, desagradable, fuerte regusto
2	Gemifloxacina	sabor muy amargo desagradable con fuerte regusto, hasta el final de la garganta.	no realizado
3	Levofloxacina	sabor ligeramente químico, ligeramente amargo, sabor ligeramente parecido a almendras	no realizado
4	Moxifloxacina	sabor amargo-dulce moderado, desagradable, ligeramente aromático	no realizado
5	Ciprofloxacina	sabor dulce parecido a almendras	sabor amargo, muy fuerte en todas partes de la garganta
6	Ofloxacina	sabor amargo, desagradable, parecido a almendras	sabor amargo moderado, desagradable, parecido a almendras
7	Lomefloxacina	sabor de moderado a fuerte, parecido a almendras, no muy desagradable	no realizado
8	Marbofloxacina	sabor amargo desagradable, parecido a almendras	sabor moderado a fuerte, amargo, desagradable, parecido a almendras
9	Orbifloxacina	sabor fuerte, desagradable	sabor amargo muy fuerte, muy desagradable
10	Pefloxacina	sabor amargo fuerte, desagradable parecido a almendras	no realizado
11	Esparfloxacina	sabor ligero	sabor fuerte parecido a almendras
12	Tosufloxacina	sabor de medio a moderado parecido a almendras	sabor fuerte parecido a almendras
13	Trovafloxacina	sabor amargo muy fuerte, desagradable, parecido a almendras, fuerte regusto	sin realizar

5

La disminución del pH generalmente tuvo el efecto de mejorar las propiedades del gusto de la solución. Gatifloxacina, gemifloxacina, ciprofloxacina, orbifloxacina y trovafloxacina fueron los menos deseables en la prueba de sabor. De las fluoroquinolonas ensayadas, la levofloxacina fue la única fluoroquinolona que fue tolerable con respecto al sabor, a la concentración probada. La lomefloxacina tuvo un sabor moderadamente fuerte parecido a almendras, y el sabor fue un poco desagradable.

10

En la segunda prueba, se determinó la tolerancia y el sabor de una pequeña muestra de aerosol de 0,5 ml de una

alícuota de la formulación de prueba en un solo voluntario sano humano, después de la nebulización en un nebulizador PARI eFlow (Tabla 12).

Tabla 12. Prueba del sabor y tolerancia a la Fluoroquinolona en aerosol (descrito, pero no reivindicado).

No.	Fluoroquinolona	Tolerancia y sabor al aerosol
1	Gatifloxacina	sabor amargo moderado, desagradable, sensación de tos leve
2	Gemifloxacina	sabor amargo fuerte, desagradable, fuerte regusto, sensación de tos leve
3	Levofloxacina	sabor químico, algo amargo, sensación de tos leve
4	Moxifloxacina	sabor amargo moderado, desagradable, algo de tos, regusto fuerte y amargo
5	Ciprofloxacina	muy fuerte, sabor amargo desagradable, tos inmediata
6	Ofloxacina	sabor químico amargo, sensación de tos leve
7	Lomefloxacina	sabor químico, algo amargo, sensación de tos leve
8	Marbofloxacina	demasiado insoluble para probar
9	Orbifloxacina	muy ácido, sabor amargo fuerte desagradable, tos fuerte
10	Pefloxacina	sabor químico, algo de tos
11	Esparfloxacina	demasiado insoluble para probar
12	Tosufloxacina	demasiado insoluble para probar
13	Trovafloxacina	sabor amargo desagradable, sin tos o sensación de tos, sin regusto

5 En el caso de la orbifloxacina, marbofloxacina y trovafloxacina, se probaron porciones más pequeñas, debido a las limitaciones de la solubilidad. En un experimento de calibración, el inhalador produjo una salida de aerosol de 4,1 micras de VMD, con una desviación estándar geométrica (GSD) de 1,64 micras de VMD. Además de estas mediciones, el inhalador produjo una dosis de partículas finas (FPD) de 54,9 % (porcentaje de la dosis emitida en partículas de menos de 5 micras). La tolerancia y el sabor del fármaco se monitorizaron durante un periodo de administración muy breve y durante un período de 10 minutos después de la administración. Los parámetros de la tolerancia fueron de los siguientes tipos: (i) tos, sensación de tos o estornudos (ii) irritación, ardor o sensación de opresión en la garganta, (ii) irritación o mucosidad en las fosas nasales u ojos, (iii) irritación, ardor o sensación de opresión en los pulmones o disnea, y (iv) mareos, dolor de cabeza, náuseas u otros efectos sistémicos.

15 La marbofloxacina, el esparfloxacina y la tosufloxacina fueron demasiado insolubles para evaluarse en esta prueba. Para el resto de las fluoroquinolonas probadas, no se observaron efectos de tolerancia durante o después de la exposición al aerosol en las categorías II, III o IV (anteriores). La gatifloxacina, moxifloxacina ciprofloxacina, orbifloxacina y pefloxacina se asociaron con la tos. En el caso de la ciprofloxacina y la orbifloxacina esto pudo asociarse con el bajo pH de la solución. De las fluoroquinolonas probadas, la levofloxacina a 10 mg/ml tuvo las mejores características de sabor. La ofloxacina, lomefloxacina y pefloxacina tuvieron un sabor más perceptible que la levofloxacina, que también fueron aceptables, durante el ciclo corto de la administración.

Resumen y conclusiones de la prueba de sabor de las Fluoroquinolonas

25 De las trece fluoroquinolonas probadas en este estudio, la levofloxacina tuvo propiedades físico-químicas preferidas para la administración en aerosol y una demostración de mejor tolerancia aguda de las fluoroquinolonas probadas (Tabla 13). La levofloxacina también se reconoce por tener uno de los mejores perfiles antimicrobianos para los patógenos respiratorios y tiene la mayor eficacia *in vivo* comparable a la ciprofloxacina, para el tratamiento de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 13. Conveniencia general para la nebulización (descrito, pero no reivindicado).

No.	Fluoroquinolona	Evaluación	Puntuación total	Limitación
1	Gatifloxacina	pobre solubilidad y pH, sabor del aerosol amargo moderadamente fuerte	--	solubilidad, sabor
2	Gemifloxacina	suficiente solubilidad y pH, sabor del aerosol fuerte amargo, fuerte regusto	--	Sabor
3	Levofloxacina	excelente solubilidad y pH, sabor de aerosol químico, algo amargo	+	Sabor
4	Moxifloxacina	suficiente solubilidad y pH, sabor de aerosol amargo moderadamente fuerte, fuerte regusto	--	Sabor, Actividad de Pa
5	Ciprofloxacina	pobre solubilidad y pH, sabor del aerosol amargo muy fuerte, presencia de tos	---	solubilidad, sabor
6	Ofloxacina	mínimamente aceptable solubilidad y pH, sabor de aerosol químico amargo	-/+	Sabor
7	Lomefloxacina	solubilidad y pH mínimamente aceptable, sabor de aerosol químico, sabor del líquido fuerte	-/+	Actividad Pa
8	Marbofloxacina	muy poca solubilidad incluso a bajo pH, incapaz de probar	-	Solubilidad
9	Orbifloxacina	solubilidad muy pobre incluso a pH bajo, sabor de aerosol fuerte amargo desagradable, tos fuerte	-	solubilidad, sabor, Actividad Pa
10	Pefloxacina	suficiente solubilidad y pH, sabor de aerosol químico, sabor líquido fuerte desagradable	-/+	Actividad Pa
11	Esparfloxacina	muy poca solubilidad incluso a bajo pH, incapaz de probar	---	solubilidad, Actividad Pa
12	Tosufloxacina	muy poca solubilidad incluso a bajo pH, incapaz de probar	---	Solubilidad
13	Trovafloxacina	solubilidad y pH moderados, sabor de aerosol amargo	--	Sabor, Actividad Pa

5 La ofloxacina, lomefloxacina y pefloxacina exhibieron menor solubilidad y sabor más fuerte a 10 mg/ml de la levofloxacina. La ofloxacina es 2 veces menos potente que la levofloxacina, y la lomefloxacina y pefloxacina son 4 veces menos potentes. Las concentraciones más altas de estos antibióticos tienen los tiempos de potencia y de administración preferidos de menos de 15 minutos.

En un estudio distinto, llevado a cabo de una manera similar, se probó la norfloxacina y se encontró que tienen una solubilidad, sabor y perfil de potencia muy similar a la gatifloxacina, con la excepción de una actividad significativamente menor contra los patógenos gram-positivos.

Prueba de sabor de las formulaciones salinas en aerosol de la levofloxacina y gemifloxacina

10 Basándose en los resultados de los estudios anteriores, la levofloxacina y su racemato la ofloxacina, así como la gemifloxacina, y en menor grado la gatifloxacina y norfloxacina son susceptibles a la administración en aerosol para el tratamiento antibacteriano pulmonar. Para probar las propiedades del sabor y la tolerancia aguda (sensación de tos y tos) de la levofloxacina y la gemifloxacina, se prepararon varias formulaciones con ácidos orgánicos e inorgánicos diferentes y se probaron en la forma descrita anteriormente. Las soluciones se prepararon añadiendo primero 500 mg de la levofloxacina a 10 ml de agua o añadiendo 500 mg de gemifloxacina a 20 ml de solución salina (debido a las

limitaciones de la solubilidad), valorando el pH a ~ 6,5 con HCl o ácido orgánico, a continuación, ajustando después la osmolalidad de las soluciones que contienen la levofloxacin a ~300 mOsmol/kg con cloruro de sodio. Las formulaciones probadas se muestran en la Tabla 14.

5 Estas formulaciones se probaron en un total de tres voluntarios humanos sanos de la misma manera como se describió anteriormente, a una concentración de la levofloxacin de 50 mg/ml, y una concentración de gemifloxacin de 25 mg/ml, en una prueba controlada con producto activo, con enmascaramiento completo, cuidadosamente controlada, . Los resultados se muestran en la Tabla 15 y 16.

10 Estos resultados demuestran que las formulaciones de ácido clorhídrico, ácido cítrico y ácido ascórbico de la levofloxacin tienen sabor y tolerancia superior en comparación con las formulaciones de ácido acético, ácido láctico y ácido tartárico de la levofloxacin. Además, estas formulaciones de la levofloxacin tienen sabor y tolerancia superior sobre las formulaciones de la gemifloxacin equivalentes. Con respecto a la gemifloxacin, la formulación de ácido cítrico tuvo sabor y tolerancia superior en comparación con las formulaciones de HCl y ácido ascórbico de la gemifloxacin, y con un refinamiento de la formulación adicional, puede ser susceptible a la administración en aerosol.

Tabla 14. Formulaciones de levofloxacin y gemifloxacin (descrito pero no reivindicado).

Fluoroquinolona	Ácido	Conc (mg/mL)	pH	osmolalidad (mOsm/kg)
Levofloxacin	HCl	50	6,5	181
Levofloxacin	Acético	50	6,41	273
Levofloxacin	Cítrico	50	6,45	286
Levofloxacin	Láctico	50	6,42	286
Levofloxacin	Ascórbico	50	6,50	278
Levofloxacin	Tartárico	50	6,35	286
Gemifloxacin	HCl	25	5,6	330
Gemifloxacin	Cítrico	25	5,7	363
Gemifloxacin	Ascórbico	25	5,9	347

15

Tabla 15. Sabor y tolerancia de las formulaciones de la levofloxacin en aerosol a 50 mg/ml (descrito, pero no reivindicado).

Ácido	Catador		
	1	2	3
HCl	Sabor amargo moderado	Sabor amargo, sensación de tos	Sabor amargo
Ácido acético	Sabor muy ácido	Sabor ácido fuerte, sensación de tos	sabor ácido, regusto
Ácido cítrico	sabor suave después ligeramente dulce	sabor suave, dulce	suave, regusto
Ácido láctico	Sabor amargo fuerte, regusto	Sabor suave, regusto, tos ligera	amargo, regusto suave
Ácido ascórbico	sabor suave, ligeramente ácido	sabor suave	poco sabor o regusto
Ácido tartárico	muy amargo, regusto	sabor amargo fuerte, regusto	sabor amargo

	Catador		
Ácido	1	2	3
	fuerte	amargo	

Tabla 16. Sabor y tolerancia de las formulaciones de Gemifloxacin a 25 mg/mL (descrita pero no reivindicada).

	Catador		
Ácido	1	2	3
Ácido clorhídrico	sabor metálico, regusto fuerte	sabor amargo ligero	sabor amargo, ligeramente metálico
Ácido cítrico	ligeramente dulce	Tos leve, ligeramente amargo	sabor muy suave, ningún regusto
Ácido ascórbico	sabor suave	Tos, regusto amargo suave	Ligeramente amargo, regusto suave

5 Prueba de sabor de las formulaciones adicionales de la levofloxacin en aerosol

Para probar las propiedades de sabor y tolerancia de las combinaciones de excipientes adicionales de la levofloxacin de una manera sistemática, se prepararon y ensayaron una serie de formulaciones. Las formulaciones se enumeran en la Tabla 17. Incluyeron azúcares, sales, edulcorantes y otros excipientes preparados mediante la mezcla de la levofloxacin con agua, añadiendo los excipientes enumerados en la Tabla 17, y titulando si es necesario al pH deseado con HCl diluido, la osmolalidad no se optimizó para estos estudios. Sin embargo, la osmolalidad se determinó usando un osmómetro de Advanced Instrumentación Modelo 3250. Esta medición, realizada en 250 µl de muestra, se basa en la disminución del punto de congelación para determinar la osmolalidad.

10 Estas formulaciones se probaron en un total de tres voluntarios humanos sanos con una serie de pruebas (A-G) de la misma manera que la descrita anteriormente, controladas con producto activo, con enmascaramiento completo, cuidadosamente controladas. Todas las pruebas se llevaron a cabo de una manera completamente ciega. Resultados de los ensayos (Tablas 19-25) se describen más abajo. Se usó el siguiente sistema de puntuación (Tabla 18).

15 Prueba A: Prueba de sabor de los edulcorantes, sales de metales divalentes, y agentes tensioactivos. Esta prueba incluyó edulcorantes, sales de calcio y magnesio, y agentes tensioactivos (es decir, glicerina y PS-80). Como se muestra en la Tabla 17, las formulaciones que contienen edulcorantes mostraron ser suavemente amargas y tuvieron un sabor metálico. Los edulcorantes artificiales parecieron producir un sabor amargo que es distinto del amargor observado de otra manera. Más significativamente, la formulación que contuvo CaCl₂ tuvo el mejor sabor respecto del control (MgCl₂ no se probó en este experimento) (Tabla 19).

20 Prueba B: Prueba de sabor de mono y disacáridos en presencia de cloruro de calcio. Todas las formulaciones examinadas en este experimento fueron bien toleradas y tuvieron mejor sabor que la muestra control. Las formulaciones que contuvieron tanto la sal de calcio como el azúcar se comportaron mejor que cualquiera de ellos por sí solas, lo que sugiere que estos compuestos mejoran el sabor a través de diferentes mecanismos. De estas formulaciones, 5 % de CaCl₂ + 7,5 % de glucosa funcionaron mejor. Obsérvese que la lactosa está presente en una concentración más baja que los otros azúcares (Tabla 20).

Tabla 17. Formulaciones de la levofloxacin que contienen diversos excipientes.

Fluoroquinolona	Conc (mg/ml)	Excipientes	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)
Levofloxacin	50	Control A (0,225 % de NaCl)	6,50	180
Levofloxacin	50	Aspartamo (0,1 %)	6,49	175

ES 2 685 315 T3

Fluoroquinolona	Conc (mg/ml)	Excipientes	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)
Levofloxacin	50	Sucralosa (0,1 %)	6,49	178
Levofloxacin	50	Glucosa (5 %)	6,5	380
Levofloxacin	50	Sacarosa (7,5 %); NaCl (0,225 %)	6,51	329
Levofloxacin	50	Glicerina (5 %)	6,48	880
Levofloxacin	50	PS-80 (0,1%)	6,51	189
Levofloxacin	50	CaCl ₂ (5 %)	6,10	784
Levofloxacin	50	MgSO ₄ (5 %)	6,41	73
Levofloxacin	50	Control - B-E (0,225 % de NaCl)	6,51	182
Levofloxacin	50	CaCl ₂ (5 %)	6,1	735
Levofloxacin	50	CaCl ₂ (5 %), Sacarosa (7,5 %)	6,10	958
Levofloxacin	50	CaCl ₂ (5 %), Glucosa (7,5 %)	6,10	1174
Levofloxacin	50	CaCl ₂ (5 %), Glucosa (7,5 %)	5,25	1246
Levofloxacin	50	CaCl ₂ (5 %), Lactosa (5 %)	6,07	864
Levofloxacin	50	MgCl ₂ (5 %)	5,90	600
Levofloxacin	50	MgCl ₂ (5 %), Sacarosa (7,5 %)	5,98	815
Levofloxacin	50	MgCl ₂ (5 %), Glucosa (7,5 %)	5,98	999
Levofloxacin	50	MgCl ₂ (5 %), Glucosa (7,5 %)	5,04	1035
Levofloxacin	50	MgCl ₂ (5 %), Lactosa (5 %)	5,96	697
Levofloxacin	50	MgSO ₄ (5 %), Sacarosa (7,5 %)	6,20	433
Levofloxacin	50	MgSO ₄ (5 %), Glucosa (7,5 %)	6,21	625
Levofloxacin	50	MgSO ₄ (5 %), Glucosa (7,5 %)	5,40	660
Levofloxacin	50	MgSO ₄ (5 %), Lactosa (5 %)	6,18	387
Levofloxacin	50	Control F- G (0,45 % NaCl)	6,5	221
Levofloxacin	50	Glucosa (5 %)	6,5	376
Levofloxacin	50	sacarosa (5 %)	6,5	240
Levofloxacin	50	Lactosa (5 %)	6,62	241
Levofloxacin	50	Lactosa (2,5 %)	6,55	170
Levofloxacin	50	CaCl ₂ (5 %)	6,10	735

ES 2 685 315 T3

Fluoroquinolona	Conc (mg/ml)	Excipientes	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)
Levofloxacin	50	CaCl ₂ (5 %), Lactosa (5 %)	6,21	1037
Levofloxacin	50	CaCl ₂ (2,5 %), Lactosa (5 %)	6,36	565
Levofloxacin	50	CaCl ₂ (2,5 %), Lactosa (2,5 %)	6,41	370
Levofloxacin	50	CaCl ₂ (1.25 %), Lactosa (2,5 %)	6,64	227
Levofloxacin	50	CaCl ₂ (0,625 %), Lactosa (2,5 %)	6,06	163

Tabla 18. Sistema de puntuación de la prueba de sabor.

Puntuación	Sabor	Tolerancia
1	Comparable con la solución salina	Ninguna sensación de tos, sin tos
1,25	Ligeramente más sabor que la solución salina	Ligera sensación de tos, sin tos
1,5	Sabor amargo/metálico suave	Sensación de tos, tos ligera
1,75	Entre 1,5 y 2.	-
2	Sabor amargo/metálico moderado	Sensación de tos, tos moderada
2,25	Entre 2 y 2,5.	-
2,5	Sabor amargo/metálico fuerte	-
2,75	entre 2,5 y 3.	-
3	Sabor amargo/metálico muy fuerte	Sensación de tos y tos fuerte
4	Sabor amargo/metálico muy fuerte y otro sabor inaceptable	Sensación de tos, tos fuerte y otra irritación

Tabla 19. Sabor y tolerancia de las formulaciones de la Levofloxacin que contienen edulcorantes, sales de metales divalentes, y agente tensioactivo

5

Excipientes	Catador							
	1		2		3		Mediana	
	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.
Aspartamo (0,1 %)	2	1,25	2	1	2	1	2	1
Sucrosa (0,1 %)	2	1	1,75	1	2	1	2	1
Sacarosa (7,5 %); NaCl (0,225 %)	2	1	2,25	1	2	1	2	1
Glucosa (5 %)	1,5	2	2,5	1	2	1	2	1
Glicerina (5 %)	2,25	1	2,25	1	2,5	1	2,3	1

Excipientes	Catador							
	1		2		3		Mediana	
	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.
PS- 80 (0,1 %)	1,75	1	2,25	1	2,5	1	2,3	1
CaCl ₂ (5 %)	1,25	1	1,5	1,5	2	1	1,5	1
MgSO ₄ (5 %)	1,5	1,5	2,5	2,5	2,5	1	2,5	1,5
Control -A (0,225 % NaCl)	3	1	3	1	2,5	1	3	1

Tabla 20. Sabor y tolerancia de las formulaciones de la Levofloxacina CaCl₂.

Excipientes	Catador							
	1		2		3		Mediana	
	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.
CaCl ₂ (5 %)	1,75	1	2	1	2,75	1	2	1
Sacarosa (5 %)	2	1	2	1	2	1	2	1
CaCl ₂ (5 %) ₂ , Sacarosa (7,5 %)	1,75	1	1,75	1	1,5	1	1,8	1
CaCl ₂ (5 %), Glucosa (7,5 %)	1,5	1	1,5	1	2	1	1,5	1
CaCl ₂ (5 %), Lactosa (5 %)	1	1	1,75	1	2	1	1,8	1
Control B-E (0,225 % NaCl)	3	1	2,5	1	3	1	3	1

5

Prueba C: Prueba de sabor de Mono y Disacáridos en Presencia de Cloruro de Magnesio. Como anteriormente, todas las formulaciones cribadas en este experimento se toleraron bien y supieron mejor que la muestra de control. Las formulaciones que contenían tanto la sal de magnesio como lactosa parecieron funcionar ligeramente mejor que cualquiera de los dos por sí solos. Este experimento confirma que la combinación de sales de metales divalentes y azúcares simples es efectiva en la mejora del sabor (Tabla 21).

Tabla 21. Sabor y tolerancia de las formulaciones de la Levofloxacina MgCl₂.

Excipientes	Catador							
	1		2		3		Mediana	
	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.
MgCl ₂ (5 %)	1,5	1	-	-	1,75	1	1,6	1
MgCl ₂ (5 %), Sacarosa (7,5 %)	1,5	1	1,75	1	2	1	1,8	1
MgCl ₂ (5 %), Glucosa (7,5 %)	1,25	1	2,25	1	2	1	2	1
MgCl ₂ (5 %), Lactosa (5 %)	1	1	1,5	1	1,5	1	1,5	1
Control B-E (0,225 % de NaCl)	2,25	1	-	-	2,75	1	2,5	1

Prueba D: Prueba de sabor de Mono- y Disacáridos en presencia de sulfato de magnesio. Al igual que con el cloruro de calcio y de magnesio, las formulaciones que contuvieron sulfato de magnesio y glucosa, sacarosa o lactosa supieron mejor que la muestra control. Este experimento reconfirma que la combinación de sales de metales divalentes y azúcares simples mejoran el sabor (Tabla 22).

5 Tabla 22. Sabor y tolerancia de las formulaciones de la Levofloxacin MgSO₄.

Excipientes	Catador							
	1		2		3		Mediana	
	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.
MgSO ₄ , Sacarosa	1,5	2	1,5	1,25	1,5	1	1,5	1,3
MgSO ₄ , Glucosa	1,5	2,75	2	2,5	1,5	1,5	1,5	2,5
MgSO ₄ , Lactosa	1,25	2,25	1,75	1,25	1,75	1	1,8	1,3
Control B-E (0,225 % de NaCl)	2,25	1	-	-	3	1	2,6	1

Prueba E: Prueba de sabor de sales de metales divalentes en presencia de Glucosa a pH bajo y alto. En este experimento, se probó el efecto de la glucosa en combinación con cada una de las tres sales de cationes divalentes a pH bajo ($\leq 5,5$) y alto ($\geq 6,0$). Se observaron mejoras pequeñas pero consistentes de sabor al pH más alto (Tabla 23).

10 Tabla 23. Sabor y tolerancia de las formulaciones de Levofloxacin CaCl₂ a pH bajo frente a alto.

Excipientes	Catador							
	1		2		3		Mediana	
	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.
CaCl ₂ (5 %), Glucosa (7,5 %), pH6,1	1	1	1,5	1	2	1	1,5	1
CaCl ₂ (5 %), Glucosa (7,5 %), pH 5,5	1,25	1	1,75	1	2,5	1	1,8	1
MgCl ₂ (5 %), Glucosa (7,5 %), pH6,0	1,25	1	2	1	2	1	2	1
MgCl ₂ (5 %), Glucosa (7,5 %), pH 5,0	1,75	1	1,75	1	1,5	1	1,8	1
MgSO ₄ (5 %), Glucosa (7,5 %), pH 6,2	1,25	2,25	2,25	1,75	1,5	1	1,5	1,8
MgSO ₄ (5 %), Glucosa (7,5 %), pH 5,4	1,5	1,75	1,75	1,5	2	1	1,8	1,5
Control B-E (0,225 % de NaCl)	2	1	-	-	-	-	-	-

Prueba F. Prueba de sabor de Mono- y Disacáridos. Todas las formulaciones seleccionadas en este experimento se toleraron bien y supieron mejor que la muestra control. Los tres azúcares al 5 % fueron mejores que el control, la lactosa al 2,5 % supo mejor que el control, pero no tan bien como al 5 %. Este experimento confirma que los azúcares simples mejoran el sabor (Tabla 24).

15

Tabla 24. Sabor y tolerancia de las formulaciones con azúcar de la Levofloxacin (descrito pero no reivindicado).

Excipientes	Catador					
	1		3		Mediana	
	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.
Glucosa (5 %)	1,5	1,5	2	1	1,8	1,3
Sacarosa (5 %)	1,5	1,5	1,5	1	1,5	1,3
Lactosa (5 %)	1,75	1,25	2	1	1,9	1,1
Lactosa (2,5 %)	2,25	1,5	2	1	2,1	1,3
Control F-G (0,45 % de NaCl)	2,5	1	2,5	1	2,5	1

5 Prueba G. Sabor y tolerancia de las formulaciones de la levofloxacin CaCl_2 en presencia de lactosa. En este experimento, la levofloxacin se formuló con concentraciones variables de cloruro de calcio y lactosa (Tabla 25). Como se señaló a lo largo de esta serie de experimentos, todas las formulaciones que contuvieron sales de metales divalentes y azúcar mejoraron con respecto al sabor y la tolerancia respecto de la formulación de control. Con máxima importancia, el cloruro de calcio al 5 % o el cloruro de calcio al 2,5 % en presencia de lactosa al 5 % fueron más eficaces en la disminución del amargor de la levofloxacin. Las disminuciones adicionales en la concentración de estos excipientes fueron menos efectivas.

10 Tabla 25. Sabor y tolerancia de las formulaciones de la Levofloxacin CaCl_2 en presencia de lactosa.

Excipientes	Catador					
	1		3		Mediana	
	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.	Sabor	Tol.
CaCl_2 (5 %)	1,25	1	1,5	1	1,4	1
CaCl_2 (5 %), Lactosa (5 %)	1,25	1	2	1	1,6	1
CaCl_2 (2,5 %), Lactosa (5 %)	1,25	1	2	1	1,6	1
CaCl_2 (2,5 %), Lactosa (2,5 %)	1,5	1	2,5	1	2	1
CaCl_2 (1,25 %), Lactosa (2,5 %)	1,75	1	2	1	1,9	1
CaCl_2 (0,625 %), Lactosa (2,5 %)	1,75	1,25	2	1	1,9	1,1
Control F-G (0,45 % de NaCl)	3	1	2,5	1	2,8	1

Ejemplo de Referencia 3 - Caracterización de la levofloxacin en aerosol en el nebulizador a chorro PARI LC Plus.

15 Los estudios siguientes describen el potencial de la administración en aerosol de la levofloxacin que se administra a un paciente a través de un nebulizador de chorro. Para realizar esta tarea, se preparó una formulación sencilla de la levofloxacin y el aerosol se caracterizó en un nebulizador de chorro. Los resultados de estos estudios se muestran en el resumen más abajo.

20 La solución de inhalación de la levofloxacin (55 mg/mL) se evaluó usando un nebulizador de chorro PARI LC Plus Air con Compresor ProNeb. La dosis emitida, la distribución del tamaño de partículas y la fracción de partículas finas se midieron mediante impactación en cascada usando un impactador de Marple Miller. Los parámetros mencionados anteriormente se usaron para evaluar el funcionamiento *in vitro* de los medicamentos aerosolizados.

Estudio Marple Miller

Objetivo. Determinar la distribución del tamaño de partículas y estimar la cantidad del fármaco que es probable que un paciente inhale (fracción respirable). Un objetivo secundario fue estimar la dosis emitida, que es la cantidad de la levofloxacin que salió del nebulizador.

5 Métodos. Formulación: 55 mg/ml de la levofloxacin, cloruro 120 mM, sodio 70 mM, pH 6,7. La formulación se estableció a partir de la máxima solubilidad que permite una administración de 300 mg en 6 mL y pH neutro. Se añadieron 5,5 mL de la formulación de la levofloxacin a un Nebulizador de chorro PARI LC Plus con Compresor ProNeb. El recipiente del nebulizador contuvo un total de 302 mg de la levofloxacin. El nebulizador se conectó en línea con un impactador Marple Miller (MMI), que funcionó con una velocidad de flujo de aire de 60 l/min. Cada nebulizador (n=2) funcionó hasta la sequedad (no se produce aerosol tal como se juzga mediante inspección visual durante 15 minutos). Tras la aerosolización, el MMI se desmontó y la levofloxacin se extrajo cuantitativamente con la fase móvil (90/10 ACN:agua) desde el puerto de entrada USP, cada una de las copas de recogida del impactador (etapas) y el filtro de fibra de vidrio. Cualquier formulación restante en el nebulizador después de la aerosolización (copa y boquilla) se cuantificó también.

15 Resultados

Como se muestra en la Tabla 26, la cantidad promedio total recuperada de los experimentos MMI fue 170,2 mg. La recuperación esperada fue de 302 mg. Esto representa una recuperación total de ~57 %, que no cumple las especificaciones generalmente aceptadas para los estudios basados en la impactación (85 %-115 % de recuperación total). Esta diferencia se debe a la adherencia inespecífica de la levofloxacin al dispositivo del nebulizador LC Plus. El porcentaje promedio del fármaco que sale del nebulizador en partículas finas fue de ~72 %. Por lo tanto, la dosis emitida respirable fue de 89,7 mg. Suponiendo que ~50 % no se inhala durante la respiración corriente normal, un total de ~40 mg puede depositarse en el pulmón con esta dosis de 300 mg. Sin embargo, dado el tiempo de administración lenta con este dispositivo, la competencia con el aclaramiento pulmonar probablemente impediría que la acumulación de suficiente levofloxacin cumpliera la concentración mínima requerida para la administración de "administración rápida, alta concentración" necesaria para la actividad antimicrobiana máxima de la fluoroquinolona y la prevención de la resistencia.

Tabla 26. Conjunto de datos del impactador Marple Miller.

ID de la muestra	A Dosis emitida (mg)	B Cantidad de fármaco que permanece en la copa del nebulizador (mg)	A+B Cantidad de fármaco recuperado (mg)	Porcentaje del fármaco total que sale del nebulizador en la fracción de partículas finas (% < 5µm)
Ensayo Levo 1	134,70	45,00	179,70	73,5
Ensayo Levo 2	114,40	46,30	160,70	70,4
Promedio	124,6	45,7	170,2	72,0

30 Ejemplo de Referencia 4 - Modelos Animales y Evaluación de las Fluoroquinolonas y las Formulaciones de la Fluoroquinolona.

Modelo Farmacocinético

A seis ratas por estudio se les administra una dosis única intravenosa en bolo, lenta de 10 mg/kg por la vena lateral de la cola o se les administra una dosis única por microaspersión de aerosol de 10 mg/kg usando un dispositivo de microaspersión de generación de aerosoles (PennCentury, Filadelfia, PA). Se toman muestras de sangre a diferentes tiempos a lo largo de 3 horas para determinar los parámetros farmacocinéticos del plasma. Se sacrificaron dos ratas en 0,5, 1,5 y 3 horas después de la administración para determinar los niveles en pulmón, lavado bronqueoalveolar (BAL), y líquido de revestimiento epitelial (ELF). Las concentraciones plasmáticas y tisulares se determinan mediante un método de HPLC y los datos se ajustan después usando WinNonlin. Los datos se muestran en la Tabla 27.

Modelo de eficacia

40 La cepa PAM 1723 de *P. aeruginosa* se cultiva en caldo Mueller-Hinton (MHB) a 35°C con ventilación constante, después de 16 horas, el inóculo se subcultiva en MHB fresco y se deja crecer nuevamente a 35°C, con ventilación constante, durante 4 horas. El inóculo se ajusta a cerca de 5×10^6 UFC/ml por correlación de la absorbancia a 600 nm con recuentos de placas predeterminados. Los ratones CFW macho (4 - 6 semanas de edad, N= 4/grupo) se hacen

5 neutropénicos por la inyección intraperitoneal de 150 mg/kg de ciclofosfamida (Cytosan, Mead Johnson, Princeton, NJ) en los días 1 y 4. En el día 5, los ratones se infectan con una instilación intratraqueal de 0,05 mL del inóculo bajo anestesia con isoflurano (5 % de isoflurano en oxígeno a 4 L/min). Dos horas después de la infección, a los ratones se les administraron dosis intraperitoneales o intratraqueales de cada fluoroquinolona a una dosis de 25 mg/kg. Los ratones se sacrificaron 1 y 4 horas después del tratamiento, los pulmones se extrajeron, se homogeneizaron y se colocaron en placas para determinar los recuentos de colonias. Los datos se muestran en la Tabla 28.

Tabla 27. Modelo farmacocinético.

Fármaco	Ruta	Dosis (mg/kg)	AUC de suero (0-inf)	Suero t1/2	AUC de ELF (0,5-3h)	F, % de Pulmón vs, IV
Levofloxacin	IV	10	3,8	0,5	10,5	NA
Levofloxacin	IT	10	3,28	0,4	12,07	86 %
Ciprofloxacina	IV	10	2,56	0,53	ND	NA
Ciprofloxacina	IT	3,3	0,8	0,93	194	82 %
Clinafloxacina	IT	10	3,2	0,74	30,8	
Gatifloxacina	IV	10	5,31	1,06	5,32	
Gatifloxacina	IT	10	5,83	1,13	54,7	100 %
Norfloxacina	IV	10	4,65	1,21	3,27	
Norfloxacina	IT	10	4,46	1,13	41,7	100 %
Gemifloxacina	IV	8	4,54	1,04	3,72	
Gemifloxacina	IT	10	5,86	1,68	536,5	86 %
Tobramicina	IV	10	15,7	0,5	27,6	NA
Tobramicina	IT	10	13,82	1,0	5152,0	81 %

10 En estudios farmacocinéticos en rata, la administración en aerosol de las fluoroquinolonas da como resultado el aumento de ELF AUCs de 0,5 - 3 horas para todas las fluoroquinolonas probadas, así como para la tobramicina, lo que sugiere que la vía de administración en aerosol producirá un aumento de la eficacia contra las infecciones pulmonares.

15 En un modelo de ratón de infección pulmonar, se confirmó el aumento de la eficacia, sugerido por los estudios farmacocinéticos en ratas. Para todas las fluoroquinolonas probadas, la vía de administración en aerosol (intratraqueal o IT), produjo reducciones más grandes en los recuentos bacterianos que la vía de administración intraperitoneal (IP), lo que sugiere que el aumento de la eficacia observado se debió a la producción de altas concentraciones locales por la administración directa del aerosol.

Tabla 28 Modelo de eficiencia.

Fármaco	Routa ^a	Dosis (mg/kg)	DeltaLOG UFC 1 h ^b	DeltaLOG UFC 4 h ^b
Levofloxacin	IP	25	-1,00	-0,52
Levofloxacin	IT	25	-1,97	-1,28
Gemifloxacin	IP	25	-0,28	-0,32
Gemifloxacin	IT	25	-2,45	-1,81
Levofloxacin	IP	25	-1,40	-1,14
Levofloxacin	IT	25	-2,48	-1,45
Gemifloxacin	IP	25	-0,74	-0,71
Gemifloxacin	IT	25	-3,20	-2,28
Clinafloxacin	IP	25	-1,32	-1,33
Clinafloxacin	IT	25	-2,86	-2,47
Tobramicina	IP	5	-0,70	0,29
Tobramicina	IT	5	-1,59	-0,94
Ciprofloxacin	IP	25	-1,59	-0,41
Ciprofloxacin	IT	25	-2,32	-1,45
Gatifloxacin	IP	25	-0,34	-0,02
Gatifloxacin	IT	25	-1,48	-2,11
Clinafloxacin	IP	10	-0,96	-1,39
Clinafloxacin	IT	10	-2,71	-2,40
Esparfloxacin	IP	25	-0,85	0,09
Esparfloxacin	IT	25	-1,56	-0,81
Tosufloxacin	IP	25	0,00	1,33
Tosufloxacin	IT	25	-0,48	-0,24

a. Ruta de administración del fármaco,
b. Tiempo tras la administración del fármaco

Ejemplo de Referencia 5 - Caracterización de la levofloxacin en aerosol en el nebulizador PARI eFlow.

Medida del tamaño de las Partículas por Láser

- 5 El funcionamiento del dispositivo se caracterizó midiendo del tamaño de las partículas emitidas. Como ejemplo no limitante, la medida del tamaño de las partículas del aerosol emitido de la solución de la levofloxacin puede llevarse a cabo con un medidor de tamaño de partículas Malvern Spraytec en las siguientes condiciones. Las condiciones ambientales se controlan para mantener una temperatura ambiente entre 23,0 °C y 24,0 °C y una humedad relativa del 42 % al 45 %. La levofloxacin a 25 mg/mL se cargó en dos nebulizadores PARI eFlow equipados con las cabezas de nebulización "40". El programa para el medidor de tamaño de partículas Malvern Spraytec se programó para
- 10

calcular la siguiente información. A) Diámetro del volumen medio (VMD), el volumen medio de las partículas que pasan a través del haz del láser. B) Desviación Geométrica Estándar (GSD), porcentaje del diámetro 84^{vo} /porcentaje de diámetro 50^{vo} C) % de las partículas ≤ 5 micras, el porcentaje del número de partículas menores de 5 micras o el porcentaje de las partículas > 1 micra y < 7 micras, el porcentaje del número de las partículas entre 1 y 7 micras.

- 5 El dispositivo se cargó con 2 mL de la levofloxacin a 25 mg/mL. La boquilla del dispositivo se colocó con la punta de la boquilla a 2 cm desde el centro del haz en el eje x y tan cerca a la lente óptica del láser como fue posible en el eje y. El desvío del flujo ambiental acondicionado se proporcionó a través del nebulizador en una cantidad para obtener un flujo total del nebulizador de 20 LPM. El desvío del flujo ambiental acondicionado se proporcionó a través del nebulizador en una cantidad para obtener un flujo total del nebulizador de 20 LPM El nebulizador se encendió y se dejó funcionar continuamente durante 1 minuto antes de la medición. La secuencia de medición se inició después de 10 1 minuto y las mediciones se realizaron continuamente durante 1 minuto en intervalos de 1 segundo. Al final de la fase de medición, estos 60 registros se promediaron para VMD, GSD y $\% \leq 5$ micras y $\% > 1$ y < 7 micras. Por último, el nebulizador se pesó para determinar la velocidad de salida.

Estudios de Simulación de la Respiración

- 15 El funcionamiento del dispositivo se midió en condiciones similares a la inhalación natural usando un simulador de la respiración PARI Compas programado para usar el patrón del Estándar Europeo de 15 respiraciones por minuto, con una tasa de inspiración / expiración de 1:1. Estas mediciones se realizaron en condiciones ambientales que se pueden controlar para mantener una temperatura ambiente entre $23,0$ °C y $24,0$ °C y una humedad relativa del 42 % al 45 %. Para este experimento, el dispositivo PARI eFlow se cargó con 4 mL de solución de la levofloxacin a 25 mg/mL.
- 20 Se inició la simulación de la respiración, y comenzaron los nebulizadores. Los dispositivos se dejaron funcionar continuamente hasta que la nebulización cesa. La duración se midió desde el comienzo de la nebulización. Tras la nebulización, los filtros de inspiración y expiración se lavaron individualmente en una cantidad conocida de disolvente (dH_2O). La copa del nebulizador se lavó también de forma individual. Para la cuantificación, los lavados individuales se ensayaron mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 290 nanómetros, y la concentración resultante se convirtió en contenido. Usando estos datos cuantitativos, se realizó el siguiente análisis. A) Dosis Inspirada (ID), la cantidad total de fármaco ensayado del filtro inspiratorio. B) Dosis residual (RD), la cantidad de fármaco ensayada del nebulizador, al final de la nebulización. C) Dosis de Partículas Finas (FPD), el ID multiplicado por la fracción respirable (por ejemplo, % de partículas ≤ 5 micras VMD dependiendo del método usado para determinar el tamaño de las partículas emitidas desde el dispositivo seleccionado). D) Duración, tiempo desde el comienzo hasta el final de la nebulización. E) Dosis Respirable Suministrada (RDD), % ID que es, por ejemplo, ≤ 5 micras de VMD.
- 25 30

Los resultados de la Tabla 29 indican que una dosis de 100 mg de la levofloxacin deposita probablemente ~ 34 mg de la fluoroquinolona en el compartimento pulmonar en ~ 4 min usando el dispositivo PARI eFlow (Tabla 29) en comparación con la dosis de 300 mg del dispositivo PAR LC Plus que suministra una dosis equivalente en > 15 min. A partir de la "administración rápida, alta concentración" el modelo de administración y de suministro descritos en la presente descripción, mientras que el tiempo de suministro de 15 min de la LC Plus probablemente fallará, un tiempo de administración de 4 min de 35-40 mg de la levofloxacin puede satisfacer los criterios de máxima actividad de las fluoroquinolonas. Sin embargo, el aumento de la concentración del fármaco para permitir una administración más rápida (por ejemplo, 50 mg/mL en una administración de 2 mL que suministra 35-40 mg de la levofloxacin en ~ 2 min) muy probablemente cumplirá los requisitos mínimos. Además, los tiempos de administración más cortos mejorarán la conformidad del paciente por la administración. Además, se debe señalar que las soluciones hipotónicas de la levofloxacin a concentraciones mayores de 10 mg/mL se toleran mal por inhalación.

35 40

Tabla 29. Propiedades de la Levofloxacin en Aerosol (Dosis de carga de 100 mg).

Duración (minutos)	Dosis residual	Dosis inspirada	FPD (%)		RDD (mg)		VMD um	GSD um	Osmo mOs/kg
			$\leq 5u$	1-7u	$\leq 5u$	1-7u			
3,9 \pm 0,1	24,8 \pm 3,4	61,1 \pm 1,6	54,9	73,8	33,5	45,1	4,7	1,6	67 \pm 1,0

Ejemplo de Referencia 6 - Tolerancia de la levofloxacin en aerosol en un Sujeto Humano Sano. Métodos

- 45 En un solo individuo, voluntario sano, se estableció la viabilidad del suministro de la levofloxacin en aerosol usando un dispositivo de malla vibratoria Aerogen Clinical, que crea partículas de diámetro volumétrico medio (VMD) de 3,4 micras, o ~ 2 micras de MMAD (de aquí en lo adelante "Aerogen pequeño"), o usando un nebulizador PARI eFlow que produce partículas de $\sim 4,7$ micras de VMD (de aquí en lo adelante "PARI grande"). La levofloxacin se probó a una concentración de 4,25 mg/mL o 18,75 mg/mL a dosis de 10 mg, 35 mg y 55 mg, en una solución isotónica.

50

Resultados

5 En la primera prueba, se inhalan 6 mL de la solución de 4,25 mg/mL usando el nebulizador Aerogen Pequeño. El RDD estimado basándose en los estudios distintos de caracterización in vitro de los dispositivos mediante el uso de la simulación de respiración se estimó que era 10 mg. El tiempo de suministro fue de 22 minutos. No se observaron efectos adversos perceptibles en la garganta, las vías respiratorias o pulmones, durante o después de la administración, que incluyen la sensación de tos o tos, y hubo sólo un ligero sabor químico durante y después de la administración. No se observaron efectos adversos o sabor durante un período de monitorización de 30 minutos a continuación de la administración del fármaco. A esta baja concentración y dosis, y la velocidad lenta de la administración, la levofloxacina se toleró bien.

10 En la segunda prueba, se inhalan 4 ml de la solución de 18,75 mg/mL usando el nebulizador Aerogen Pequeño. El RDD estimado basándose en los estudios distintos de caracterización in vitro de los dispositivos mediante el uso del simulador de la respiración fue 35 mg. El tiempo de suministro para la administración del fármaco fue de 14 minutos. A pesar del aumento de la dosis, la tolerancia aguda fue muy comparable con la de la primera prueba, tanto durante como después de la administración. El sabor, que fue más fuerte, fue que la solución que tuvo un sabor químico más amargo/metálico característico de la levofloxacina. El sabor fue más discernible durante un período de unos pocos minutos después del final de la administración, nuevamente una característica de la levofloxacina.

15 En la tercera prueba, se inhalan 4 mL de la solución de 18,75 mg/mL usando el dispositivo PARI Grande. La RDD estimada basándose en los estudios distintos de caracterización in vitro de los dispositivos fue ~55 mg (usando la definición FPD < 5 micras). El tiempo de suministro para la administración del fármaco fue de ~5 minutos. A pesar de que el tamaño de la partícula y la tasa de administración del fármaco aumentaron significativamente en comparación con la prueba 2, no se experimentaron efectos adversos en la garganta, las vías respiratorias o los pulmones, aparte de los efectos agudos de sabor que se señalaron anteriormente, que incluyen la sensación de tos o toser, a lo largo del periodo de administración y durante un periodo de observación de 30 minutos después de la administración de la dosis. La recuperación urinaria del fármaco, que es una medida exacta de la exposición, confirma que la dosis respirable proyectada de aproximadamente 55 mg se administró con éxito.

20 Estos resultados demuestran la viabilidad de la administración en aerosol de levofloxacina en un sujeto humano a las concentraciones intermedias probadas, y sugieren que son alcanzables concentraciones y dosis superiores, adecuadamente formuladas para la tolerabilidad y el gusto.

Ejemplo de Referencia 8 –Preformulación de Base de levofloxacina.

30 El objetivo de este estudio fue caracterizar la base de la levofloxacina para entender las capacidades físico-químicas y las restricciones de la base de la levofloxacina para varios enfoques de formulación. El propósito de este estudio fue caracterizar las propiedades físico-químicas de la base de la levofloxacina.

Preformulación

Estudios pH-Solubilidad

35 La solubilidad de la levofloxacina se determinó en función del pH. Primero se prepararon tampones en el intervalo de pH 2-10. Pequeñas alícuotas de cada tampón (~200 a 250 μ L) se saturaron con el fármaco y se agitaron para lograr la solubilidad en equilibrio. Las muestras se centrifugaron y en los sobrenadantes se analizó el fármaco disuelto por UV o HPLC. Los tampones usados en este estudio mostraron que afectan al resultado de la solubilidad (debido a que los diferentes contraiones de los tampones pueden formar diferentes formas de sal de levo en solución). Por lo tanto, el pH-solubilidad se evaluará también en ausencia de los tampones (a través de la titulación).

Determinación del pKa

El pKa de la levofloxacina se determinó por volumetría. Los valores de pKa obtenidos se confirmaron por espectrofotometría UV. Esta información se usó para ayudar en la selección de la sal para la levofloxacina y para determinar la carga de la levofloxacina bajo las condiciones de pH en el pulmón.

45 Preformulación para el Sistema Líquido

Se investigó la viabilidad de una formulación líquida usando (a) la solubilidad y (b) la tensión superficial como parámetros basales para la formulación sólo con solución salina.

Estudios de preformulación sobre levofloxacina

Método de transferencia por HPLC

50 Metodología Experimental

Se usó un método de HPLC para evaluar la linealidad, exactitud y precisión del ensayo de la levofloxacina. Se usó una columna de 50 mm X 4,6, Onyx Monolítica C18 (Phenomenex) a 30 °C. La fase móvil consistió en 85 % de TFA

al 0,1 % en agua y 15 % 0,1 % de TFA en acetonitrilo. El caudal se ajustó a 3 mL/min. Las muestras se inyectaron en el sistema cromatográfico y el eluyente se monitorizó a 277 nm.

Resultados

- 5 El tiempo de retención para la levofloxacin fue de aproximadamente 0,82 min. Se observó que el ensayo fue lineal en un rango de 5 a 15 µg/mL, con un coeficiente de correlación de 1.000. La RSD (desviación estándar relativa) fue menos del 0,5 % y la precisión estuvo dentro del 98-102%.

Estudios de pH-solubilidad

Por titulación

Metodología Experimental

- 10 Una solución saturada de la levofloxacin en HCl 0,1 N se tituló con NaOH. Después de cada adición de la base, la solución se agitó en vórtice. Se retiró una alícuota de la solución de muestra, se centrifugó y el sobrenadante se analizó mediante espectroscopia UV a 288 nm. La misma solución se tituló de nuevo con HCl.

Resultados

- 15 El perfil del pH-solubilidad de la levofloxacin se muestra en la Figura 12. Por volumetría la levofloxacin exhibió una solubilidad de 25,4 mg/mL a pH 7,3. Sin embargo, al contrario que los resultados de los experimentos de agitación, la solubilidad por volumetría disminuyó por debajo de pH 6,5 lo que se puede atribuir al efecto del ión común. Dado que una solución de levofloxacin se preparó en HCl, se habría formado una sal de hidrocloreto de la levofloxacin en la solución. Además, la adición de iones cloruro en forma de ácido clorhídrico reduciría la solubilidad de la sal de hidrocloreto.
- 20

Determinación de pKa

Por Volumetría

Metodología Experimental

- 25 Se preparó una solución de la levofloxacin (18 mg/g) en agua (18,45 mg/g). El pH inicial de la solución fue de 7,36. Esta solución se tituló con HCl 1 N. Se añadieron alícuotas medidas de HCl y se registró el pH después de cada adición. La titulación continuó hasta un pH de 1.

Para determinar el pKa ácido, una solución de la levofloxacin (18,38 mg/g) se preparó en HCl 0,1 N. El pH inicial de la solución fue de 1,32. La solución se tituló con NaOH 1 N. La titulación continuó hasta un pH de 6,55.

Resultados

- 30 La figura 13 muestra un gráfico del pH frente al volumen del titulante añadido para la titulación de la levofloxacin con HCL. Este dato se ajustó en la siguiente ecuación:

$$V_t [\text{OH}^-] = K_b \cdot V_{ep} - K_b \cdot V_t$$

donde,

V_t = Volumen del titulante añadido

- 35 V_{ep} = volumen del titulante añadido hasta el punto de equivalencia

$[\text{OH}^-]$ = concentración de iones hidróxido = $K_w / [\text{H}^+]$

$[\text{H}^+]$ = concentración de iones hidronio = 10^{pH}

Un gráfico de $V_t [\text{OH}^-]$ frente a V_t generó una línea recta (Figura 14). Los datos que se muestran son de la región del punto de pre-equivalencia. A partir de la pendiente se obtiene

- 40 pendiente: $K_b = 2,09 \times 10^{-8}$

$$\text{p}K_b = -\log K_b = 7.7$$

$$pK_a = 14 - pK_b = 6.3$$

La Figura 15 muestra un gráfico de pH frente al volumen de titulante añadido para la titulación de la levofloxacina con NaOH. El pKa ácido fue difícil de calcular porque fue bastante bajo (< 2,0). Sin embargo, se puede hacer una aproximación del pKa con el pH en la mitad del punto de equivalencia. A partir de la representación de dpH/DV frente al volumen del titulante (V_t) (Figura 16), el punto de equivalencia es a 250 μ l. El pH en mitad del punto de equivalencia (es decir, cuando $V_t = 125 \mu$ l) es 1,6. Así que el pKa ácido es $\sim 1,6$.

Por espectroscopía UV

Metodología Experimental

Se prepararon soluciones diluidas de la levofloxacina (0,013 mg/mL) en varios tampones. Los tampones que se usaron fueron HCL (pH 1,2), acetato (pH 4,5), fosfato (pH 6,7,8) y borato (9,10). Las soluciones de la levofloxacina se analizaron por espectroscopía UV a 257 nm.

Resultados

Se muestra un gráfico del pH frente a la absorbancia de la solución de la levofloxacina a 257 nm en la Figura 17. Estos datos se ajustaron en una ecuación de Henderson Hasselbach modificada:

$$Abs_{\text{observado}} = Abs_{HA} \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} + Abs_{A^-} \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]}$$

15

donde,

$Abs_{\text{observado}}$ = Absorbancia de la solución de la levofloxacina

Abs_{HA} = Absorbancia de la solución de la levofloxacina a pH 1,2 ;

Abs_{A^-} = Absorbancia de la solución de la levofloxacina a pH 7,8;

20 $[H^+]$ = concentración de iones hidronio = 10^{-pH}

La ecuación ajustada proporciona una estimación de pKa = 5,91.

Ejemplo 11 - Complejos de Iones Metálicos de la levofloxacina.

El objetivo de este estudio fue preparar levofloxacina de diversas formas de sales de quelatos para obtener un aumento de las propiedades de enmascaramiento del sabor, propiedades para mejorar el perfil de AUC por medio de cambios en la solubilidad, disolución y/o biodisponibilidad. Estos beneficios pueden mejorar las propiedades farmacodinámicas de la levofloxacina después de la administración pulmonar usando una suspensión de nanopartículas, inhalación de polvo seco o formulaciones líquidas simples. Estas formulaciones se pueden optimizar para crear formulaciones para mejorar el perfil de AUC de la levofloxacina a partir de quelatos de solubilidad alterada o de liberación lenta o de baja biodisponibilidad. Estas propiedades también pueden incorporarse en otros antibióticos de la fluoroquinolona, que incluyen, sin limitación la gemifloxacina, la gatifloxacina, la norfloxacina, la tosufloxacina, la sarafloxacina, sitafloxacina, la prulifloxacina, y la pazufloxacina. Además están en marcha los estudios para caracterizar varias formas de quelatos de la gemifloxacina para enmascarar el sabor, mejorar el perfil de AUC, la suspensión de nanopartículas y la administración mediante inhalación de polvo seco.

Preparación de Complejos de Iones Metálicos-Levofloxacina

35 Estudios preliminares

Se solubilizó una mezcla de la levofloxacina y una sal de un catión concreto en agua desionizada y se tituló con hidróxido de sodio. La curva de titulación se comparó respecto de una obtenida para la levofloxacina sola para evaluar la formación del complejo de metal-levofloxacina como se describe en Physical Pharmacy (4ª Edición) por Alfred Martin (págs 261-263). Después se evaluaron sales de diferentes cationes metálicos (por ejemplo, Ca²⁺, Mg²⁺, etc.) para identificar el/los candidato(s) adecuado(s) para las evaluaciones subsiguientes. Además se evaluaron diferentes proporciones molares de cationes y de la levofloxacina.

Preparación de Complejos

Las soluciones de la levofloxacina se titularon respecto de soluciones acuosas de sales metálicas seleccionadas Las

titulaciones se llevaron a cabo a un pH constante. La formación de complejos se controló por diferentes métodos, que incluyen la volumetría, espectrofluorometría, solubilidad, etc., según procedió. El punto final de la reacción de complejación dependió del método adoptado.

Caracterización de los Complejos de Levofloxacin

- 5 Los complejos de cationes metálicos-levofloxacin se caracterizaron con respecto a su estequiometría, las constantes de formación y la cinética de disociación usando la metodología adecuada.

Objetivos

Formular y caracterizar los complejos de la levofloxacin con los cationes metálicos (di- y trivalentes).

10 Evaluación de la Complejación

Las investigaciones preliminares sugieren que la levofloxacin forma complejos solubles con cationes metálicos. Como resultado, la evaluación del proceso de la complejación por precipitación no fue posible. Otros enfoques que se intentaron se describen más abajo.

Volumetría

- 15 Este enfoque se basa en la suposición de que la porción del ácido carboxílico de la levofloxacin está involucrada en la complejación con un catión metálico dado y que la complejación da como resultado la liberación de un protón de la levofloxacin. La concentración de los protones liberados sería, por lo tanto, proporcional al grado de la complejación (dependiendo de la constante de unión) y la estequiometría del complejo (Physical Pharmacy: 4ª Edición por Alfred Martin; págs 261-263).

20 Metodología Experimental

- Aproximadamente 0,35 mmoles de la levofloxacin (en 16 mL de agua desionizada) se titularon con NaOH 6 N en presencia y en ausencia de la sal de un catión metálico (equimolar). Las soluciones de la levofloxacin se acidificaron a valores de pH inferiores a 2,0 con HCl 6 N antes de la titulación con NaOH. Las sales de cationes metálicos usadas incluyen cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro ferroso, cloruro de zinc, sulfato de aluminio y cloruro de aluminio.

Resultados

- 30 Como se muestra en la Figura 18, las titulaciones realizadas en presencia de cationes de metales dieron como resultado un cambio positivo de las curvas de titulación en comparación con la obtenida con la levofloxacin sola, lo que sugiere que el NaOH adicional (reactivo de valoración) se requiere para obtener un pH específico de la solución en presencia de un catión metálico. La magnitud del cambio en la curva de titulación en cualquier punto representaría los moles de protones liberados debido a la complejación, y por lo tanto los moles de la levofloxacin complejada.

El grado de la complejación (unión y/o estequiometría) parece aumentar en el orden de $\text{Ca}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Zn}^{2+} = \text{Fe}^{2+} < \text{Al}^{3+}$, lo que está razonablemente en concordancia con la bibliografía existente.

- 35 Nota: Se observó en la bibliografía que el cloruro de aluminio y el sulfato de aluminio tienen propiedades similares al ácido y pueden disminuir el pH de las soluciones acuosas. Consecuentemente, las curvas de titulación obtenidas con AlCl_3 y $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ no pueden proporcionar información concluyente sobre la complejación con la levofloxacin.

Titulación doble

- 40 En este enfoque la solución de la levofloxacin se tituló con una solución de un catión metálico concreto para observar una caída del pH presumiblemente debida a la liberación de protones a través de la complejación. A continuación se añadió NaOH para revertir al pH inicial de la solución de la levofloxacin (antes de la adición de la solución del catión). Esto permite determinar la fracción de la levofloxacin en la forma complejada a un pH dado.

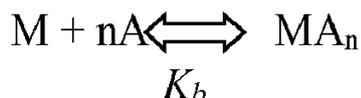
Metodología Experimental

- 45 Aproximadamente 1,55 - 1,72 mmoles de la levofloxacin se solubilizaron en agua desionizada y la solución resultante se acidificó con HCl 6 N hasta el pH inicial deseado. Esta solución de la levofloxacin acidificada se tituló con un volumen conocido de solución concentrada de un catión metálico dado (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+}). El cambio en el pH se neutralizó (al pH inicial) por la adición de NaOH 6N y se registró el volumen de la solución de NaOH añadido. La adición de la solución del catión metálico seguido por la neutralización con NaOH continuó hasta que otra adición de la solución del catión metálico no pudo dar un cambio de pH de la solución de la levofloxacin, lo que indicaría el punto final de la complejación. Las cantidades acumuladas del catión metálico añadido se representaron frente a las cantidades acumuladas de NaOH requerido para neutralizar el cambio de pH (Figuras 19-22).

Resultados

5 A partir de las Figuras 19-22, las regiones de la meseta se extrapolaron para obtener la cantidad total de NaOH requerida para neutralizar el cambio en el pH debido a la complejación. Estos valores además representan las cantidades de la levofloxacinina en la forma complejada (suponiendo que la complejación de la levofloxacinina da como resultado una liberación equimolar de protones). Las cantidades de la levofloxacinina en la forma complejada con Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} son 0,8, 1,0, 1,3 y 1,1 mmoles, respectivamente. Estos representan el 46,5, 64,5, 77,8 y 64,5 % de la complejación de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} , respectivamente. Se debería señalar que el % de complejación dependerá de las concentraciones totales de la levofloxacinina.

10 Las constantes de unión, así como la estequiometría de la complejación para los complejos de la levofloxacinina con los cationes metálicos se determinaron como sigue:



Donde M, A y MA_n representan el catión metálico, levofloxacinina y el complejo, respectivamente. K_b sería la constante de equilibrio de unión. La reacción anterior supone que "n" moles de la levofloxacinina reaccionan con un mol de metal para producir un mol de complejo.

$$K_b = [MA_n] / \{ [M][A]^n \} \text{ (Unidades } M^{-n}) \text{ ----- Ec. 1}$$

15

$[MA_n]$ es la concentración del complejo formado,

$[M]$ y $[A]$ son las concentraciones del metal sin unir y levofloxacinina sin unir, respectivamente.

Reordenando ecuación 1,

$$[MA_n] / [A]^n = K_b * [M] \text{ ----- Ec. 2}$$

20

$$[A] = [A]_{\text{Total}} - [A]_{\text{unido}} = [A]_{\text{Total}} - [\text{NaOH}]_{\text{usado}}$$

$$[M] = [M]_{\text{Total}} - [M]_{\text{unido}} = [M]_{\text{Total}} - [\text{NaOH}]_{\text{usado}} / n$$

$$[MA_n] = [A]_{\text{unido}} / n = [\text{NaOH}]_{\text{usado}} / n$$

Nota: $[\text{NaOH}]_{\text{usado}}$ es la concentración de hidróxido de sodio usada en cualquier punto dado para neutralizar el cambio en el pH causado por la adición de catión metálico (presumiblemente debido a la complejación).

25

La ecuación 2 se puede modificar para obtener,

$$[A]_{\text{unido}} / [A]^n = nK_b * [M] \text{ ----- Ec. 3}$$

Se deduce de la ecuación 3 que un gráfico de $[M]$ frente a $[A]_{\text{unido}} / [A]^n$ daría como resultado una línea recta con una pendiente de nK_b cuando,

$n = 1$, para un complejo de 1:1

30

$n = 2$, para un complejo de 2:1

$n = 3$, para un complejo de 3:1 etc.

Más abajo se muestran en las Figuras 23-26 los gráficos para el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} , respectivamente.

35

Como se muestra en las Figuras 23-26, para cada uno de los cationes evaluados, un gráfico de $[A]_{\text{unido}} / [A]^n$ frente a $nK_b * [M]$ fue lineal cuando $n=2$ (para Ca^{2+} $n=2$ dio como resultado un mejor ajuste que $n=1$). Estos resultados sugieren que los complejos de la levofloxacinina con el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} se forman con una estequiometría de 2 moles de fármaco por mol de catión (2:1).

Al usar $n=2$, las constantes de unión para los complejos anteriores se pueden determinar a partir de las pendientes de las respectivas representaciones lineales.

Las constantes de unión para complejos 2:1 representados como $\log(K_b)$ son como sigue: $\text{Ca}^{2+} = 2,75$, $\text{Mg}^{2+} = 3,69$, $\text{Zn}^{2+} = 4,44$, $\text{Fe}^{2+} = 4,54$.

Solubilidad

5 Este método permite una forma relativamente sencilla de determinar la estequiometría de la complejación. El enfoque implicó la evaluación de la solubilidad del fármaco (levofloxacin) en presencia de concentraciones crecientes de agente de complejación (un catión metálico determinado). La solubilidad total del fármaco (complejado + sin complejar) se esperó que aumentara linealmente debido a la complejación y que alcanzase la meseta correspondiente a la solubilidad de saturación tanto del fármaco como el complejo. La determinación de la estequiometría de una curva de solubilidad de este tipo se explica con detalle en otra parte (Physical Pharmacy: 4ª edición por Alfred Martin; págs 10 265).

Metodología Experimental

Se agitaron las cantidades en exceso de la levofloxacin (las cantidades se registraron), en presencia de concentraciones crecientes de MgCl_2 , con tampón MES 25 mM (pH 5,99) usando un mezclador de vórtice. Las muestras se filtraron después y el filtrado se diluyó apropiadamente y se analizó espectrofotométricamente para determinar las concentraciones de la levofloxacin (Figura 27). 15

Resultados

Como se muestra en la Figura 27, la solubilidad de la levofloxacin se incrementó con el aumento de las concentraciones de MgCl_2 . Sin embargo, más allá de la solubilidad de la meseta (levofloxacin ~ 650 mM), se observó un aumento adicional de la solubilidad, que no es consistente con el perfil esperado. Esto se atribuyó al efecto de la fuerza iónica sobre la solubilidad de la levofloxacin. Es importante tener en cuenta que el pH final de todas las soluciones fueron constantes, aunque mayor que 5,99 (final pH ~7,0). 20

Posteriormente, el experimento se repitió a una fuerza iónica constante de ~1,0 M (ajustada con NaCl) y con tampón MES 0,5 M (pH 5,99) para aumentar la capacidad tamponadora de la solución (Figura 28).

Espectrofluorimetría

25 Este enfoque se adoptó para evaluar la complejación de la levofloxacin basándose en las pruebas de la bibliografía existente de que el proceso de complejación está asociado a un cambio en las propiedades de fluorescencia de la fluoroquinolona. Al monitorizar el cambio en la emisión de la fluorescencia de la levofloxacin en presencia de diferentes concentraciones de un catión metálico concreto fue posible determinar la constante de unión de la complejación, así como la estequiometría.

30 Metodología Experimental

La emisión de fluorescencia de la levofloxacin se evaluó a longitudes de onda de excitación y de emisión de 298 nm y 498 nm, respectivamente. Se realizaron estudios a dos valores diferentes de pH, es decir 5,0 (acetato) y 9,0 (histidina). Una serie de soluciones que contenían una concentración constante de la levofloxacin, pero concentraciones crecientes de un catión dado se analizaron a con respecto a la emisión de fluorescencia debida a la levofloxacin. Las sales metálicas estudiadas incluyeron CaCl_2 , MgCl_2 , FeCl_2 , ZnCl_2 y $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. 35

Resultados

Como se muestra en la Tabla 30, se obtuvieron datos significativos sólo para el Fe^{2+} y Zn^{2+} . Para los cationes restantes, las concentraciones relativas de la levofloxacin y el catión necesitan ser optimizadas adicionalmente para observar una tendencia específica en el cambio en la fluorescencia de la levofloxacin.

40 La influencia de las concentraciones crecientes de Fe^{2+} y Zn^{2+} sobre la emisión de fluorescencia de la levofloxacin se muestra en las Figuras 29 y 30 respectivas.

Como se describió anteriormente, tanto Fe^{2+} como Zn^{2+} parecen formar complejos 2:1 con la levofloxacin; sin embargo, su influencia en la fluorescencia de la levofloxacin son diferentes (Figuras 29 y 30). La razón exacta de esto no está clara en este punto.

45 Tabla 30. Características de la Fluorescencia de la levofloxacin en presencia de cationes.

Cation	Fluorescencia de la levofloxacin		Resultados	Comentarios
	pH 5,0	pH 9,0		
Ca^{2+}	Cambios no significativos	Cambios no significativos	N/A	-

Cation	Fluorescencia de la levofloxacin		Resultados	Comentarios
	pH 5,0	pH 9,0		
Mg ²⁺	Cambios no significativos	Cambios no significativos	N/A	-
Fe ²⁺	Disminuci3n de la emisi3n con el aumento de Fe ²⁺	N/A	Figura 3.12 (pH 5,0)	FeCl ₂ insoluble a pH 9,0
Zn ²⁺	Cambios no significativos	Aumento de la emisi3n con el aumento de Zn ²⁺	Figura 3.13 (pH 9,0)	-
Al ³⁺	Cambios no significativos	N/A	N/A	Al ₂ (SO ₄) ₃ insoluble a pH 9,0

Muestras de complejos de la Levofloxacin

Se evaluaron siete muestras de complejos de la levofloxacin *in vivo* con respecto a para la eficacia y la farmacocin3tica. Los detalles de las muestras probadas se muestran en la Tabla 31 siguiente.

5 Tabla 31. Proporciones Molares de los Complejos de la levofloxacin.

Identificador de la muestra	Cation	Proporci3n molar usada	Levofloxacin total (mg/mL)	pH final de la soluci3n
NB-049-001-06-066A	Mg ²⁺	1:1	40,2	6,24
NB-049-001-06-066B	Fe ²⁺	1:1	40,1	6,30
NB-049-001-06-066C	Mg ²⁺	1:1	202	5,98
NB-049-001-06-081A	Ca ²⁺	1:1	40,1	6,53
NB-049-001-06-081B	Ca ²⁺	1:1	201	6,04
NB-049-001-06-081C	Zn ²⁺	1:1	40	6,33
NB-049-001-06-081D	Zn ²⁺	1:1	200	5,69

Conclusiones y Pr3ximas Etapas

10 Los resultados obtenidos de los estudios de doble titulaci3n sugieren que la levofloxacin forma complejos 2:1 con todos los cationes met3licos divalentes. Las constantes de uni3n (log K_b) para la complejaci3n con Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ y Zn²⁺ son 2,75, 3,69, 4,44 y 4,54, respectivamente.

Ejemplo de Referencia 12 – Formulaciones de la levofloxacin y gemifloxacin con 3cidos org3nicos.

Metodolog3a Experimental

15 La soluci3n de la levofloxacin se prepar3 disolviendo 50 o 100 mg de la base de levofloxacin en 15-20 mL de agua. El pH inicial de la soluci3n de la levofloxacin en agua fue de aproximadamente 7,3. El pH de la soluci3n se ajust3 con aproximadamente soluci3n del 10 % de 3cido preparada en agua. Se usaron los siguientes 3cidos para ajustar el pH de la soluci3n de la levofloxacin: 3cido ac3tico, 3cido asc3rbico, 3cido c3trico, l3ctico, tart3rico y propi3nico. Despu3s de aumentar el volumen de la soluci3n a aproximadamente 90 % del volumen final, se midi3 la osmolalidad de la soluci3n y se ajust3 a 300 mOsm/kg con una soluci3n de aproximadamente un 20 % de cloruro s3dico preparada en agua. Despu3s de ajustar el pH y la osmolalidad, el volumen de la soluci3n se llev3 hasta aproximadamente 25 mL
20 con agua y se midi3 su tensi3n superficial. El pH y la osmolalidad se midieron despu3s de aumentar el volumen y se enumeran en la Tabla 32. (Las cantidades exactas de la levofloxacin pesada, el 3cido requerido para ajustar el pH, el cloruro s3dico para ajustar la osmolalidad y el volumen final de las soluciones se enumeran en la Tabla 32). El contenido de la levofloxacin en las soluciones se determin3 mediante HPLC.

Resultados

Los detalles acerca de las formulaciones de la levofloxacina con ácidos orgánicos se muestran en la Tabla 32. Los resultados de HPLC se muestran en la Tabla 33.

5 Cuando se usó ácido tartárico para ajustar el pH de la solución de la levofloxacina de 100 mg/mL, se formó un precipitado.

Nota: Las soluciones con ácido acético, ácido cítrico y ácido ascórbico se prepararon nuevamente para el análisis por HPLC y por lo tanto, la concentración teórica de estas soluciones en la Tabla 32 y la Tabla 33 son diferentes.

Tabla 32. Formulaciones de la Levofloxacina con Ácidos Orgánicos.

Peso de levo usado (g)	9,94% de ácido acético usado (ml)	Ácido acético usado (g)	19,7% NaCl usado (ml)	NaCl usado (g)	Vol final de la solución medido (ml)	Conc Levo (mg/ml)	Osmolalidad final (mOsm/kg)	pH Final	Tensión superficial (mN/m)
1,253	1,05	0,104	0,681	0,134	25,105	49,9	312	6,48	63,2
2,501	2,05	0,204	0,326	0,064	25,935	96,4	300	6,53	62,5
peso de Levo usado (g)	9,99 % ácido ascórbico usado (ml)	Ácido ascórbico usado (g)	19,7% de NaCl usado (ml)	NaCl usado (g)	Vol final de la solución medido (ml)	Conc de levo (mg/ml)	Osmolalidad final (mOsm/kg)	pH final	Tensión superficial (mN/m)
1,253	3,400	0,339	0,550	0,108	25,135	49,8	297	6,40	64,4
2,505	7,400	0,739	0,300	0,059	25,135	99,7	298	6,47	62,5
Peso de Levo usado (g)	10,05 % ácido cítrico usado (ml)	Ácido cítrico usado (g)	21,54 % de NaCl usado (ml)	NaCl usado (g)	Vol final de la solución medido (ml)	Conc de levo (mg/ml)	Osmolalidad final (mOsm/kg)	pH final	Tensión superficial (mN/m)
1,251	1,25	0,126	1,005	0,216	25,12	49,8	299	6,54	61,5
2,498	2,6	0,261	0,918	0,198	25,82	96,7	301	6,53	61,4
Peso de Levo usado (g)	10 % ácido láctico usado (ml)	Ácido láctico usado (g)	21,54 % de NaCl usado (ml)	NaCl usado (g)	Vol final de la solución medido (ml)	Conc de levo (mg/ml)	Osmolalidad final (mOsm/kg)	pH final	Tensión superficial (mN/m)
1,258	2,1	0,21	0,745	0,160	25,135	50,1	297	6,54	59,4
2,497	4,2	0,42	0,392	0,084	25,605	97,5	301	6,63	57,5
Peso de Levo usado (g)	10 % ácido tartárico usado (ml)	Ácido tartárico usado (g)	21,54% NaCl usado (ml)	NaCl usado (g)	Vol final de la solución medido (ml)	Conc de levo (mg/ml)	osmolalidad final (mOsm)	pH final	Tensión superficial (mN/m)
1,252	1,55	0,155	0,948	0,204	25,180	49,7	298	6,51	61,5
Peso de Levo	9,79 % ácido propiónico	Ácido propiónico	21,53% NaCl usado	NaCl usado (g)	Vol final de la solución	Conc de levo	osmolalidad final	pH final	Tensión superficial

ES 2 685 315 T3

Peso de levo usado (g)	9,94% de ácido acético usado (ml)	Ácido acético usado (g)	19,7% NaCl usado (ml)	NaCl usado (g)	Vol final de la solución medido (ml)	Conc Levo (mg/ml)	Osmolalidad final (mOsm/kg)	pH Final	Tensión superficial (mN/m)
usado (g)	o usado (ml)	usado(g)	(ml)		medido (ml)	(mg/ml)	(mOsm)		(mN/m)
1,25281	1,310	0,128	0,737	0,159	25,045	50,02	298	6,50	58,1
2,51342	2,610	0,256	0,310	0,067	25,030	100,42	297	6,57	52,0

* Concentración teórica = Cantidad teórica de gemifloxacina en la solución filtrada (en este caso 35 mg de gemifloxacina en 1,3 mL filtrados)/Volumen final de la solución (en este caso 1,7 mL).

Tabla 33. Concentraciones teóricas y medidas de las formulaciones de la Levofloxacina.

Ácido	Conc teórica, (mg/mL)	Concentración medida (mg/ml) por HPLC
Ácido acético	50,05	51,45
Ácido acético	99,9	102,32
Ácido cítrico	49,91	50,31
Ácido cítrico	99,86	102,99
L-Ácido ascórbico	49,95	50,01
L-Ácido ascórbico	100	102,49
Ácido láctico	50,05	50,07
Ácido láctico	97,54	95,27
Ácido tartárico	49,74	51,07

Nota: Las soluciones con ácido acético, ácido cítrico y ácido ascórbico se prepararon nuevamente para el análisis por HPLC y por lo tanto, la concentración teórica de estas soluciones en la Tabla 32 y la Tabla 33 son diferentes,

5 Ejemplo de Referencia 13 - Toxicología de la inhalación en Ratas.

En un estudio de dosis ascendente no GLP de levofloxacina aerosolizada en ratas Sprague-Dawley macho y hembra durante 4 días, una solución de 25 mg/mL de la levofloxacina se administró durante una hora en el primer día y una solución de 50 mg/mL de la levofloxacina se administró durante dos horas por día en los días 2 al 4. No se observaron signos clínicos de toxicidad durante el período de tratamiento. La necropsia a las 24 horas después de la administración de la última dosis no mostró hallazgos.

En un estudio GLP de la levofloxacina en aerosol en ratas Sprague-Dawley macho y hembra, la levofloxacina en aerosol se administró diariamente con una dosis promedio de 6,92 mg/kg/día para los machos y 10,04 mg/kg/día para las hembras durante 4 días usando un dispositivo de suministro de aerosol sólo para la nariz. Las exposiciones totales fueron de 29 y 42 mg/kg para los machos y hembras, respectivamente, durante el período de estudio. Cada dosis se suministró a lo largo de 2 horas diarias. La dosis para este estudio se seleccionó basándose en la solubilidad máxima de la levofloxacina que pudo administrarse en el dispositivo a lo largo de 2 horas. No se observaron signos clínicos de toxicidad, y todos los animales sobrevivieron durante el período de tratamiento de 4 días. La necropsia de los animales después de la administración de la última dosis no mostró hallazgos.

En un estudio GLP en ratas Sprague-Dawley durante 28 días, los animales se aleatorizaron a 3 niveles de dosis de la levofloxacina en forma de aerosol o solución salina. También se trató a grupos de recuperación adicionales mediante el uso de control con vehículo y la dosis más alta y se observaron durante un periodo de recuperación de 14 días después de la última dosis. Las dosis promedio de la levofloxacina en aerosol fueron 1,49, 3,63, y 7,29 mg/kg/día para

5 las ratas macho y 2,20, 5,35 y 11,01 mg/kg/día en las ratas hembra. Las exposiciones totales durante el período de tratamiento de 28 días osciló entre 41,7 y 204,1 mg/kg para los machos y 61,6 y 308,3 mg/kg para las hembras. Cada dosis se suministró a lo largo de 2 horas diarias. No se observaron signos clínicos de toxicidad relacionados con las dosis, y todos los animales sobrevivieron durante el período de tratamiento de 28 días. La necropsia de los animales después de la administración de la última dosis mostró una hiperplasia de células escamosas de la laringe relacionada con la dosis cuya gravedad se redujo durante un periodo de recuperación de 14 días.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un aerosol de una solución que comprende levofloxacinina u ofloxacinina y un catión divalente o trivalente, y dicho método comprende:
obtener una solución que comprende levofloxacinina u ofloxacinina y un catión divalente o trivalente; y
- 5 aerosolizar dicha solución para conseguir un aerosol que comprende un diámetro aerodinámico mediano de masa de 5 µm o menos, en el que dicho aerosol es adecuado para la inhalación en un pulmón.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha aerosolización comprende nebulizar dicha solución con un nebulizador, preferiblemente un nebulizador de malla vibrante o un nebulizador accionado por compresor.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el catión divalente o trivalente se selecciona del grupo que consiste en magnesio, calcio, aluminio, zinc y hierro.
- 10 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la solución tiene una concentración de ión permeante de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 400 mM, preferiblemente de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM, más preferiblemente de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 200 mM.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el ión permeante se selecciona de cloruro y bromuro.
- 15 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la solución tiene una concentración de levofloxacinina u ofloxacinina de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 700 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 7 mg/ml a 700 mg/ml, preferiblemente más de aproximadamente 25 mg/ml, más preferiblemente más de aproximadamente 35 mg/ml, aún más preferiblemente más de aproximadamente 40 mg/ml, muy preferiblemente más de aproximadamente 50 mg/ml, y/u opcionalmente en el que la solución tiene una osmolalidad de aproximadamente 200 mOsmol/kg a aproximadamente 1250 mOsmol/kg, preferiblemente de aproximadamente 250 mOsmol/kg a aproximadamente 1050 mOsmol/kg, más preferiblemente de aproximadamente 350 mOsmol/kg a aproximadamente 750 mOsmol/kg; y/u opcionalmente en el que la solución tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5, preferiblemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0, más preferiblemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5.
- 20 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la solución comprende magnesio y más de aproximadamente 50 mg/ml de levofloxacinina, y tiene una osmolalidad de aproximadamente 350 mOsmol/kg a aproximadamente 750 mOsmol/kg, y un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el aerosol tiene un diámetro aerodinámico mediano de masa de aproximadamente 2 micras a aproximadamente 5 micras con una desviación estándar geométrica menor de o igual a aproximadamente 2,5 micras, preferiblemente de aproximadamente 2,5 micras a aproximadamente 4,5 micras con una desviación estándar geométrica menor de o igual a aproximadamente 1,8 micras, más preferiblemente de aproximadamente 2,8 micras a aproximadamente 4,3 micras con una desviación estándar geométrica menor de o igual a aproximadamente 2 micras.
- 30 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la solución comprende además un componente seleccionado del grupo que consiste en un edulcorante, segundo antimicrobiano, dornasa alfa, una formulación hipertónica, manitol, y cloruro sódico.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el segundo antimicrobiano se selecciona del grupo que consiste en un aminoglucósido, polimixina, monobactama, macrólido, cetólido, glicopéptido y fluoroquinolona.
11. El método de la reivindicación 9, en el que el aminoglucósido es tobramicina, la polimixina es colistina, la monobactama es aztreonam, el glicopéptido es vancomicina o la fluoroquinolona se selecciona del grupo que consiste en lomefloxacinina, pefloxacinina, ciprofloxacina, gatifloxacina, gemifloxacina, moxifloxacina, tosufloxacina, pazufloxacina, rufloxacina, fleroxacinina, balofloxacina, esparfloxacina, trovafloxacina, enoxacinina, norfloxacina, clinafloxacina, grepafloxacina, sitafloxacina, temafloxacina, marbofloxacina, orbifloxacina, sarafloxacina, danofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, garenoxacinina, prulifloxacina, olamufloxacina, DX-619, TG-873870 y DW-286.
- 40 12. Una composición farmacéutica que comprende una solución acuosa de levofloxacina u ofloxacina y un catión divalente o trivalente, en la que la solución es adecuada para la inhalación en un pulmón.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, que comprende una solución acuosa de levofloxacina y un catión divalente o trivalente.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en la que el catión divalente o trivalente se selecciona de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y Al^{3+} .
- 50 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 o 13, en la que el catión es un catión divalente seleccionado de magnesio o calcio.

16. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en la que el catión es Mg^{2+} .

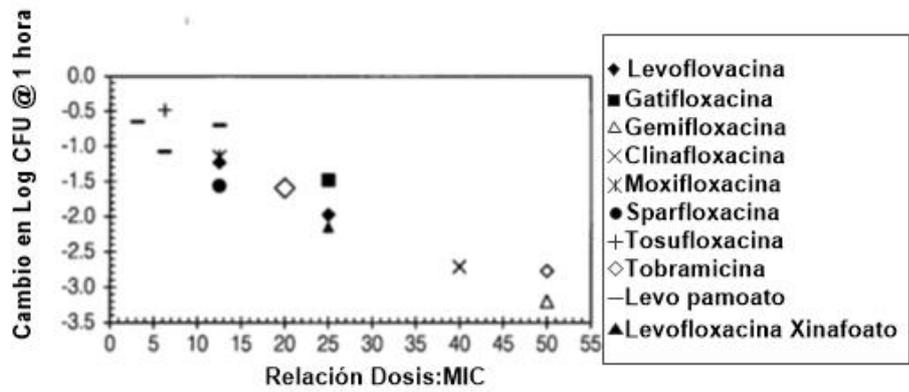


Figura 1

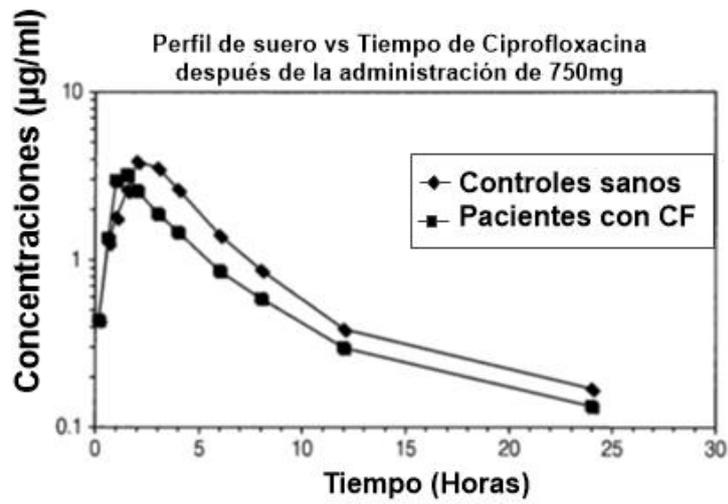


Figura 2

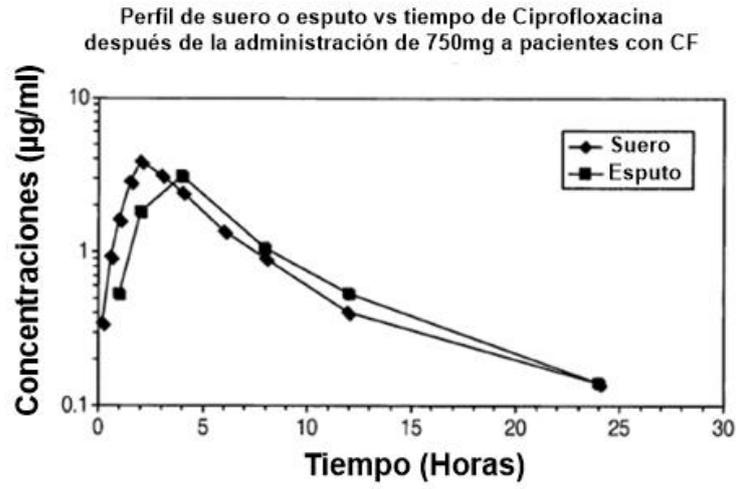


Figura 3

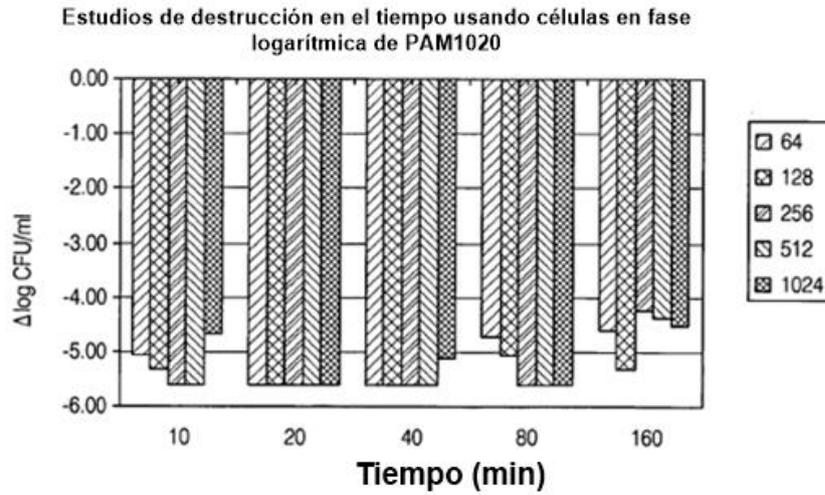


Figura 4A

Estudios de destrucción en el tiempo usando células en fase
logarítmica de PAM1032

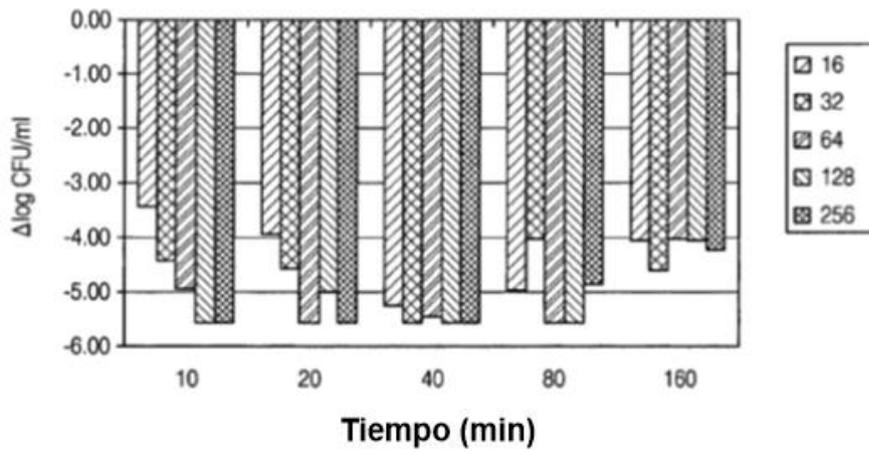


Figura 4B

Estudios de destrucción en el tiempo usando células en fase
estacionaria de PAM1020

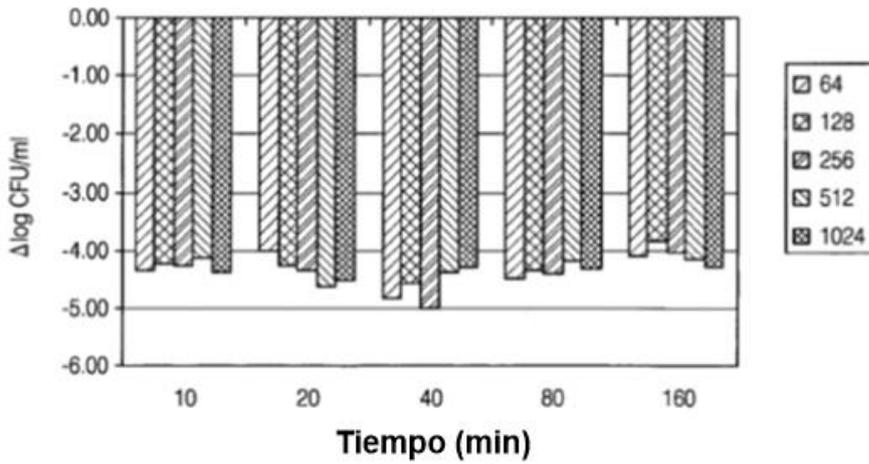


Figura 5A

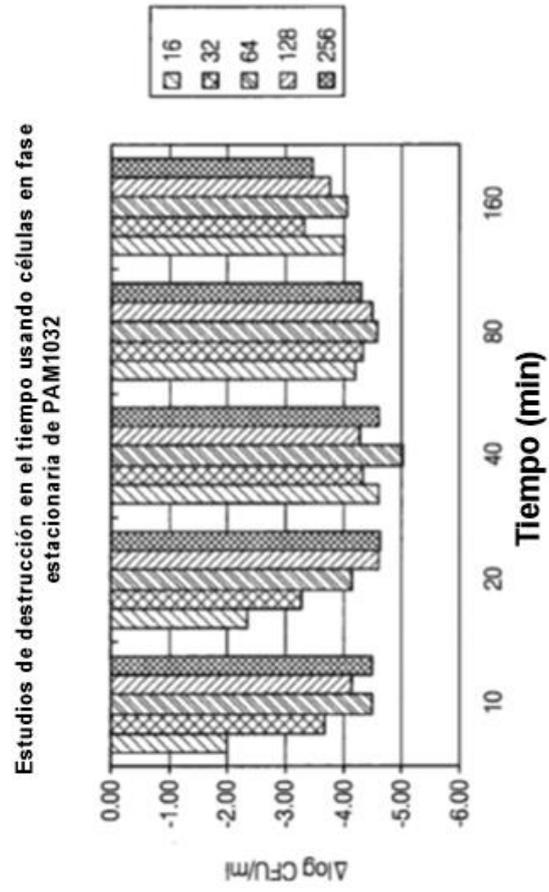


Figura 5B

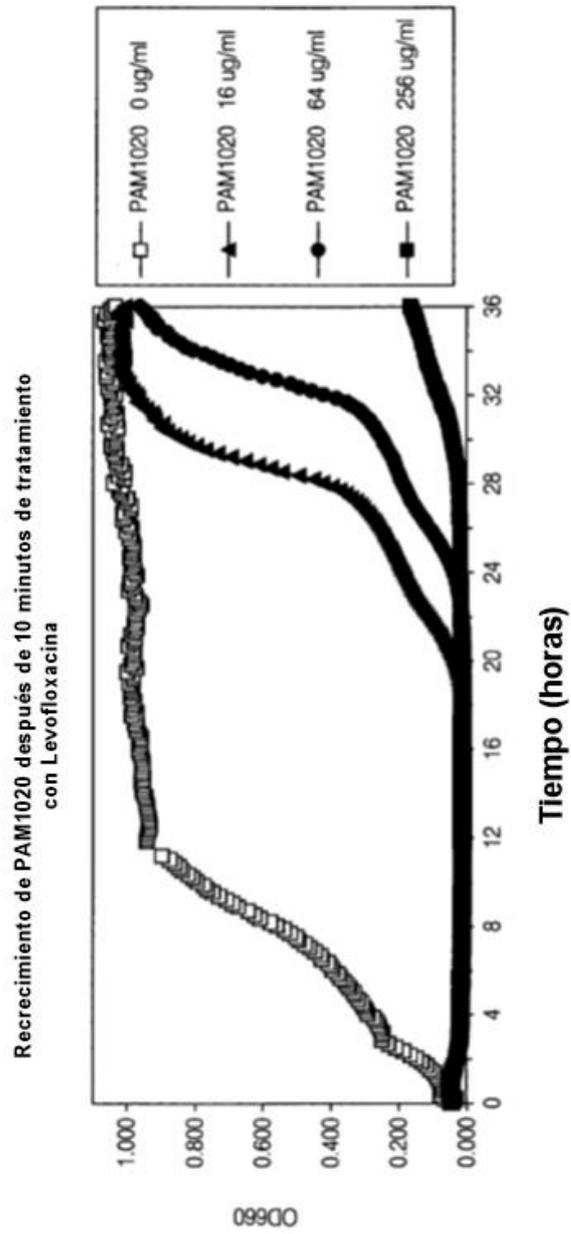


Figura 6A

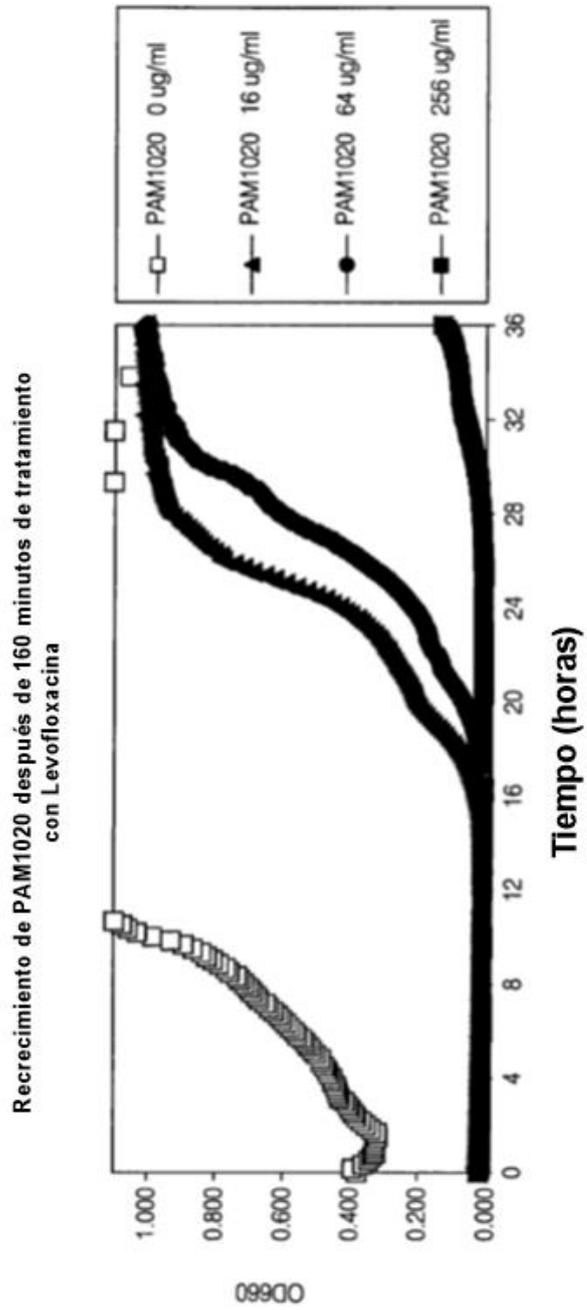


Figura 6B

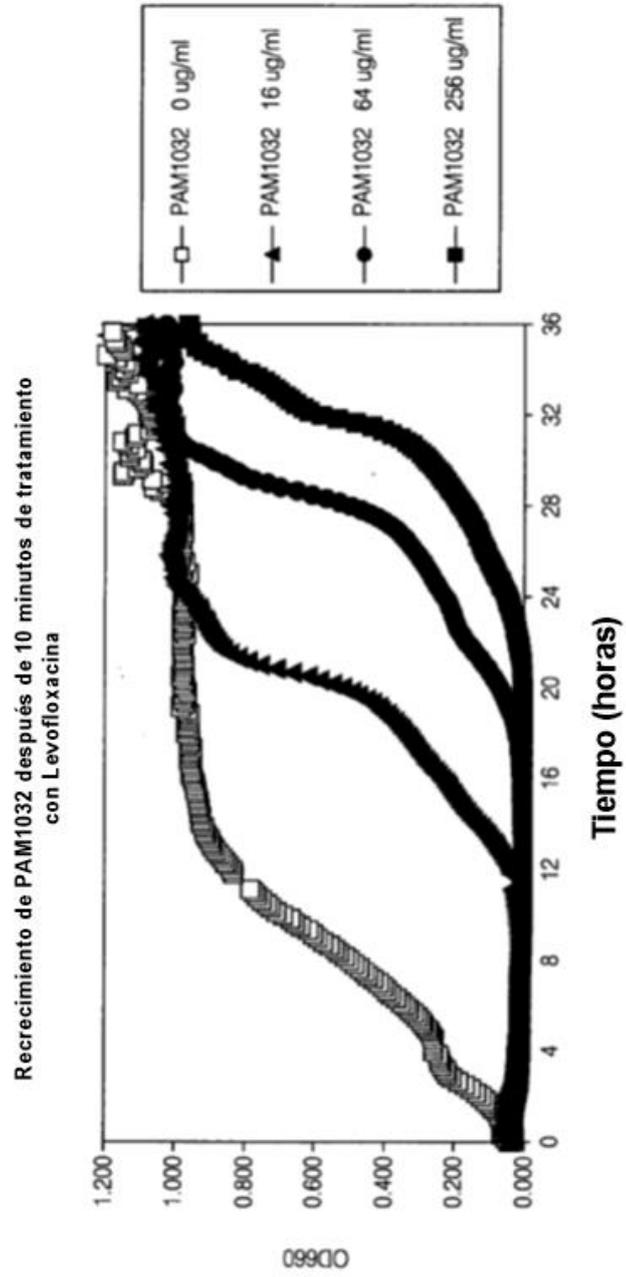


Figura 6C

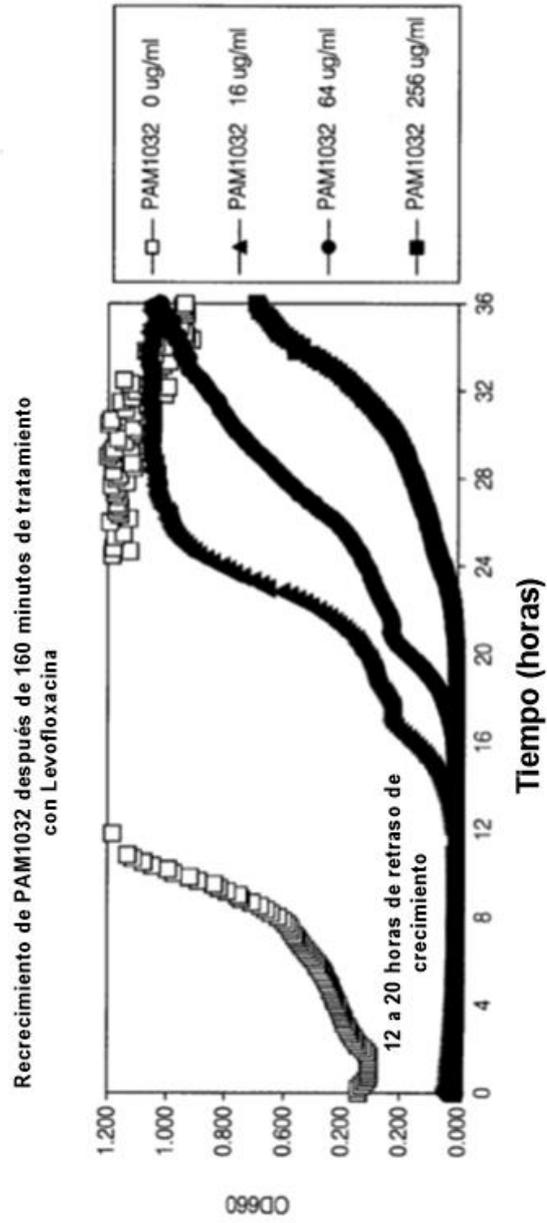


Figura 6D

Estudios de destrucción en el tiempo usando células en fase
logarítmica tardía de PAM 1020 crecidas bajo condiciones limitantes
de oxígeno.

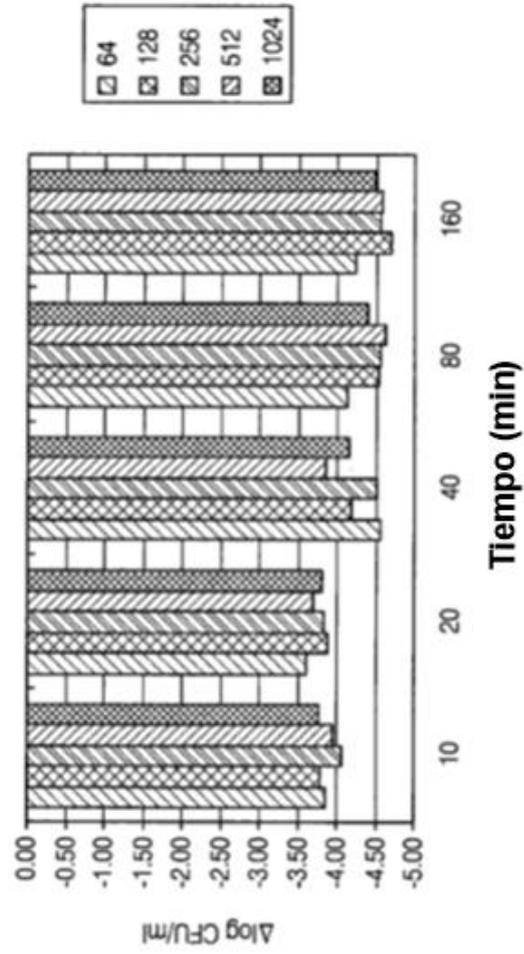


Figura 7A

Estudios de destrucción en el tiempo usando células en fase logarítmica tardía de PAM1032 crecidas bajo condiciones limitantes de oxígeno.

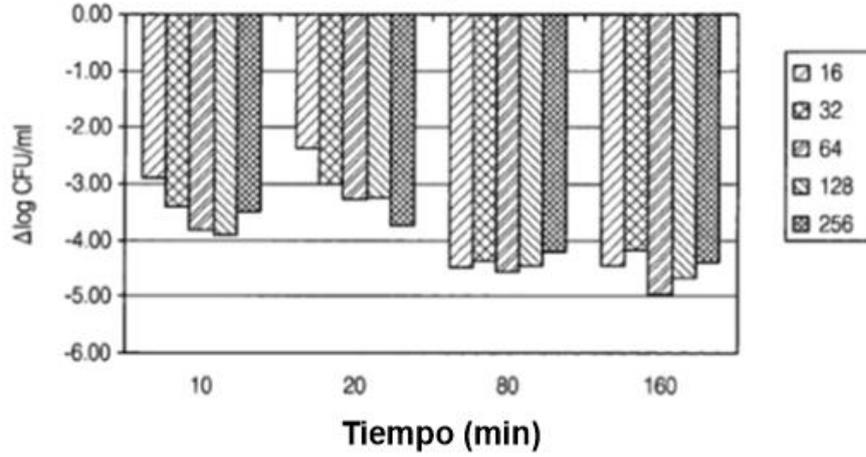


Figura 7B

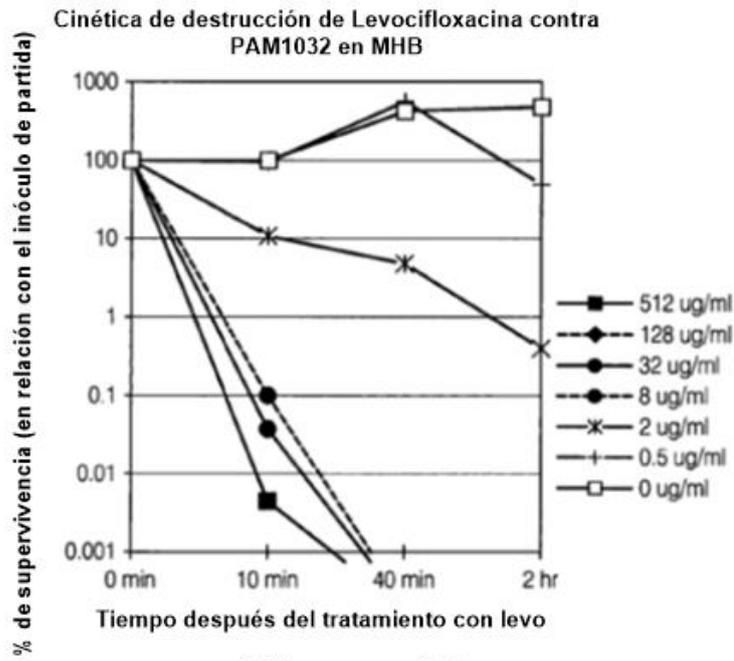


Figura 8A

Cinética de destrucción de levofloxacina contra PAM1032 en esputo

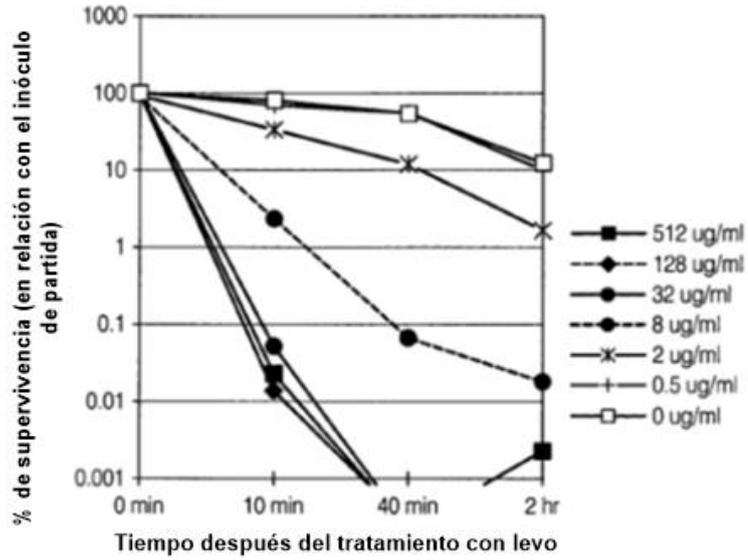


Figura 8B

Tratamiento del biofilm de PAM1032 con levofloxacina

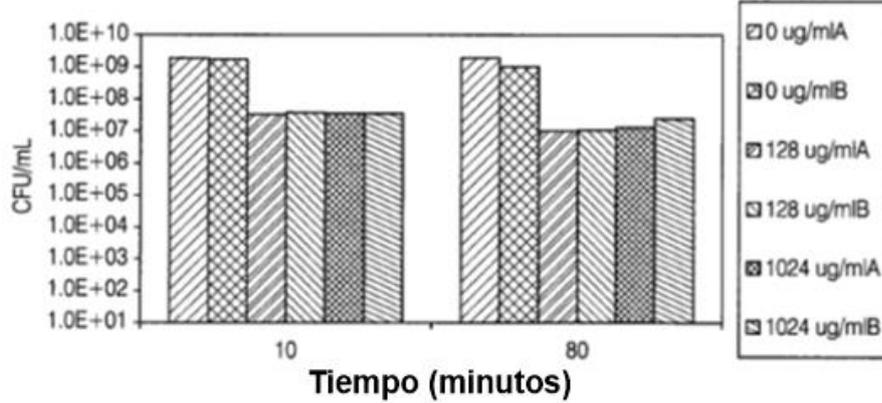


Figura 9

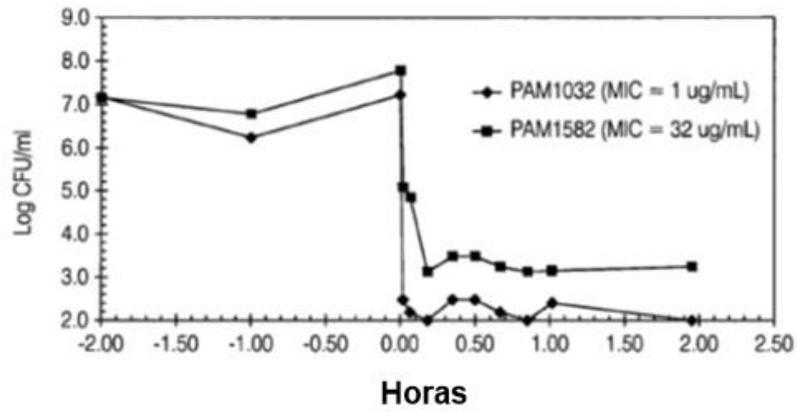


Figura 10

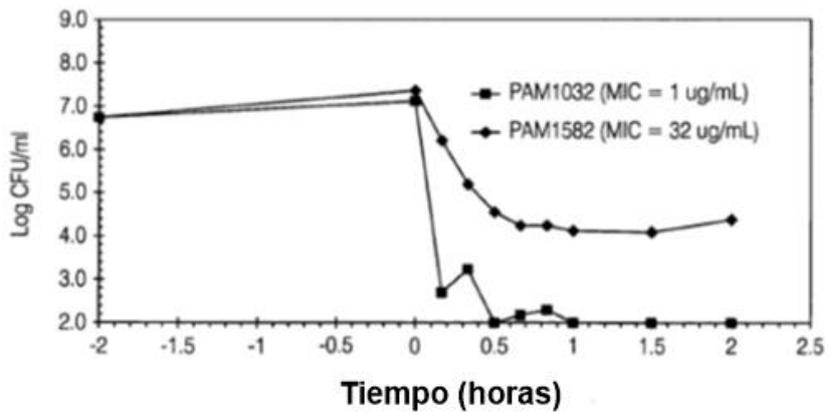


Figura 11

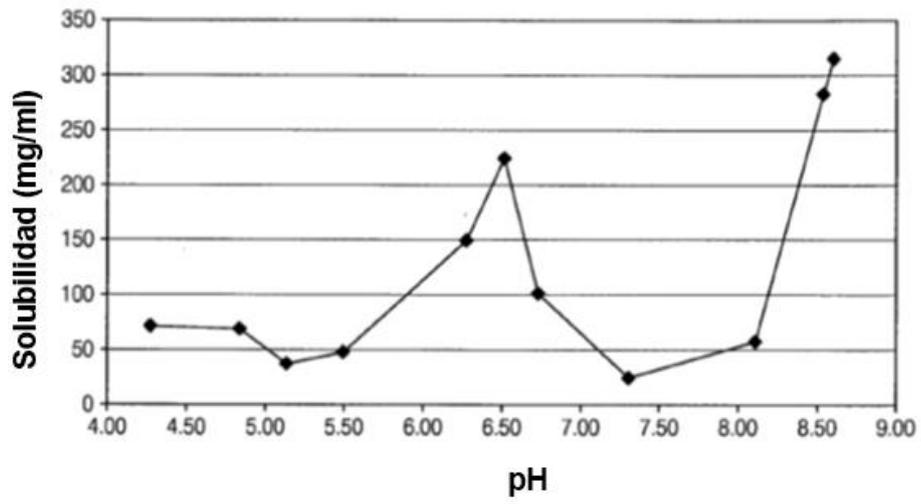


Figura 12

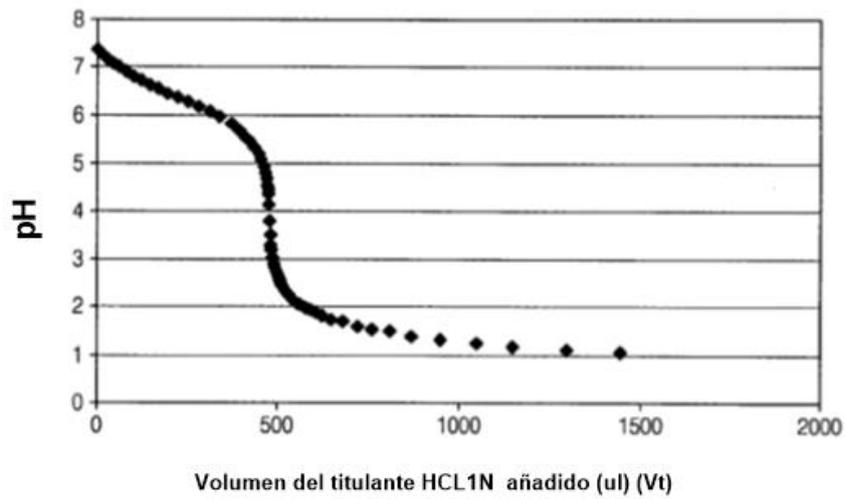


Figura 13

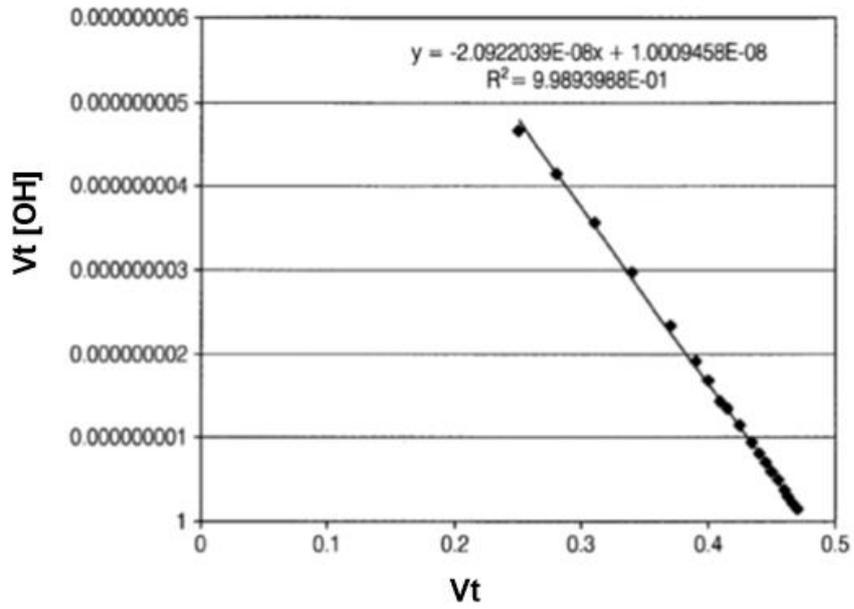


Figura 14

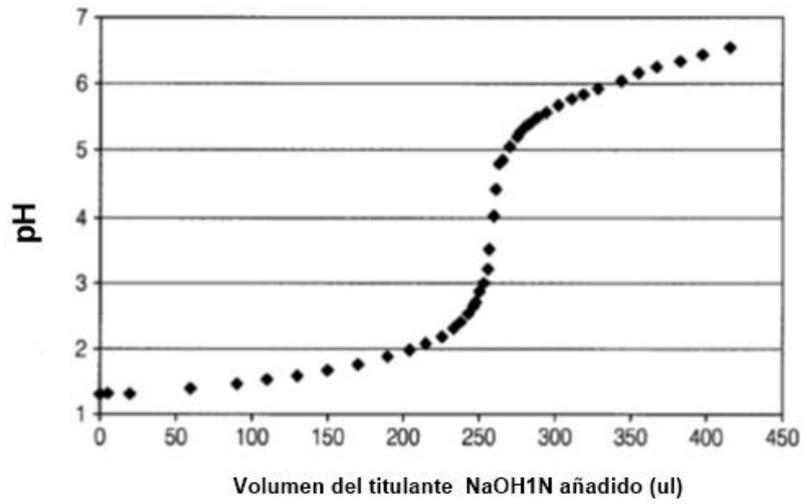


Figura 15

Complejación de levofloxacina con cationes

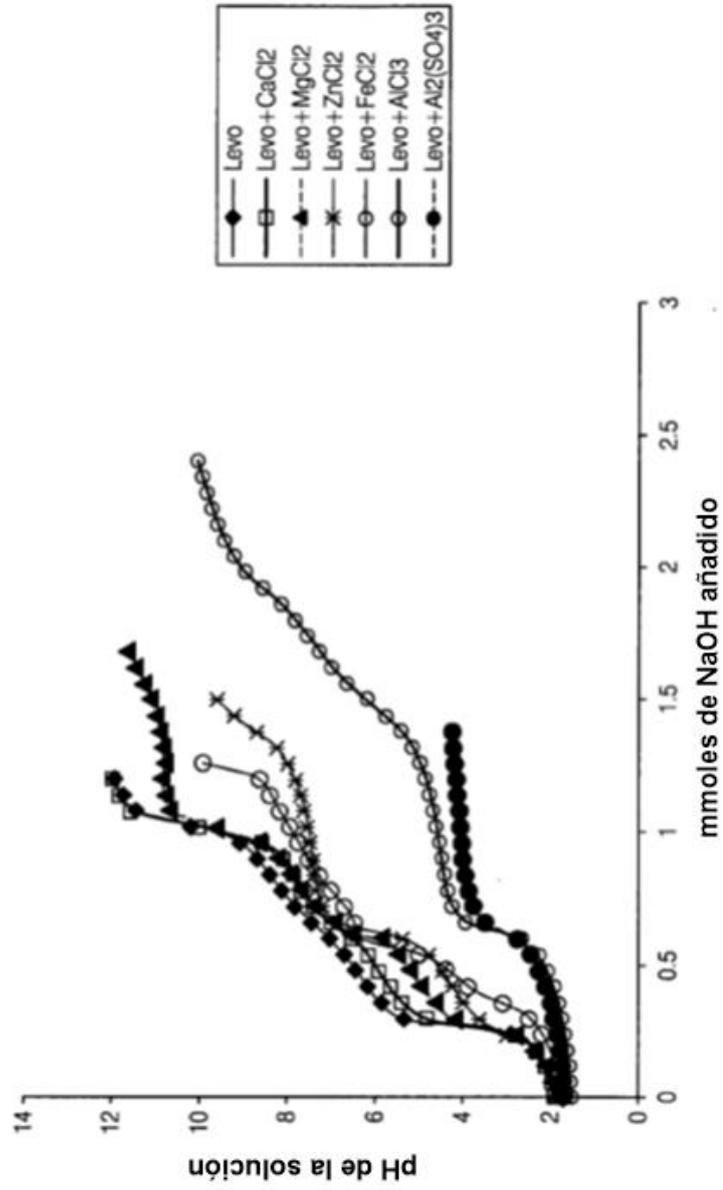


Figura 18

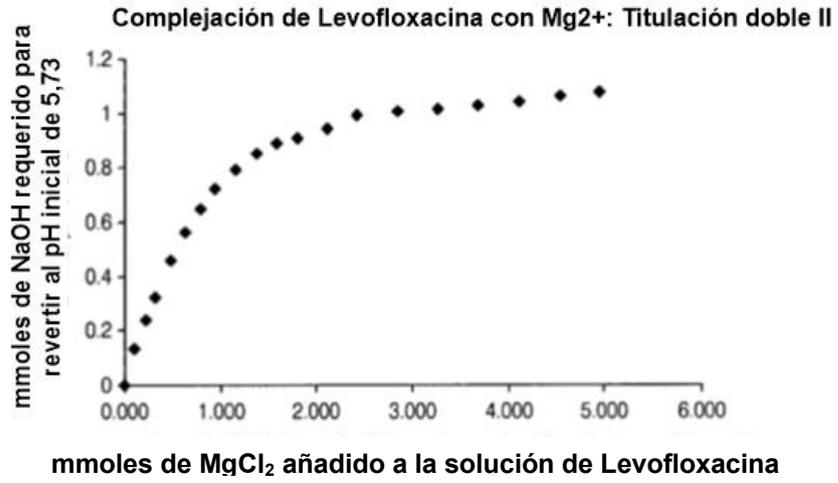


Figura 19

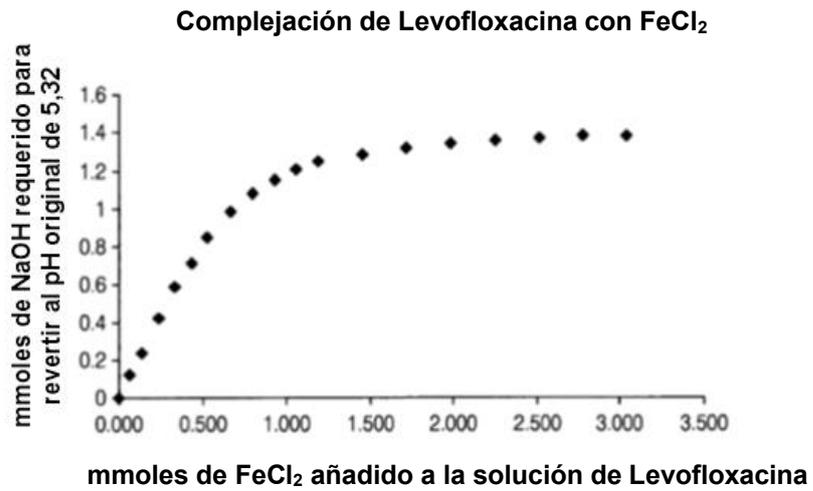


Figura 20

Complejación de Levofloxacin con CaCl_2 : Titulación doble

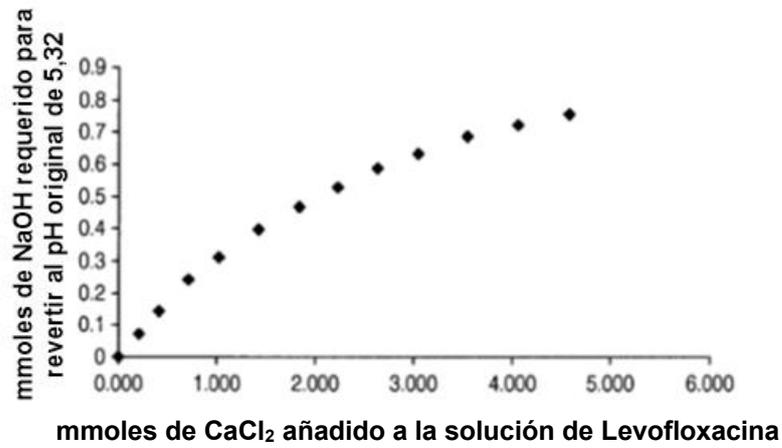


Figura 21

Complejación de Levofloxacin con Zn_2^+ . Titulación doble.

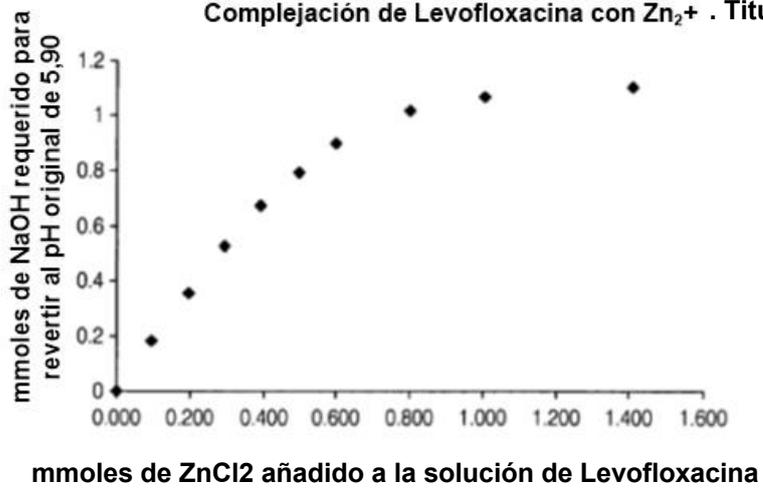


Figura 22

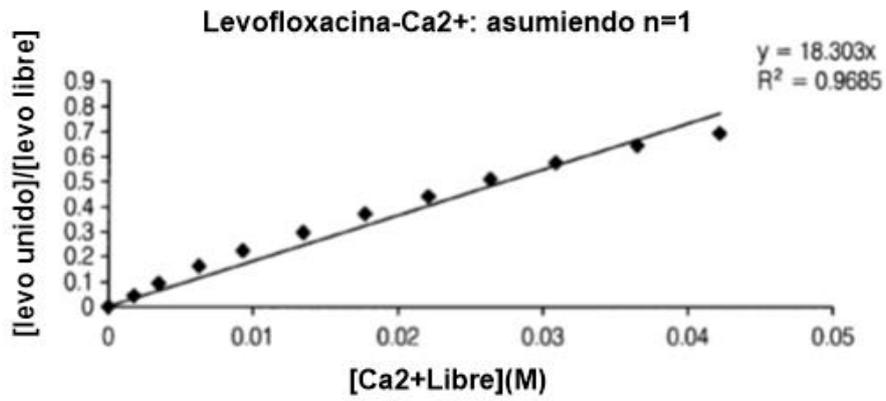


Figura 23A

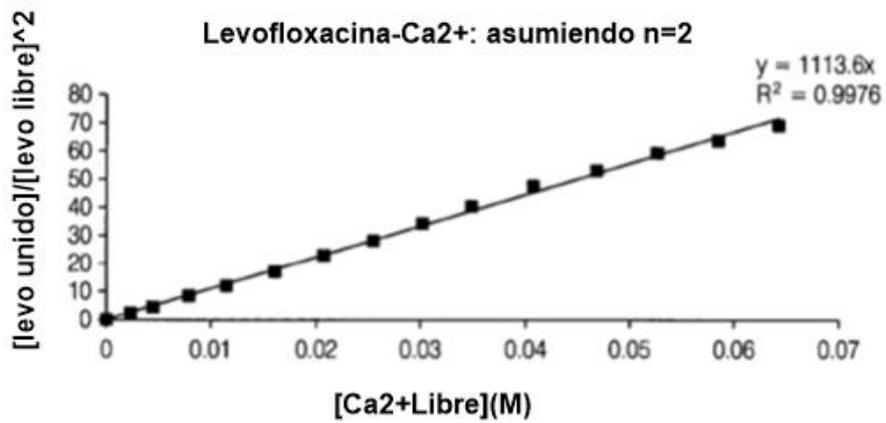


Figura 23B

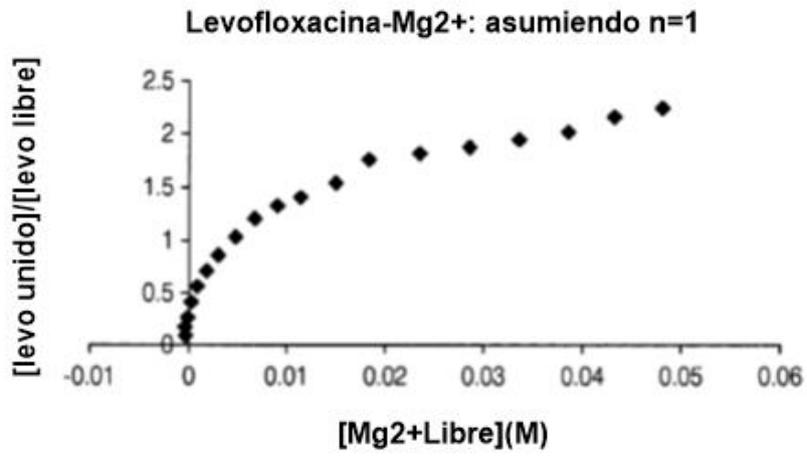


Figura 24A

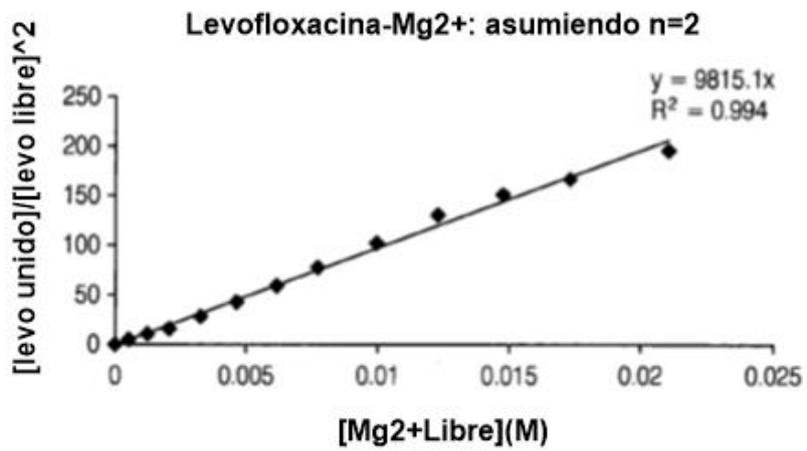


Figura 24B

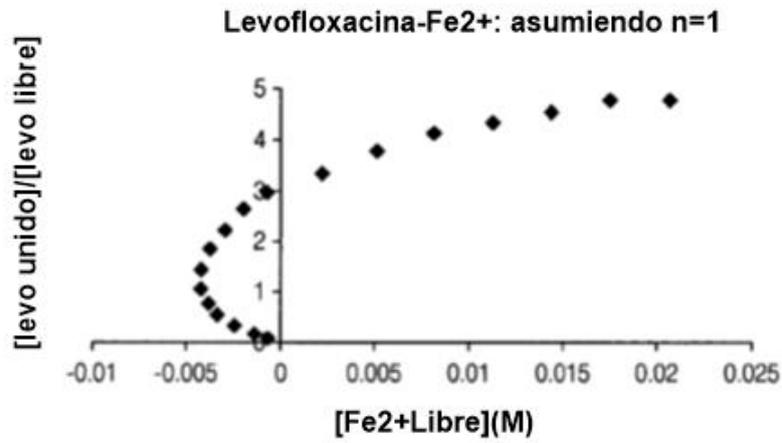


Figura 25A

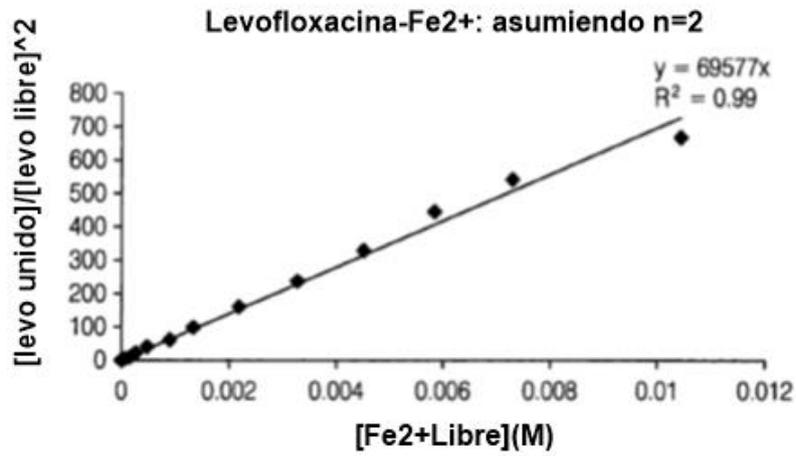


Figura 25B

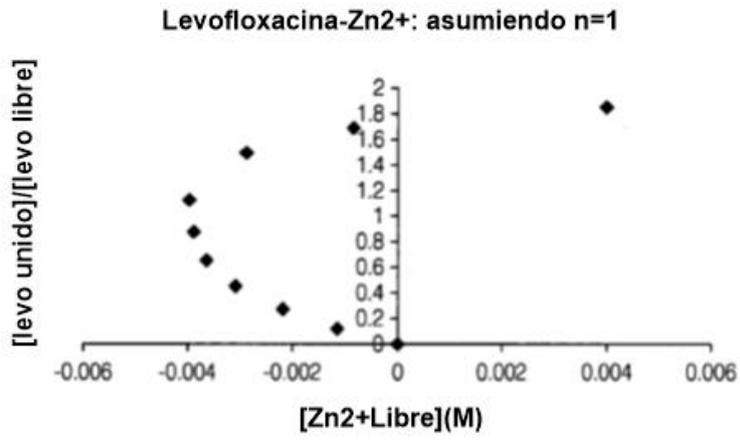


Figura 26A

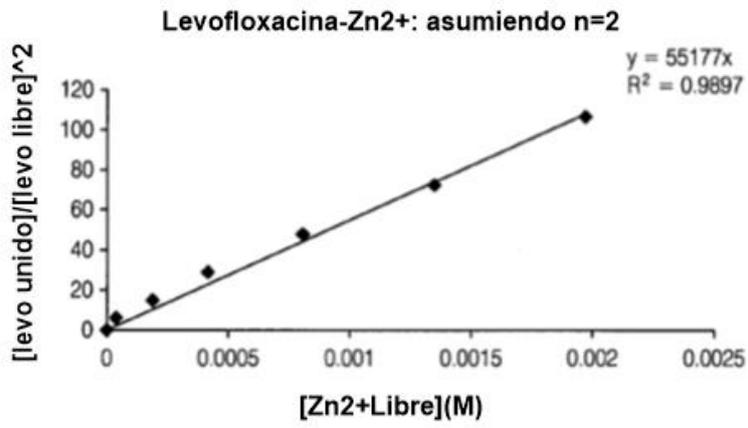


Figura 26B

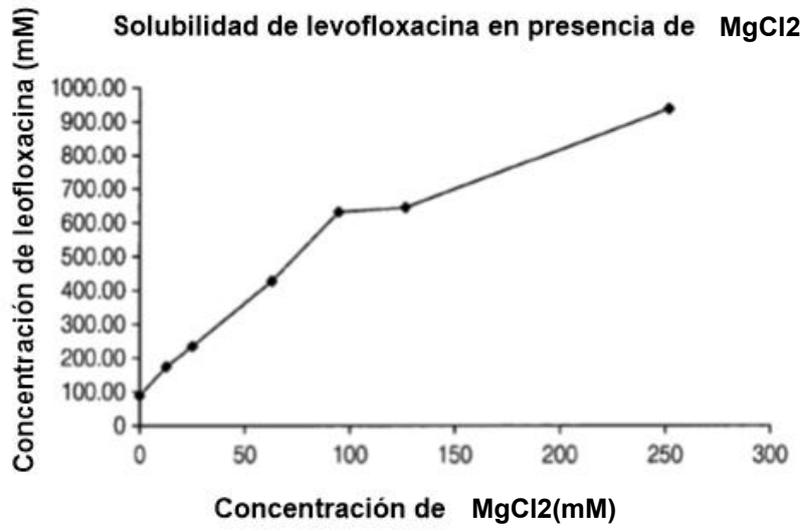


Figura 27

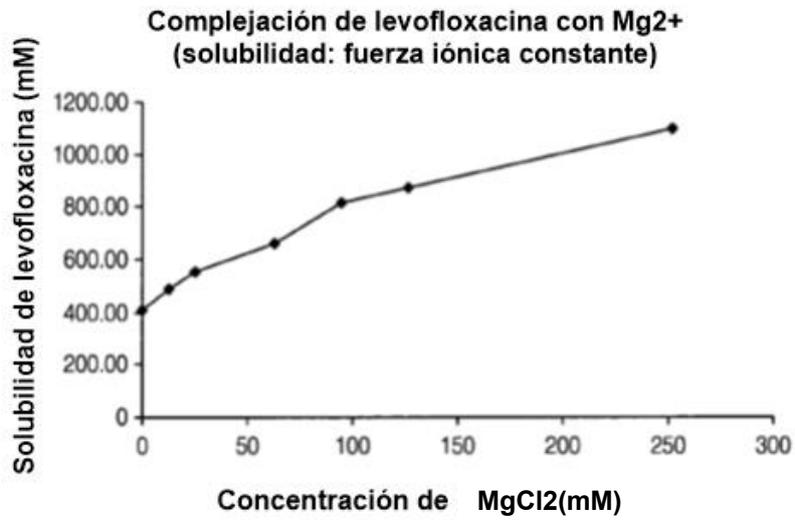


Figura 28

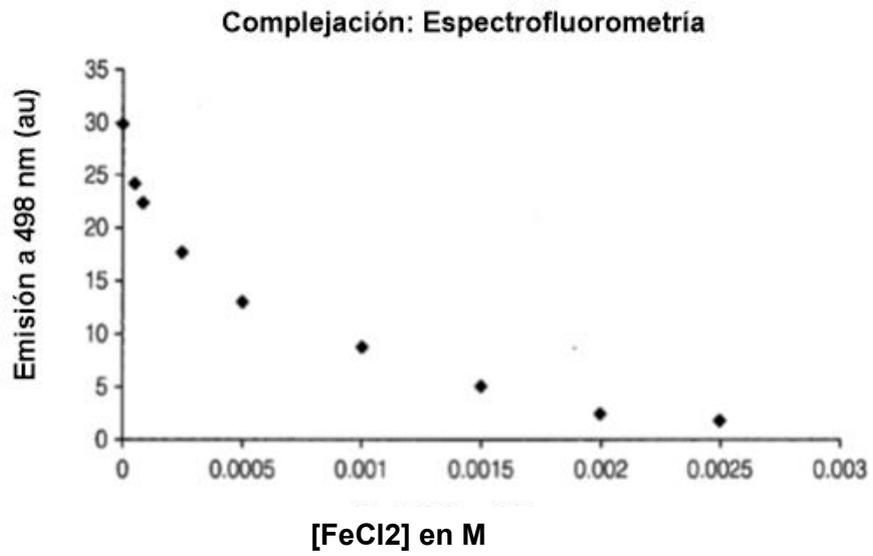


Figura 29

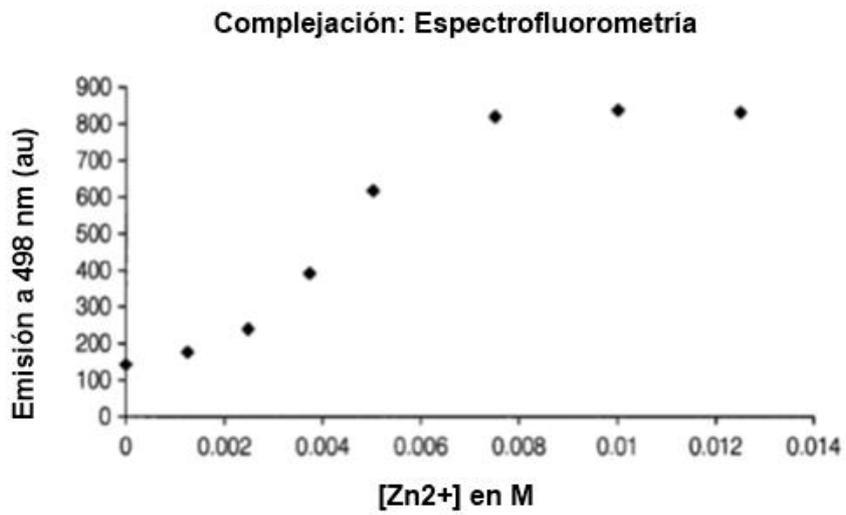


Figura 30