

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 218**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/14** (2006.01)  
**A61P 15/08** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 9/72** (2006.01)  
**A61P 15/00** (2006.01)  
**A61K 9/60** (2006.01)  
**A61P 15/14** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 38/11** (2006.01)  
**A61P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2011 PCT/AU2011/001430**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13016754**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2011 E 11870462 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2739268**

54 Título: **Método y formulación para inhalación**

30 Prioridad:

**01.08.2011 AU 2011903049**

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

**09.04.2019**

73 Titular/es:

**MONASH UNIVERSITY (100.0%)**  
**Wellington Road**  
**Clayton, Victoria 3800, AU**

72 Inventor/es:

**MCINTOSH, MICHELLE;**  
**MORTON, DAVID;**  
**SOU, TOMAS;**  
**OLERILE, LIVESEY y**  
**FRANKERD, RICHARD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 708 218 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

Método y formulación para inhalación

5 Esta invención se refiere a la administración de fármacos y, en particular, a la administración de oxitocina o carbetocina en forma de polvos secos para inhalación. La invención también se refiere a métodos para su uso.

10 Cada año, más de 150.000 mujeres, en su mayoría en países en vías de desarrollo, mueren debido a una hemorragia postparto. Esta condición se puede prevenir en gran medida con la administración de fármacos uterotónicos, tales como oxitocina, en la tercera fase del parto. La Organización Mundial de la Salud ha adoptado la oxitocina como la terapia más efectiva en el tratamiento de la hemorragia postparto. El uso de oxitocina en países en vías de desarrollo plantea varias dificultades. La oxitocina es un péptido con una estabilidad en solución relativamente pobre. Esto requiere entonces un almacenamiento refrigerado, por ejemplo, a 2-8 °C, lo cual es problemático en los países en vías de desarrollo. Una consideración adicional con el uso de oxitocina es que requiere agujas y jeringas esterilizadas y personal capacitado para su administración, otro requisito que no se puede garantizar en las naciones en vías de desarrollo. Por ende, un problema a resolver es el desarrollo de un sistema para una administración efectiva y económica de oxitocina para un uso apropiado en los países en vías de desarrollo, con el fin de prevenir muertes en el alumbramiento debido a la HPP. Una posible solución a este problema puede ser crear un sistema de administración pulmonar en forma de polvo seco, adecuado para la administración efectiva y asequible de oxitocina, u otros péptidos o proteínas biológicamente activos, que sea adecuado para el uso en regiones remotas y ambientalmente exigentes de naciones en vías de desarrollo.

25 Se ha propuesto que la administración pulmonar es una vía sistémica adecuada para agentes biológicos tales como péptidos, proteínas, vacunas y agentes a base de ácidos nucleicos. Los desafíos en la administración de macromoléculas tan grandes son sustanciales y dan como resultado una incertidumbre y un riesgo amplios e importantes en cuanto a la posibilidad de éxito. Los desafíos comienzan con la generación de un aerosol de dosis apropiada que sea adecuado para una administración eficiente y constante al interior del pulmón profundo. Si se puede lograr tal administración adecuada, el material ha de disolverse o estar disponible en una forma tal que pueda ser transportada por las membranas biológicas y otras barreras tales como el agente tensoactivo y las interfaces de la mucosa. La cinética de disolución determinará el grado de solubilización, y cabría esperar que esto se viera obstaculizado por las formulaciones hidrófobas y, por ende, el material se viera sometido a escalas temporales de depuración pulmonar antes de ser absorbido sistémicamente, según ha señalado O'Donnel y Smythe en "*Controlled Pulmonary Drug Delivery*", publicado por Springer 2011, ISBN 978-1-4419-9744-9. Antes de que una macromolécula pueda ser transportada en la circulación sistémica, ha de ser capaz de sobrevivir a un ataque de los mecanismos de defensa del cuerpo, incluso del movimiento mucociliar, de las peptidasas y de los macrófagos. Estos desafíos se analizan y resumen claramente en el reciente texto de expertos, "*Control Pulmonary Drug Delivery*", publicado por Springer 2011, ISBN 978-1-4419-9744-9. Por ejemplo, Olsson *et al.* concluyen que "para objetivos sistémicos de péptidos y proteínas, el desafío parece ser lograr una absorción a una tasa que sea competitiva en relación con la tasa de mecanismos de depuración a fin de asegurar una biodisponibilidad suficiente" y "lo que constituye las características óptimas en cada caso particular y cómo se pueden predecir a partir de propiedades indeterminadas continúa siendo muy poco claro con nuestra comprensión actual". Se ha propuesto el inicio rápido de la acción para la administración pulmonar en relación con la administración oral de moléculas pequeñas seleccionadas, tales como menos de 781 Da, que son principalmente hidrófilas. No obstante, para macromoléculas tales como péptidos y proteínas de peso molecular normalmente del orden de 1.000 Da y superior, el inicio de la acción es altamente incierto y es probable que se vea obstaculizado por una necesidad de mecanismos de difusión paracelular. Las semividas para la extracción del epitelio pulmonar en la sangre a través de dichas membranas son muy variables e inciertas, pero parece que suelen requerir varios minutos e incluso cientos de minutos, según han señalado Sakagami y Gumbleton en "*Controlled Pulmonary Drug Delivery*", publicado por Springer 2011, ISBN 978-1-4419-9744-9. Por ende, claramente no se supondría una absorción farmacocinética rápida y un inicio farmacodinámico del orden de uno o dos minutos para un péptido del orden de 1.000 Da y mayor, pero sería sorprendente, a partir de una macromolécula administrada por vía pulmonar. Sería especialmente sorprendente si el sistema de administración pulmonar comprendiera un polvo que requiriera disolución, y más aún si esa partícula tuviera una superficie hidrófoba.

55 Los desafíos adicionales en este contexto incluyen la producción de un producto física y químicamente estable que se mantiene durante la producción, el almacenamiento y el transporte, y en uso. También es importante que los agentes no causen broncoconstricción. Un péptido tal como oxitocina, que causa contracciones uterinas, podría interactuar con los receptores presentes en el sistema pulmonar y, por lo tanto, causar broncoconstricción. También es importante que los agentes no se metabolicen en el pulmón. Si se pueden cumplir con estos múltiples y muy importantes desafíos, la administración pulmonar puede ofrecer ventajas únicas, que incluyen evitar el uso de agujas, evitar el metabolismo de primer paso a través de la vía oral, y la estabilidad adicional que ofrecen las formulaciones en polvo.

65 El secado por pulverización se ha usado ampliamente durante muchos años para producir productos en polvo en áreas como alimentos, detergentes y productos químicos industriales. En muchos casos, se producen partículas relativamente grandes y que fluyen libremente. En menor medida, la técnica se ha adaptado para generar partículas

finas y ultrafinas, y la innovación en este caso ha sido liderada por las industrias de materiales inorgánicos, tales como los productores de cerámica técnica (T.T. Kodas, Adv. Mater., 1989, 6, 180). Este enfoque de generación de gotitas a partir de soluciones a menudo complejas, para formar un aerosol, y luego de secado de estas como unidades aisladas en partículas se ha reconocido por proporcionar un control mejorado sobre la morfología, la estequiometría, la pureza, el tamaño además de la estructura de las partículas. Las ventajas se pueden ver como un híbrido entre los enfoques "descendente" y "ascendente" de la ingeniería genética de partículas. Sin embargo, la industria farmacéutica solo ha reconocido hasta hace relativamente poco tiempo las ventajas de esta ruta para manipular por ingeniería genética partículas finas (R. Vehrig, Pharm Res., 2008, 25(5), 999), y recientemente han aparecido materiales secados por pulverización en sistemas de inhalación de polvo seco disponibles comercialmente. La mayor atención en esta área se ha dirigido al impacto de la forma, la densidad y la rugosidad en la aerosolización.

Supone un desafío, no obstante, administrar moléculas de fármacos en las vías respiratorias e incluso en el pulmón inferior para proporcionar un efecto terapéutico, especialmente fármacos que son sólidos a la temperatura de administración. A este respecto, mientras que los polvos secos presentan un medio atractivo de administración de fármacos, la generación de partículas micronizadas adecuadas para una aerosolización altamente eficiente sigue siendo un desafío técnico muy importante.

Tras la inhalación, las partículas de fármaco en forma de aerosol más grandes tienden a depositarse por impactación y sedimentación gravitacional en la parte posterior de la garganta y las vías respiratorias superiores, donde son propensas a la depuración mucociliar en el tracto gastrointestinal y posterior metabolismo. Además, las partículas de fármaco más grandes no pueden avanzar profundamente en el pulmón inferior debido al estrechamiento de los bronquiolos. Se considera que para el transporte y la administración de aerosol local y eficaz al sistema respiratorio que incluye tráquea, bronquios y alvéolos, se prefieren partículas de diámetro aerodinámico de menos de 5  $\mu\text{m}$ , mientras que, para pulmón profundo, bronquiolos y alvéolos, se prefieren partículas de menos de 3  $\mu\text{m}$ , especialmente por absorción sistémica.

Si bien la administración por inhalación es un medio deseable, una barrera tecnológica importante para ello sigue siendo la practicidad de modificar por ingeniería genética un aerosol adecuado para una administración altamente eficiente (p. ej.: >50 % de la administración de la dosis al sitio de tratamiento), una administración reproducible (p. ej., que presenta un coeficiente de variación (% CV) de la administración de la dosis <10 %) y una gran carga útil (p. ej., >1 mg de administración de polvo al sitio de tratamiento) en un formato práctico y rentable que comprende un dispositivo y una formulación. La administración de polvo seco proporciona un formato atractivo de administración. Sin embargo, generar partículas micronizadas adecuadas para una aerosolización altamente eficiente sigue siendo un desafío técnico muy importante. Además de los problemas mencionados anteriormente, cualquier sistema práctico de administración por inhalación de polvos secos necesitaría evitar o minimizar la aglomeración de las partículas en el momento de la inhalación, tener una baja variación en la dosis administrada debido a las propiedades de flujo deficientes o una aglomeración inconsistente, y evitar o minimizar la eliminación incompleta del polvo del dispositivo de administración causado por la adhesión del polvo a las paredes del dispositivo.

En los últimos años, se ha propuesto una nueva generación de formulaciones en polvo "inteligentes" para la inhalación de biomoléculas, que a menudo se forman a través del secado por pulverización. En muchos casos, estas formulaciones están diseñadas empíricamente, y comprenden un cóctel de excipientes, cada uno de los cuales se propone para proporcionar uno o más cometidos funcionales en la fase sólida. Uno de esos excipientes usados en este contexto ha sido el aminoácido L-leucina. Las propiedades ventajosas potenciales proporcionadas por la adición de L-leucina, ya sea mediante co-molienda o condensación/precipitación, fueron demostradas por primera vez por Staniforth y Ganderton *et al.*, (véanse, por ejemplo, los documentos WO 96/23485 y WO 00/33811). Este trabajo indicó que las propiedades físicas peculiares de este aminoácido proporcionaron su comportamiento para mejorar el rendimiento. Desde entonces, varios grupos han estudiado el beneficio que la L-leucina proporciona a la aerosolización en polvo, especialmente cuando se pulveriza conjuntamente con activos y excipientes, sin embargo, la verdadera naturaleza de la relación estructura-rendimiento en tales sistemas sigue sin estar clara. En términos más generales, también parece que ciertos péptidos/proteínas en estructuras de partículas secadas por pulverización, por ejemplo, albúminas, isoleucina o tri-leucina, también pueden conferir un rendimiento mejorado de la aerosolización en uso. Alternativamente, los materiales de lípidos y ácidos grasos también pueden proporcionar un determinado beneficio a este respecto, tales como fosfolípidos (por ejemplo, DPPC), lecitinas o sales de ácidos grasos (por ejemplo, estearato de sodio o magnesio).

El documento US 2011/171312 A1 se refiere en general a conjugados que comprenden una fracción peptídica terapéutica unida covalentemente a uno o más polímeros solubles en agua (párr. [0004]). Como posibles péptidos terapéuticos de acuerdo con este documento, se mencionan cientos de proteínas diferentes; también se describen formulaciones secas diseñadas para la administración pulmonar y la preparación de formulaciones en polvo seco por secado por pulverización.

Ahora se ha hallado de modo sorprendente que la L-leucina puede utilizarse ventajosamente en procedimientos de preparación de polvos secos para inhalación mediante secado por pulverización, y puede dar como resultado la

formación de polvos secos adecuados en circunstancias en las que, en ausencia de L-leucina, las partículas adecuadas no se formarían en absoluto o se fusionarían inmediatamente o se aglomerarían irreversiblemente.

5 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un polvo seco para inhalación que comprende:

preparar una solución y/o suspensión acuosa que comprende oxitocina o carbetocina,  
uno o más mono-, di- o polisacáridos y/o aminoácidos capaces de formar una matriz de vidrio amorfo y L-leucina;  
y  
10 secar por pulverización la solución o suspensión acuosa para producir un polvo seco adecuado para inhalación.

Sin desear quedar limitado por teoría alguna, se cree que la L-leucina se concentra en la superficie de las partículas formadas, posiblemente debido a su hidrofobicidad, de tal forma que las partículas se estabilizan y la aglomeración se inhibe. También se ha descubierto que las partículas así formadas están protegidas de la degradación, la  
15 disminución de la temperatura de transición vítrea y la recristalización de la humedad atmosférica u otra humedad, de manera que no requieren el uso de un entorno de envasado sin humedad en la misma medida que las formulaciones de polvo seco actuales. Esto también permite que los polvos secos de la presente invención se utilicen en regiones remotas y ambientalmente exigentes de naciones en vías de desarrollo. Los desafíos en la  
20 producción de un polvo que contiene una macromolécula biológica que es adecuada para la inhalación, son bien reconocidos y se han notificado ampliamente después de que no se haya comercializado con éxito el producto de insulina inhalada Exubera. Si bien algunos de los desafíos técnicos se abordaron al desarrollar el producto Exubera, fue necesario proporcionar un dispositivo inhalador muy complejo, costoso e impráctico, además de que el polvo era extremadamente sensible a la humedad que se tenía que manejar en ambientes de humedad muy baja. Muchos factores adicionales contribuyeron a su fracaso, incluida la biodisponibilidad y la incertidumbre en su destino en el  
25 pulmón. Este fracaso del producto ha enfatizado la extrema complejidad en el desarrollo de una solución al problema indicado aquí.

Como se usa en la presente memoria, el término "matriz de vidrio amorfo" se refiere a una matriz en la que se dispersa oxitocina o carbetocina que es esencialmente no cristalina, o no tiene regiones sustanciales de cristalinidad  
30 o un orden molecular estructural de repetición regular.

La solución/dispersión puede incluir otros componentes, incluidos otros aminoácidos, albúminas y derivados de aminoácidos tales como tri-leucina, que también pueden ayudar en la formación y estabilización de la formulación de  
35 polvo seco. Dependiendo del uso final de la formulación, se pueden incorporar otros fármacos, incluidos los fármacos no peptídicos. La proteína o péptido biológicamente activo, otros fármacos u otros componentes pueden presentarse en solución o suspensión, y también se pueden incluir excipientes adicionales, tales como agentes estabilizantes, agentes tensioactivos y similares.

En consecuencia, como se usa en la presente memoria, una referencia a una "solución y/o suspensión" o  
40 "solución/suspensión" indica una mezcla de agua y otros componentes en la que algunos componentes pueden disolverse (es decir, en solución) y algunos componentes pueden estar en suspensión, o presentarse en forma de nanosuspensión, emulsión o microemulsión. La solución acuosa puede incluir otros co-disolventes en algunas realizaciones.

45 El líquido acuoso puede incluir otros co-disolventes en algunas realizaciones. Se entenderá que el término "acuoso" se refiere a un líquido que está constituido al menos en parte por agua, pero puede incluir otros líquidos miscibles en agua, tales como un alcohol (p. ej., etanol, isopropanol). En cualquier caso, el experto en la materia reconocerá que el líquido acuoso ha de ser adecuado para el secado por pulverización según los métodos de la invención.

50 Las formulaciones de polvo seco de la presente invención se pueden usar para el tratamiento o la prevención de hemorragias post-parto.

La presente invención se adapta específicamente a las formulaciones de los péptidos oxitocina o carbetocina. Las formulaciones que contienen oxitocina o carbetocina se pueden usar en el tratamiento o la prevención de  
55 hemorragias post-parto (HPP). En tales circunstancias, la formulación también puede incluir otros componentes adecuados para tratar o prevenir la HPP, tal como ergometrina y fármacos relacionados. Asimismo, se desvela que las formulaciones que contienen oxitocina y/o sus derivados también pueden ser útiles para tratar la ansiedad y el autismo, además de inducir la modificación del comportamiento. Por ejemplo, enfermedades o afecciones psiquiátricas que incluyen autismo, esquizofrenia, ansiedad, estrés y depresión, incluida la depresión post-natal:  
60 cáncer que incluye carcinoma de mama, ovario y endometrio, como un fármaco de estilo de vida que implica confianza, vinculación y tratamiento de la disfunción sexual, en el tratamiento del dolor, tal como cefalea crónica, en lactancia y en fertilidad, masculina o femenina.

Los componentes usados para formar la matriz de vidrio amorfo en el polvo final secado por pulverización pueden  
65 ser cualquier mono-, di- o polisacárido y/o aminoácido adecuados. Por ejemplo, este componente puede comprender D-manitol y glicina. Estos componentes se disolverán generalmente en el agua de la solución/suspensión acuosa.

En otra realización, este componente puede comprender trehalosa o inulina. Un experto en la materia conocerá bien los sacáridos y/o aminoácidos adecuados para este fin. Los alcoholes de azúcar pueden incluir, por ejemplo, xilitol y sorbitol. Los monosacáridos pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a glucosa (dextrosa), fructosa (levulosa), galactosa, xilosa y ribosa, y pueden incluir cualquier combinación de estereoisómeros. Los disacáridos pueden, por ejemplo, incluir, pero no se limitan a, lactosa, sacarosa, trehalosa, maltosa. Alternativamente, pueden incluir trisacáridos, tales como rafinosa, tetrasacáridos, tales como estaquiosa, y pentasacáridos, tales como verbascosa.

Las partículas micronizadas, que contienen opcionalmente uno o más agentes fisiológicamente activos, pueden incluir además uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Otros excipientes pueden incluir, pero no se limitan a, agentes de carga, agentes tampón y estabilizadores, tales como citrato de sodio, potenciadores de la absorción, inhibidores de la proteasa y peptidasa, agentes modificadores del gusto o el olfato, modificadores de la adhesión, agentes de flujo, modificadores de la disolución o mucolíticos.

Los polvos pueden formularse adicionalmente por combinación con cualquier partícula de vehículo conocida, u otros aditivos excipientes tales como modificadores del sabor, olor o sentido organoléptico. También se puede lograr cierta mejora mediante la granulación del polvo en gránulos blandos con un flujo de polvo mejorado, y la selección apropiada del inhalador de polvo seco en consecuencia.

Las partículas de la formulación de polvo seco inhalable reivindicada tienen normalmente un diámetro aerodinámico mediano en masa de menos de 10 micrómetros, más preferentemente menos de 5  $\mu\text{m}$  y lo más preferentemente menos de 3  $\mu\text{m}$ . Preferentemente, la L-leucina representará entre 5 y 50 % en peso de los ingredientes secos de la formulación. Más preferentemente, la L-leucina comprenderá entre 10 y 40 % en peso de los ingredientes secos de la formulación.

Como se usa en la presente memoria, el término "diámetro aerodinámico" ( $D_{ae}$ ) se define como el diámetro de una esfera de volumen equivalente de densidad unitaria con la misma velocidad de sedimentación terminal que la partícula real en cuestión. La deposición pulmonar de polvos farmacéuticos se expresa generalmente en términos del comportamiento aerodinámico de las partículas. Las partículas bajo la influencia de la gravedad se asentarán en el suelo a una cierta velocidad. En el diámetro aerodinámico, se asume que la velocidad se puede medir y tiene en cuenta la densidad de la unidad de la partícula ( $\rho_0$ ), la densidad de la partícula ( $\rho_p$ ), la densidad unitaria de una esfera equivalente ( $D_{eq}$ ), factor de forma dinámica ( $X$ ). Para partículas superiores a aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , la siguiente ecuación se aplica para relacionar el diámetro aerodinámico y la esfera de volumen equivalente de la densidad unitaria:

$$D_{ae} = D_{eq} \sqrt{\frac{\rho_p}{\rho_0 X}}$$

El término "diámetro aerodinámico mediano de la masa" ("MMAD") es una representación estadística de la distribución de los tamaños de partículas graduados según el diámetro aerodinámico, definido aquí como el diámetro aerodinámico mediano expresado en una masa ponderada, y es un parámetro ampliamente aceptado usado por los científicos en aerosol. El diámetro aerodinámico mediano en masa (MMAD) se puede medir por un método de impactador de farmacopea según lo define la Farmacopea de los Estados Unidos, usando un impactador de cascada Andersen o por el impactador de próxima generación (NGI). A este respecto, para que el polvo seco sea altamente aerosolizable, las partículas generalmente tendrán un diámetro aerodinámico mediano en masa de menos de 10  $\mu\text{m}$ , pero preferentemente menos de 6  $\mu\text{m}$ , preferentemente menos de 5  $\mu\text{m}$ , más preferentemente menos de 3,5  $\mu\text{m}$  o lo más preferentemente menos de 2  $\mu\text{m}$ .

La dosis emitida (DE) es la masa total del agente activo emitido desde el dispositivo después de la activación. No incluye el material que queda en las superficies internas o externas del dispositivo, o en el sistema dosificador que incluye, por ejemplo, la cápsula o la ampolla. La DE se mide recogiendo la masa total emitida del dispositivo. Puede realizarse en un aparato frecuentemente identificado como un aparato de muestreo de uniformidad de dosis (DUSA), y recuperar esto mediante un ensayo químico húmedo cuantitativo validado (es posible un método gravimétrico, pero este es menos preciso). Alternativamente, cuando se usa un impactador o un impactor, la DE se mide combinando la dosis recogida en todas las fases del respectivo impactador o sistema impactor.

La dosis de partículas finas (FPD, por sus siglas en inglés) es la masa total de agente activo que se emite desde el dispositivo tras el accionamiento que está presente en un tamaño de partículas aerodinámico más pequeño que un límite definido. Este límite generalmente se toma como 5  $\mu\text{m}$  si no se indica expresamente como un límite alternativo, tal como 3  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$  o 1  $\mu\text{m}$ , etc. La FPD se mide usando un impactador o impactor, tal como un impactador de doble etapa (TSI), un impactador de multietapas (MSI), impactador de cascada Andersen (ACI) o un impactador de próxima generación (NGI). Cuando se usa un TSI, la FPD generalmente se toma a 6,4  $\mu\text{m}$  ya que este impactor tiene solo un punto de corte que se estima en este valor. Cada impactador o impactor tiene un punto de corte de recogida de tamaño de partículas aerodinámico predeterminado para cada etapa. El valor de FPD se

obtiene entonces mediante la interpretación de la recuperación del agente activo etapa por etapa cuantificada por un ensayo químico húmedo cuantitativo validado (es posible un método gravimétrico, pero este es menos preciso) en el que se usa un corte de etapa simple para determinar la FPD o se usa una interpolación matemática más compleja de la deposición etapa por etapa.

5 La fracción de partículas finas (FPF) se define normalmente como la FPD dividida por la DE y se expresa como un porcentaje. En la presente memoria, la FPF de DE se conoce como FPF(DE) y se calcula como  $FPF(DE) = (FPD/DE) \times 100 \%$ .

10 La fracción de partículas finas (FPF) también se puede definir como la FPD dividida por la DM y expresarse como un porcentaje.

15 El secado por pulverización se puede llevar a cabo usando un equipo de secado por pulverización bien conocido por los expertos en la materia. Se ha descubierto ahora que el uso de L-leucina en la solución para secado por pulverización permite que el secado por pulverización se logre a temperaturas más bajas que las temperaturas generalmente requeridas para este fin. Dado que las temperaturas usadas en el proceso de secado por pulverización pueden causar la descomposición del agente activo, esta es una ventaja particular de la presente invención. Por ejemplo, el secado por pulverización de las soluciones/suspensiones de la presente invención se puede lograr a temperaturas inferiores a 80 °C, preferentemente inferiores a 60 °C, más preferentemente inferiores a 40 °C y lo más preferentemente inferiores a 30 °C o a temperaturas ambiente. Dependiendo de la configuración del secador por pulverización, estas temperaturas pueden referirse a la temperatura de entrada o temperatura de salida del secador, pero preferentemente se referirá a la temperatura que experimentan las gotas de secado, que debido al efecto de enfriamiento por evaporación es a menudo la temperatura de salida del sistema.

25 El polvo seco preparado por la presente invención es nuevo y presenta un aspecto adicional de la presente invención. De acuerdo con este aspecto, se proporciona una formulación de polvo seco para su uso en el tratamiento o la prevención de HPP, en el que el polvo seco comprende partículas secadas por pulverización que comprenden:

30        oxitocina o carbetocina,  
          una matriz de vidrio amorfo que comprende uno o más mono-, di- o polisacáridos y/o aminoácidos, y  
          L-leucina.

35 En una realización preferida, la matriz de vidrio amorfo comprende D-manitol y glicina, trehalosa y/o inulina.

40 Las partículas de la formulación de polvo seco tendrán al menos una porción de la L-leucina ubicada en la superficie. En una realización preferida, la superficie comprenderá al menos un 50 % de cobertura por la L-leucina, más preferentemente más del 75 % y lo más preferentemente más del 90 %. La evaluación de la presencia de L-leucina en la superficie se puede medir directamente mediante una técnica como ToFSIMS (espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo) o XPS (espectroscopia fotoelectrónica de rayos X). Alternativamente, se puede evaluar mediante cromatografía de gases en fase inversa. Un método preferido para evaluar es el enfoque indirecto que se describe a continuación mediante la medición de la cohesión del polvo.

45 Como se ha mencionado anteriormente, se cree que la concentración de L-leucina en la superficie actúa para proteger las partículas secas de la aglomeración y la entrada de humedad.

50 Los polvos secos de la presente invención pueden administrarse usando equipos y técnicas conocidos en la técnica. A este respecto, hay muchos dispositivos de inhalación descritos en la técnica con el fin de permitir que un paciente inhale un polvo seco y este equipo puede usarse para la administración de los polvos secos de la presente invención.

55 Los dispositivos inhaladores de polvo seco (DPIs) son bien conocidos en la técnica y existen varios tipos diferentes. En general, el polvo seco se almacena en el interior del dispositivo y se extrae del lugar de almacenamiento tras el accionamiento, del dispositivo, después de lo cual el polvo es expulsado del dispositivo en forma de una neblina de polvo que debe ser inhalada por el sujeto. En la mayoría de los DPI, el polvo se almacena de manera unitaria, por ejemplo, en ampollas o cápsulas que contienen una cantidad predeterminada de la formulación de polvo seco.

60 Algunos DPI tienen un depósito de polvo y las dosis del polvo se miden dentro del dispositivo. Estos dispositivos con depósito pueden ser menos preferidos cuando es probable que el tratamiento sea una o una pequeña cantidad de dosis en un tratamiento aislado.

65 Los inhaladores de polvo seco pueden ser pasivos o activos. Los inhaladores pasivos son aquellos en los que el polvo se aerosoliza usando el flujo de aire aspirado a través del dispositivo por la inspiración de los pacientes, y los dispositivos activos son aquellos en los que el polvo se aerosoliza a través de una fuente de energía separada, que puede ser, por ejemplo, una fuente de gas comprimido, tal como el dispositivo Nektar Exubera o el dispositivo

Vectura Aspirar, o una forma de energía mecánica tal como la vibración (como el dispositivo Microdose) o el impacto.

5 Los dispositivos inhaladores de polvo seco adecuados para su uso en la presente invención incluyen dispositivos de "dosis única", por ejemplo, el Rotahaler (marca comercial), el Spinhaler (marca comercial) y el Diskhaler (marca comercial) en los que las dosis individuales de la composición en polvo son introducidas en el dispositivo, por ejemplo, en cápsulas o ampollas de dosis única. Los dispositivos pueden presentarse como dosificados previamente, por ejemplo, con polvo en una tira de ampolla (como en el dispositivo GSK Diskus) en el que el formato dosificado previamente incluye dosis múltiples) o cuando el paciente inserta una forma de dosis externa dosificada previamente, tal como una cápsula que contiene el fármaco (por ejemplo, el Boihringer, Ingelheim, Handihaler, o el Miat Monodose).

10 Alternativamente, el dispositivo puede ser un dispositivo con depósito, en el que la dosis de polvo se dosifica dentro del dispositivo a partir de un depósito de polvo durante el manejo del paciente (por ejemplo, el Astra Turbuhaler). Se puede usar cualquiera de estos tipos de dispositivos inhaladores.

15 El dispositivo puede ser preferentemente un dispositivo de un solo uso, o uno que esté diseñado para usarse con un pequeño número de dosis, y puede ser desechable. Por ejemplo, el dispositivo Twincer, el dispositivo Direct Haler, el dispositivo TwinCaps o el Puff-haler. Una ventaja de estos dispositivos es su simplicidad, su pequeña cantidad de componentes y su bajo costo. Preferentemente, se prefiere un dispositivo con menos de 10 componentes independientes. Más preferentemente, 5 o menos, lo más preferentemente 3 o menos.

20 Hay una serie de factores asociados con los dispositivos de administración que afectarán la eficacia de dosificación lograda. En primer lugar, existe la extracción de la dosis. Adicionalmente, la dinámica de la neblina del polvo generada también afectará la administración de la dosificación. Preferentemente, el dispositivo permitirá una elevada dosis emitida y una desaglomeración de alta eficiencia. La desaglomeración de alta eficiencia se asocia con frecuencia con altos niveles de impacto de polvo en el accionamiento. El dispositivo puede tener una resistencia baja, media o alta al flujo de aire.

25 Debe apreciarse que las composiciones de la presente invención pueden administrarse con dispositivos inhaladores pasivos o activos.

30 La administración de proteínas y péptidos biológicamente activos en la vía pulmonar usando una formulación de polvo seco inhalable requiere la solubilización de las partículas cuando entran en contacto con la membrana mucosa de los pulmones y la posterior liberación y absorción de la proteína o el péptido. Aunque se cree que la L-leucina proporciona una forma de recubrimiento hidrófobo a las partículas secadas por pulverización suficiente para proporcionar una estabilidad y una vida útil mejoradas, particularmente en ambientes cálidos y húmedos, se ha descubierto sorprendentemente que esto no interfiere con la capacidad de los polvos para liberar las proteínas y los péptidos para la captación en el pulmón. Anteriormente, se ha demostrado que las partículas de recubrimiento con excipientes hidrófobos pueden retrasar la disolución durante periodos significativos, conforme indica el documento WO 01/76575. De hecho, se ha descubierto para una formulación secada por pulverización que comprende oxitocina que la absorción de oxitocina y el tiempo de inicio de la acción es particularmente rápida y considerablemente más rápida que los métodos y la formulación actuales usados para administrar la oxitocina durante el alumbramiento. Por consiguiente, se ha descubierto de manera sorprendente que la administración de oxitocina por inhalación en el pulmón proporciona ventajas significativas sobre las vías de administración actuales.

35 Por consiguiente, en un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un polvo seco para inhalación que comprende oxitocina o carbetocina y un vehículo pulmonarmente aceptable, tal como una matriz de vidrio amorfo para la oxitocina, en el que más del 40 %, preferentemente más del 50 %, más preferentemente más del 60 % y lo más preferentemente más del 65 % de las partículas del polvo seco después de la inhalación poseen un diámetro aerodinámico de menos de 5  $\mu\text{m}$ , más preferentemente menos de 3  $\mu\text{m}$ . Preferentemente, el diámetro aerodinámico mediano en masa (MMAD) de la nube de aerosol generada es inferior a 5  $\mu\text{m}$ , más preferentemente inferior a 3  $\mu\text{m}$ , más preferentemente aún inferior a 2,5  $\mu\text{m}$ , y lo más preferentemente inferior a 2  $\mu\text{m}$ .

40 Las formulaciones de polvo seco de acuerdo con este aspecto de la invención son especialmente adecuadas para su uso en el tratamiento o la prevención de hemorragias post-parto (HPP). La invención también proporciona el uso de oxitocina o carbetocina en la fabricación de un polvo seco para inhalación para el tratamiento o la prevención de la HPP.

45 La invención también proporciona una formulación para su uso en el tratamiento o la prevención de HPP que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo por inhalación una cantidad eficaz de un polvo seco que comprende oxitocina o carbetocina. Preferentemente, la formulación de polvo seco se presenta en una forma descrita anteriormente.

50 En la invención, la matriz de vidrio amorfo comprende uno o más mono-, di- o polisacáridos y/o aminoácidos, y lo más preferentemente la matriz incluirá L-leucina, preferentemente en cantidades y proporciones que se han descrito anteriormente. Sin embargo, fuera del alcance de las reivindicaciones, la matriz de vidrio amorfo puede comprender

un polímero inerte adecuado para administración pulmonar, tal como polivinilpirrolidona o alcohol polivinílico o polímero de polietilenglicol o propilenglicol o copolímeros. Las matrices compuestas por estos polímeros también podrían incluir componentes tales como leucina, isolucina o trileucina para mejorar la estabilidad de las partículas y asegurar que tengan un diámetro aerodinámico apropiado.

De acuerdo con esta invención, el polvo seco puede incluir además uno o más agentes fisiológicamente activos, e incluir además uno o más componentes farmacéuticamente aceptables y pulmonarmente aceptables, tales como los descritos previamente. En una realización preferida, el vehículo pulmonarmente aceptable incluye citrato de sodio, o un estabilizador para el componente de oxitocina.

Las partículas micronizadas de acuerdo con este aspecto de la invención se preparan mediante secado por pulverización como se ha descrito anteriormente en condiciones adecuadas que pueden ser determinadas por el experto en la materia. El término "secado por pulverización" tiene por objeto abarcar cualquier proceso en el que se forme una solución de uno o más solutos o suspensiones en un líquido, por lo que el líquido se atomiza físicamente en gotitas individuales que luego se secan para formar un polvo particulado seco. Puede abarcar cualquier forma de gotita en un proceso de formación de partículas, y puede abarcar procesos relacionados tales como liofilización por pulverización, refrigeración por pulverización y secado rápido por pulverización. Las gotitas pueden formarse mediante cualquier proceso de atomización conocido, incluyendo, entre otros, atomización por presión, atomización neumática, atomización con dos o más fluidos, atomización con disco rotatorio, atomización electrohidrodinámica, atomización ultrasónica y cualquier variante de dichos procesos de atomización. La atomización puede ocurrir desde una fuente de pulverización o múltiples fuentes. La pulverización líquida del vehículo puede o no ser acuosa y, opcionalmente, puede comprender co-disolventes más componentes adicionales disueltos o suspendidos. El líquido puede incluir un material que es un vapor o un sólido en condiciones ambientales pero existe como un líquido en las condiciones de proceso seleccionadas. Las gotitas formadas se pueden secar aplicando calor en forma de un gas de secado calentado, o el calor se puede aplicar de otras maneras, por ejemplo, por radiación desde las paredes de la cámara de secado o como microondas. Una vez recogidas de este proceso de secado, las partículas se pueden secar o acondicionar a un nivel de humedad controlado mediante un proceso como el secado al vacío o liofilización. Alternativamente, el secado puede conseguirse por enfriamiento seguido por secado o por aplicación de vacío.

Las partículas pueden obtenerse y modificarse por ingeniería genética en cualquier sistema conocido de ingeniería de partículas, tal como, entre otros, los siguientes: tecnología Pulmosphere™ o Pulmosol™ desarrollada por Nektar, tecnología de partículas porosas AIR™ desarrollada por Alkermes, tecnología Technosphere™ desarrollada por Mannkind, tecnología de Powderhale™ desarrollada por Vectura, partículas creadas por los métodos de sonocrystalización de Prosonix, partículas creadas por tecnologías de nanomolienda en húmedo o seco, por ejemplo desarrolladas por Elan, Hovione o Savara.

Las partículas micronizadas del polvo seco para inhalación son de un tamaño adecuado para la aerosolización y la inhalación, tienen un tamaño físico inferior a 15 µm, tal como inferior a 10 µm, o inferior a 6 µm, o inferior a 5 µm, o inferior a 3 µm o inferior a 2 µm. Las partículas según esta realización tendrán un diámetro aerodinámico mediano en masa de menos de 10 µm, pero preferentemente menos de 5 µm, o menos de 3 µm.

Normalmente, además de los equivalentes de tamaño discutidos anteriormente, el 90 % de las partículas en volumen puede tener un diámetro aerodinámico de menos de 10 µm, menos de 8 µm, o menos de 6 µm o menos de 5 µm o menos de 3 µm. El diámetro aerodinámico mediano en masa se puede medir mediante un método de impactador de farmacopea según lo define la Farmacopea de los EE. UU. usando un impactador de cascada Andersen, o mediante un impactador de próxima generación (NGI). Las partículas de acuerdo con esta realización pueden tener un diámetro medio de masa inferior a 5 µm, o inferior a 3 µm, que podría medirse mediante un método de dispersión de luz láser, tal como el uso de un instrumento Malvern Mastersizer 2000.

Con el fin de obtener una alta eficiencia en la aerosolización, también resulta ventajoso que las partículas exhiban un bajo nivel de cohesión. Normalmente, la cohesión se puede medir usando una prueba de celdas de cizallamiento en polvo, como la celda de cizallamiento del reómetro de polvo Freeman FT4. Ventajosamente, un polvo exhibiría un valor de cohesión medio inferior a 2, más preferentemente inferior a 1,5 y lo más preferentemente inferior a 1.

En una realización adicional, la administración respiratoria de oxitocina o carbetocina también puede incluir la administración nasal. La administración nasal implica inspiración a través de la nariz, pero cuando el polvo se recoge principalmente en la cavidad y cornetes nasales, y cuando también se produce la absorción en la circulación sistémica. La inhalación nasal es similar a la administración pulmonar, ya que proporciona una vía de administración no invasiva a la circulación sistémica. La administración nasal evita las agujas y permite la administración repetida desde un solo dispositivo.

Los intervalos de dosis se pueden calcular con facilidad y administrarse sin preocuparse por el volumen del líquido (no depende del volumen). Los dispositivos de administración para la administración nasal en polvo pueden ser diferentes de los requeridos para la administración pulmonar. Los ejemplos incluyen dispositivos de Optinose, Via Nase (Kurve), Direct-Haler, Monopowder (Valois) o sistemas nasales en polvo de Bepack. El tamaño de partículas mediano en masa para la administración nasal es preferentemente superior a 5 µm y más preferentemente superior

a 10 µm, ya que esto reduce el material que pasa a través de la cavidad nasal y maximiza su deposición en los cornetes nasales. Las formulaciones nasales incluirán un vehículo nasalmente aceptable y pueden incluir excipientes adicionales, tales como polímeros bioadhesivos y potenciadores de la penetración, por ejemplo, quitosán, HPMC o carbopoles.

5 La oxitocina o carbetocina puede administrarse como un polvo formulado que comprende una matriz vítrea a través de la nariz, en un tamaño de partículas mediano en masa superior a 10 µm para el tratamiento de la HPP u otras afecciones maternas relacionadas, tales como la depresión post-natal, y preferentemente tienen un inicio de acción rápido. Los polvos secos preparados para la administración pulmonar también se pueden inhalar a través de la fosa nasal hacia el sistema pulmonar, por ejemplo, cuando un paciente tiene dificultad para inhalar el polvo a través de la boca, aunque este no es un modo preferido de administración de dichos polvos.

10 La oxitocina es el agente uterotónico de elección según la Organización Mundial de la Salud para su uso en el manejo activo de la tercera fase del parto, debido a la velocidad de inicio de la acción, el perfil mínimo de efectos secundarios y la ausencia de contraindicaciones. De acuerdo con las pautas para la práctica clínica de The Royal Women's Hospital (Melbourne, Aus), se debe administrar oxitocina profiláctica a la mujer con el nacimiento del hombro anterior, o en un plazo de uno o dos minutos después del nacimiento del bebé. El momento de la administración es crítico para prevenir la atonía uterina, y hay un claro beneficio en proporcionar una forma administrada con el inicio más rápido después de dicho nacimiento para reducir el riesgo de pérdida continua de sangre.

15 Además de la prevención de la HPP, la oxitocina se usa como tratamiento para la HPP en una dosificación de 30-40 UI en una infusión intravenosa. En entornos clínicos bien controlados, la oxitocina en dosis bajas (0,5-1 mU/ml de infusión IV) está indicada para el inicio o la aceleración de las contracciones uterinas, cuando sea deseable y se considere adecuada por razones de preocupación fetal o materna, para lograr un parto vaginal.

20 Más recientemente, la literatura científica y médica ha notificado una relación entre los niveles bajos de oxitocina endógena y la depresión post-natal, y puede haber una ventaja en el desarrollo de una forma práctica, económica y no invasiva de oxitocina en sus derivados terapéuticamente eficaces para el administración sistémico en o alrededor de esta área de indicación.

25 En los países en vías de desarrollo, la administración parenteral del uso de oxitocina encuentra una serie de obstáculos que incluyen la necesidad de almacenamiento en cadena de frío para prevenir la degradación química, la necesidad de personal médico capacitado para la administración de inyecciones IV o IM, la posibilidad de reutilizar las jeringas en un esfuerzo para reducir los costos, lo que aumenta la probabilidad de transmisión de virus transmitidos por la sangre y la falta general de acceso a productos de oxitocina de alta calidad para la prevención y/o el tratamiento de la HPP. En un esfuerzo por aumentar el acceso a la capacidad de oxitocina, las comadronas en algunos países están capacitadas para administrar inyecciones IM de oxitocina, sin embargo, existen numerosos informes de uso inadecuado del producto parenteral para la aceleración del trabajo del parto. La formulación de oxitocina inhalada reivindicada podría superar muchas de las limitaciones asociadas con las formulaciones parenterales. Un sistema de forma de dosis unitaria única eliminaría la posibilidad de uso en la aceleración del trabajo del parto ya que no sería posible administrar la dosis baja requerida. Proporcionar oxitocina en forma de polvo seco inhalable también proporciona más flexibilidad con la dosificación en vista de la ausencia de un vehículo líquido o gaseoso y la falta de dependencia del volumen. También evita la necesidad de agujas, minimiza el riesgo de contaminación y permite la flexibilidad para la administración repetida desde un solo dispositivo.

35 El rápido inicio de acción logrado a través de las formulaciones de polvo seco de la presente invención proporciona la capacidad de valorar rápidamente la dosificación durante el tratamiento de la HPP, en el que la dosis terapéutica habitual está comprendida entre 30-40 UI. Las matronas/comadronas suelen sentir el útero para evaluar cuándo la magnitud de la contracción es suficiente para controlar la HPP. La rápida absorción y el inicio de la acción (como se demostró en un modelo de oveja) indica que sería posible administrar múltiples dosis inhaladas para alcanzar los niveles plasmáticos necesarios para las contracciones uterinas eficaces. El amplio índice terapéutico de la oxitocina también es beneficioso para una terapia inhalada, ya que la variabilidad en la eficiencia de la administración o la absorción no causaría efectos secundarios graves en las pacientes.

40 De acuerdo con la presente invención, el inicio de la acción después de la inhalación de un polvo seco que comprende oxitocina o carbetocina en el sistema pulmonar, medido por la contracción uterina, puede lograrse dentro de los 200 segundos de la inhalación, preferentemente dentro de los 150 segundos de la inhalación, más preferentemente dentro de los 100 segundos de la inhalación y lo más preferentemente dentro de los 60 segundos de la inhalación. Preferentemente, el tiempo entre la administración pulmonar de una formulación de polvo seco de acuerdo con la invención y el inicio de las contracciones uterinas en comparación con el inicio de la acción después de la inyección I.M. de una solución de oxitocina o carbetocina es inferior a 80 %, preferentemente inferior a 60 % y lo más preferentemente inferior a 40 % del tiempo entre la inyección I.M. y el inicio de las contracciones uterinas.

45 La presente invención es particularmente adecuada para la administración de oxitocina o carbetocina que tiene usos similares a oxitocina, haciendo hincapié en el control del sangrado tras el alumbramiento.

La invención se describirá ahora con referencia a algunos ejemplos y dibujos específicos. Sin embargo, queda entendido que la particularidad de la siguiente descripción no es reemplazar la generalidad de la invención como se ha descrito anteriormente.

5 Con referencia a los dibujos:

La Figura 1 es una representación esquemática de un aparato para secado por pulverización.

10 La Figura 2 es una representación esquemática de un impactor de doble etapa para medir la deposición por aerosol *in vitro* de polvos secos.

La Figura 3 proporciona difractogramas de rayos X de trehalosa cruda, Trehalosa (cruda) y trehalosa secada por pulverización (SP) después del secado por pulverización en condiciones específicas.

15 La Figura 4 proporciona difractogramas de rayos X de trehalosa secada por pulverización y trehalosa secada por pulverización con leucina al 10 % y 20 % en p/p después del secado por pulverización en las condiciones especificadas.

20 La Figura 5 es una imagen de microscopio electrónico de barrido de trehalosa después del secado por pulverización en condiciones específicas.

La Figura 6 proporciona imágenes de microscopio electrónico de barrido de trehalosa con leucina al 10 % en p/p (izquierda) y 20 % en p/p (derecha) después del secado por pulverización en las condiciones especificadas.

25 La Figura 7 es una traza de EMG que muestra la contracción uterina después de la inhalación de oxitocina. La flecha denota el retraso entre administración y contracción. El brote inicial está rodeado por una línea de puntos. La línea negra representa una muestra aleatoria de treinta minutos de actividad inducida por oxitocina. La línea discontinua representa el tiempo total que duró la actividad uterina inducida por la oxitocina antes de volver al valor inicial.

30 La Figura 8 es una serie de gráficos que proporcionan un análisis del comportamiento de EMG uterino durante el periodo post-parto inmediato y después de la administración de oxitocina intrapulmonar (IP) e intramuscular (IM), (a) retraso entre la administración de oxitocina y la respuesta de EMG; (b) duración del primer brote de EMG; (c) número de brotes de EMG en los primeros 30 minutos; (d) duración total de la actividad de EMG. Datos expresados como media  $\pm$  EEM.  $P > 0,05$  ANOVA MR;  $n = 5$ . Las barras verdes representan la actividad uterina inmediatamente después del parto, las barras azules representan la actividad uterina después de la administración de polvo seco y las barras rojas representan la actividad uterina después de la administración intramuscular.

40 La Figura 9 muestra imágenes de video del broncoscopio de una tráquea de oveja antes (a) y después (b) de la administración de polvo.

45 La Figura 10 muestra distribuciones de energía superficial no polar a dilución finita en cromatografía de gases inversa.

La Figura 11 muestra las distribuciones de energía superficial polar a dilución finita en cromatografía de gases inversa.

50 La Figura 12 muestra las distribuciones de energía superficial total a dilución finita en cromatografía de gases inversa.

La Figura 13 muestra el trabajo de las distribuciones de energía superficial de cohesión determinadas a dilución finita en cromatografía de gases inversa.

55 La Figura 14 muestra la energía superficial a dilución infinita en cromatografía de gases inversa.

60 La Figura 15a es una traza de EMG que muestra la contracción uterina después de la inhalación de oxitocina administrada por la formulación 1 que contiene manitol, glicina y leucina en cantidades iguales del ejemplo 10. La línea discontinua muestra el tiempo de administración de la formulación y la línea continua el inicio de la contracción uterina. El eje x está en hh:mm:ss y el eje y está en mV.

65 La Figura 15b es una traza de EMG que muestra la contracción uterina después de la inhalación de oxitocina administrada por la formulación 2 que contiene 90 % de trehalosa y 10 % de leucina del ejemplo 10. La línea discontinua muestra el tiempo de administración de la formulación y la línea continua el inicio de la contracción uterina. El eje x está en hh:mm:ss y el eje y está en mV.

La Figura 16a es una traza de EMG que muestra la contracción uterina después de la inhalación de oxitocina administrada por la formulación 3 que contiene 90 % de PVP(30) y 10 % de leucina del ejemplo 10. La línea discontinua muestra el tiempo de administración de la formulación y la línea continua el inicio de la contracción uterina. El eje x está en hh:mm:ss y el eje y está en mV.

La Figura 16b es una traza de EMG que muestra la contracción uterina después de la administración intramuscular de oxitocina (formulación 4 del ejemplo 10). La línea discontinua muestra el tiempo de administración de la formulación y la línea continua el inicio de la contracción uterina. El eje x está en hh:mm:ss y el eje y está en mV.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Secado por pulverización

El secado por pulverización es un proceso de una sola etapa que implica la formación de polvos a partir de una solución de partida del material disuelto deseado. Por definición, es la transformación de la alimentación de un estado fluido a una forma seca pulverizando la alimentación líquida en un medio de secado caliente. Cuatro etapas clave en el proceso de secado por pulverización son: (i) atomización de la alimentación a través de la boquilla, (ii) contacto de pulverización-aire entre las gotitas de líquido y el gas de secado, (iii) secado de partículas mediante evaporación de líquido y (iv) recogida del polvo final.

Refiriéndose al esquema de la Figura 1, el aire se introduce en el sistema 1 y es calentado por el calentador 2 suministrado antes de la medición de la temperatura de entrada 3. La alimentación de líquido se extrae por separado en la boquilla 4, en la que se forman las gotitas y se dispersan en la cámara de secado 5 que se mezcla con el aire caliente. En este punto, se forma una partícula seca. La temperatura de salida se mide 6 a medida que las partículas se mueven hacia el ciclón 7 en el que el polvo se separa del aire. El polvo queda atrapado en el recipiente de recogida 8 para ser recuperado, mientras que el aire se filtra en todas las partículas finas que pueden haber quedado en la corriente de aire en el filtro de la bolsa 9. La circulación de aire en el secado por pulverización se continúa con el trabajo del aspirador 10.

La atomización es una parte muy importante en la definición de las gotitas y, por ende, el tamaño y distribución de partículas subsiguientes. Implica la formación de una pulverización de gotitas del líquido a granel cuando la alimentación se bombea a través de un pequeño orificio en la boquilla. En el caso de una boquilla de dos fluidos, el gas suministrado impacta sobre el volumen de líquido en la boquilla a altas velocidades. Este gas de alta velocidad crea grandes fuerzas de fricción sobre las superficies del líquido, haciendo que el líquido se desintegre y forme gotitas de pulverización, que se proyectan hacia la cámara de secado.

Las propiedades del material disuelto y las condiciones de secado influirán en las características finales del polvo. Con la evaporación del disolvente líquido de la superficie de la gotita (agua en este caso) se produce una precipitación de solutos. A menudo, a medida que se forma la partícula, puede formarse una costra y la costra puede ser porosa, semiporosa o no porosa, lo que permite la eliminación de la humedad a diferentes tasas y con diferentes efectos. Por lo tanto, pueden formarse partículas de morfología variable. El control de las condiciones de secado es, por lo tanto, una consideración importante.

De acuerdo con los experimentos realizados, se variaron las formulaciones de los polvos y sus parámetros de secado por pulverización. En todas las formulaciones en polvo, se usó manitol como material de referencia, con la adición de diversos aminoácidos. Los parámetros de secado por aspersión que se mantuvieron constantes durante todo el tiempo fueron la configuración del aspirador, que se ajustó al flujo total y el caudal de aire del atomizador (800 l/hora).

Para cada formulación, el manitol, la glicina y la oxitocina se secaron por pulverización en cantidades fijas con cantidades variables de leucina. Las condiciones de secado por pulverización se fijaron con la temperatura de salida establecida a 70 °C.

Los parámetros que se usaron se muestran en la Tabla 1 a continuación. El porcentaje mostrado de los aminoácidos se calculó con el de la cantidad de manitol solamente, no con el del contenido total de polvo. El porcentaje mostrado de oxitocina fue el del contenido total de polvo.

Tabla 1

Ensayo	1	2	3	4	5	6
Manitol (g)	5	5	5	5	5	5
Glicina (%)	30	30	30	30	30	30
Oxitocina (%)	1	1	1	1	1	1
Leucina (%)	15	50	15	50	32,5	32,5
Caudal de alimentación líquida (ml/min)	8	8	2	2	5	5

Los polvos se pesaron y se disolvieron en la cantidad apropiada de agua Milli-Q para lograr la concentración de alimentación deseada. Luego, las soluciones se secaron por pulverización para producir polvos secos usando el secador por pulverización Buchi 190 Mini (Buchi, Suiza).

#### Ejemplo 2

##### Deposición por aerosol in vitro

La deposición por aerosol *in vitro* de los polvos se midió usando el impactador de doble etapa (TSI) (Copley Scientific Ltd., Nottingham, Reino Unido). Los métodos TSI y la configuración se realizaron de acuerdo con la Farmacopea Británica 2011 como se muestra en la Figura 2. En la parte D y la parte H de material de vidrio, se agregaron 7 ml y 30 ml de agua respectivamente durante el ensamblaje del TSI.

El TSI es un modelo simple del tracto respiratorio; con las cámaras superior (etapa 1) e inferior (etapa 2) que representan las vías respiratorias superior e inferior respectivamente. El diámetro aerodinámico cortado en la primera etapa es de 6,4  $\mu\text{m}$ . Las partículas de más de 6,4  $\mu\text{m}$  deben recogerse idealmente en el líquido de 7 ml; las partículas más pequeñas (<6,4  $\mu\text{m}$ ) que no se recogen procederán a la etapa inferior, que contiene 30 ml de líquido. La mayoría de las partículas se recogerán en la etapa inferior debido al exceso de líquido, sin embargo, si el tamaño de las partículas es demasiado pequeño para la recogida en la etapa inferior, se producirá a la salida.

Las mediciones para cada muestra de polvo se realizaron en cuatro réplicas. Para cada réplica, cinco cápsulas de HPMC tamaño 3 se llenaron manualmente con  $20,4 \pm 0,24$  mg con el polvo de muestra y se colocaron en cinco inhaladores monodosis (Miat, Italia). Se fijó una bomba de vacío a la parte F y el caudal de aire se calibró a 60 l/min y se ajustó a 5 segundos. La cápsula fue perforada en el dispositivo y colocada en el adaptador (parte A) lista para ser activada por la bomba de vacío. Cuando se encendió la bomba, el polvo fue transportado desde el dispositivo de inhalación al aparato TSI.

Las cinco cápsulas se activaron en el mismo TSI. Las cápsulas usadas y los inhaladores se lavaron luego con agua Milli-Q en un matraz volumétrico de 100 ml y se enrasaron. Esto se llamó la etapa "residual". Las partes que conformaron la Etapa 1 (partes A, B, C y D) se lavaron en un matraz volumétrico de 200 ml y las partes que conformaron la Etapa 2 (partes E, F, G y H) se lavaron en un matraz volumétrico de 50 ml con agua Milli-Q y se llamaron "etapa 1" y "etapa 2", respectivamente. Las cantidades de oxitocina en cada etapa de TSI se determinaron mediante un ensayo LC/MS. La fracción de partículas finas (FPF) se calculó como la cantidad de polvo que había alcanzado la etapa 2 del aparato TSI dividida por la cantidad total de fármaco que se analizó. Esta prueba fue la medida más importante, ya que puede determinar si un polvo que contiene oxitocina puede formularse con una deposición por aerosol adecuada y la consiguiente absorción del pulmón.

Tabla 2

Número de ensayo	Fracción de partículas finas (%)
1	57
2	70
3	67
4	73
5	64

Las partículas que pasan a la parte inferior del dispositivo TSI, es decir, la etapa 2, se consideraron respirables, por lo tanto, a mayor fracción de partículas finas (FPF), mayor será la posibilidad de que el fármaco llegue a los alvéolos y se absorba en el torrente sanguíneo, que es ideal en un DPI. La FPF de los cinco ensayos mostrada en la Tabla 2 fue elevada en comparación con una FPF promedio de los polvos de formulación de vehículos tradicionales (~10-20 %).

Los resultados mostraron que la FPF podía alcanzar entre 55 y 75 %, lo que significa que se lograron niveles muy eficaces de aerosolización y se administraron altas cantidades de oxitocina en las formulaciones como la dosis terapéuticamente activa requerida.

Estabilidad de oxitocina

Los péptidos pueden desnaturalizarse potencialmente debido al calor extremo. De las pruebas que se realizaron en este estudio, la única indicación en cuanto a la estabilidad de la oxitocina fue el contenido del ensayo LC/MS siguiendo los experimentos de TSI. Cuando se analizó el contenido de oxitocina de todas las etapas del aparato TSI, las cápsulas y los dispositivos de inhalación, se recuperó un promedio de  $90,23 \pm 5,41$  % de la dosis inicial de la cápsula, lo que sugiere que la oxitocina no se degradó de las temperaturas usadas en el proceso de secado por aspersión o de los procesos de manipulación.

## 10 Ejemplo 3

Trehalosa/leucina

La trehalosa es un azúcar no reductor con alta temperatura de transición vítrea ( $T_v$ ) de  $117$  °C que se ha usado como excipiente en varios estudios para la estabilización de proteínas en formulaciones de estado sólido seco. Las moléculas de azúcar se usan generalmente como excipientes estabilizadores en este contexto, ya que contienen grupos carboxílicos que pueden formar enlaces de hidrógeno con la proteína de interés y, por lo tanto, estabilizar la bio-macromolécula con el reemplazo del enlace de hidrógeno en estado sólido seco. El secado por pulverización se ha usado con éxito en diversos estudios para la fabricación de formulaciones de polvo seco inhalables, ya que el proceso es capaz de producir partículas finas con un intervalo de tamaño de partículas adecuado para la administración pulmonar.

En un intento por formular proteínas farmacéuticas inhalables para la administración pulmonar, la trehalosa secada por pulverización se produce a una temperatura de salida relativamente baja de  $70$  °C para minimizar el impacto del estrés por calor en la estabilidad de procesamiento de la proteína relevante. Las condiciones fueron, por lo demás, las mismas que las de los ejemplos descritos con manitol y aminoácidos.

Mientras que la trehalosa es relativamente cristalina como materia prima, la trehalosa secada por pulverización en las condiciones especificadas de secado por pulverización parece ser completamente amorfo (véase la Figura 3). Esta formulación resultante puede estabilizar adicionalmente la proteína de interés con la estabilización en estado vítreo al proporcionar una matriz amorfo que reduce la movilidad molecular de la biomacromolécula en la formulación.

Sin embargo, la formulación resultante de trehalosa solo está compuesta por estructuras primarias fusionadas con un tamaño de partículas grande que es poco probable que sea adecuado para la administración pulmonar (Figura 5). La incorporación de leucina en la formulación de una concentración del 10 % en p/p mejora esencialmente el tamaño de las partículas y la morfología de la formulación secada por pulverización en las condiciones especificadas (Figura 6). La incorporación de leucina parece ser capaz de evitar la fusión de las estructuras de partículas primarias, por lo demás, altamente higroscópicas, de la trehalosa del proceso de secado por pulverización y, por lo tanto, retiene el intervalo de tamaño de partículas finas adecuado para la administración pulmonar. Además, la presencia de leucina también puede mejorar estas propiedades de las partículas con el almacenamiento a largo plazo, proporcionando una protección contra la humedad de la matriz amorfo interna de las formulaciones de trehalosa secada por pulverización (Figura 4).

## 45 Ejemplo 4

Materiales

D-manitol se obtuvo de VWR International Ltd. (Poole, BH15 ITD, Inglaterra). L-leucina (LEU), glicina (GLY) y L-alanina (ALA) se obtuvieron de Sigma-A Chemicals (Castle Hill, NSW, Australia).

Preparación de polvos secados por pulverización

Las soluciones acuosas que contienen manitol y aminoácidos seleccionados (LEU, GLY, ALA) en varias composiciones como se muestra en la Tabla 1 se disolvieron en 200 ml de agua Milli-Q. Se incorporó una pequeña cantidad de azul de metileno (10 mg) en cada formulación para permitir una cuantificación simple del polvo mediante análisis espectrofotométrico UV-VIS como se describe a continuación. Posteriormente, las formulaciones preparadas se secaron por pulverización usando un mini secador por pulverización Buchi 190 con una boquilla de dos fluidos de 0,5 mm, usando las siguientes condiciones de funcionamiento estándar: caudal de aire, 800 l/h; ajuste de la bomba, 5 (6,67 ml/min); ajuste del aspirador, 20; temperatura de salida,  $75$  °C.

Análisis de distribución del tamaño de partículas

La distribución del tamaño de partículas de los polvos se determinó mediante dispersión de luz láser usando el Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido) equipado con una celda Scirocco y una unidad de dispersión de polvo seco Scirocco 2000. Los polvos se dispersaron en aire a una presión de cizalla

de 3,0 a 4,0 bar, que se seleccionó para lograr una desaglomeración adecuada. El tamaño de partículas promedio se midió en tres réplicas para cada muestra. El diámetro medio del volumen ( $D_{50}$ ) se derivó de los datos de difracción usando el software incorporado para cada muestra.

#### 5 Aerosolización de polvo *in vitro* y deposición de partículas

El rendimiento de la aerosolización de partículas *in vitro* y la deposición de partículas se evaluaron usando un impactador de doble etapa (TSI, Apparatus, A; British Pharmacopoeia, 2000) con el inhalador de monodosis (Miat S.p.A., Milán, Italia) como dispositivo de dispersión por aerosol. El caudal se ajustó a 60 l/min usando un modelo de controlador de flujo crítico TPK 2000 y un modelo de medidor de flujo DFM 2000 (Copley Scientific Limited, Nottingham, R.U.). Aproximadamente 20 mg de cada polvo se llenaron en cápsulas de HPMC de tamaño 3 (Capsugel, Peapack, NJ, EE. UU.) para las pruebas que se realizaron en un laboratorio con aire acondicionado ( $20 \pm 2$  °C,  $50 \pm 5$  % de humedad relativa). Cada cápsula se accionó desde el inhalador durante 4 segundos para cada medición ( $n = 5$ ). La cantidad de polvo depositado en diferentes etapas se determinó usando un espectrofotómetro de luz UV-VIS como se describe a continuación. El diámetro de corte para el TSI a 60 l/min es de aproximadamente  $6,3 \mu\text{m}$  (Hallworth y Westmoreland, 1987).

La cantidad total de polvo depositado en el inhalador, etapa 1 ( $E_1$ ) y etapa 2 ( $E_2$ ) fue la dosis recuperada (DR). La cantidad de polvo depositado en las etapas 1 y 2 fue la dosis emitida (DE) y se calculó como el porcentaje de la DR (ec. 1). La fracción de partículas finas (FPF) se definió como el porcentaje de DR depositado en la etapa 2 (ec. 2).

$$DE\% = \frac{(E_1 + E_2) \times 100}{DR} \quad (1)$$

$$FPF\% = \frac{E_2 \times 100}{DR} \quad (2)$$

#### 25 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La morfología de las partículas se visualizó bajo un microscopio electrónico de barrido (Phenom™, FEI company, EE. UU.). Las muestras de polvo se vertieron con cuidado sobre una cinta de carbono de doble cara montada en un soporte de muestra para su examen bajo MEB. Se eliminó el exceso de polvo para dejar una fina capa de partículas en la superficie de la cinta. Las muestras se recubrieron por pulverización catódica con oro usando un potencial eléctrico de 2,0 kV a 25 mA durante 6 minutos con un recubridor por pulverización catódica (K550X, EMITKCH). Las micrografías MEB se capturaron usando el software de captura de imágenes incorporado.

#### Resultados

35 El tamaño medio de partículas ( $D_{50}$ ) de todas las formulaciones medidas con Mastersizer 2000 se enumeran en la Tabla 4. El secado por pulverización con manitol solo produjo partículas pequeñas con  $D_{50}$  de  $1,87 \mu\text{m}$ . Sin embargo, este polvo era completamente cristalino y no tenía la estructura de vidrio amorfo necesaria para estabilizar las biomoléculas.

40 La leucina es un excipiente que puede usarse para mejorar la aerosolización de partículas secadas por pulverización, pero también la leucina ayuda en la formación de partículas adecuadas de tamaño pequeño. Sin embargo, la glicina y la alanina, aunque son estructuralmente similares a la leucina, no pudieron lograr efectos similares ya que aumentan significativamente el tamaño de partículas de las formulaciones. Vale la pena señalar que, si bien la concentración inicial en la solución de alimentación es un determinante conocido del tamaño de partículas, el intervalo de carga de sólidos usado en el espacio de diseño del estudio no parece tener una gran influencia en el tamaño geométrico de las partículas, medido por difracción láser. La carga total de sólidos en la solución de alimentación varió de 2,50 % a 3,72 % en el presente estudio. Se propone que el cambio en el tamaño de partículas dentro de este intervalo relativamente pequeño de carga sólida fue insignificante en comparación con los efectos de los excipientes de la formulación en la cohesión y la forma. Además, considerando los tamaños de partículas producidos a partir de los aminoácidos mixtos, es posible que el uso combinado de estos aminoácidos con leucina en concentraciones apropiadas también pueda influir en el tamaño de partículas en contraste con el logrado por la leucina sola.

#### 55 Dispersibilidad y desaglomeración del polvo

El manitol secado por pulverización produjo partículas con un  $D_{50}$  de  $2,83 \mu\text{m}$  que parece indicar una capacidad de dispersión satisfactoria para formulaciones de polvo seco inhalable, pero también produce la dosis más baja emitida

(DE). La retención de polvo en el dispositivo después del experimento fue visualmente evidente, y sugiere un polvo más cohesivo que otras formulaciones aquí. La presencia de aminoácidos en todas las combinaciones dio como resultado una mejora de la DE (Tabla 4). El efecto beneficioso de la leucina fue evidente en su capacidad para compensar el efecto de los otros dos aminoácidos en D<sub>50</sub> y en mejorar tanto la desaglomeración como la DE.

Aerosolización *in vitro* y deposición de partículas

El TSI se usó como tamiz preliminar de este intervalo de formulaciones para proporcionar información aerodinámica de aerosoles.

Los resultados de la fracción de partículas finas (FPF) muestran que las formulaciones que contienen leucina, con D<sub>50</sub> por debajo de 5 µm, muestran la FPF más alta de más del 68 % (Tabla 4). Los polvos que contienen aminoácidos sin leucina, con D<sub>50</sub> por encima de 5 µm, muestran una FPF significativamente más baja como lo demuestran las formulaciones que contienen glicina/alanina 30/30 %, alanina al 30 % y glicina al 30 %, con FPF de 2,96 %, 9,11 % y 34,62 %, respectivamente. Si bien el manitol solo muestra una FPF razonable de 66,20 %, esta formulación también muestra la DE más bajo). Los aminoácidos combinados al 15 % fueron más efectivos para mejorar la FPF (Tabla 4). Estos resultados sugieren que la inclusión de glicina y alanina con leucina en las concentraciones apropiadas puede mejorar el rendimiento de la aerosolización de la formulación.

Morfología superficial

Se observó que el manitol secado por pulverización como material de base solo formaba pequeñas partículas esféricas que están muy aglomeradas. El resultado es consistente con los datos de distribución de tamaño de partículas del Mastersizer. Tras la adición de aminoácidos, las partículas esféricas se conservaron en todas las formulaciones que contenían leucina, independientemente de la presencia de glicina y/o alanina. Otras formulaciones que contienen glicina y/o alanina sin la adición de leucina formaron partículas mucho más grandes de forma irregular con superficies rugosas.

El resultado sugiere que la presencia de leucina ayuda en la formación de partículas esféricas al recubrir la superficie de la partícula de secado y, por lo tanto, proporciona una cubierta protectora que conserva las partículas individuales a medida que se acumulan, evitando cualquier fusión, mientras que la presencia de glicina y alanina no evita este efecto. Los resultados anteriores indicaron que una concentración relativamente alta de leucina (es decir, >5 % en p/p) tiende a originar partículas corrugadas. La morfología de las partículas que contienen leucina en el presente estudio parece comportarse de manera diferente. Las concentraciones de leucina usadas dentro del espacio de diseño del estudio (15 a 30 % molar), que corresponde aproximadamente a 10 a 18 % en p/p, no formaron partículas corrugadas. Por lo tanto, se especula que la presencia de glicina y/o alanina alteró la estructura central de las partículas esféricas de secado, mientras que la leucina tendió a residir en la superficie de la partícula, proporcionando un recubrimiento para reducir la cohesión de la superficie y evitar la fusión en el proceso de secado.

En el presente estudio, la leucina fue capaz de mejorar el rendimiento de aerosolización de las formulaciones de manitol sin necesidad de la formación de partículas corrugadas. Además, los resultados de FPF sugieren que esto puede ser ventajoso.

Tabla 3

Factores	Niveles de factores usados en la formulación		
	-1	0	-1
X <sub>1</sub> = leucina (% molar)	0	15	30
X <sub>2</sub> = glicina (% molar)	0	15	30
X <sub>3</sub> = alanina (% molar)	0	15	30
Respuestas	Proceso y parámetros de formulación permanecen constantes		
Y <sub>1</sub> = Mastersizer D <sub>50</sub> (µm)	Contenido de manitol: 5 g		
Y <sub>2</sub> = Spraytec D <sub>50</sub> (µm)	Volumen de solución de alimentación: 200 ml		
Y <sub>3</sub> = Spraytec DE (mm)	Configuración del aspirador: 20		
Y <sub>4</sub> = Fracción de partículas finas TSI (%)	Configuración de la bomba 5 (6,67 ml/min)		
Y <sub>5</sub> = DE TSI (%)	Caudal de aire: 800 l/h		
Y <sub>6</sub> = Valor de cohesión (kPa)	Temperatura de salida: 75 °C		
Abreviatura: DE, dosis emitida; SP, secado por pulverización; TSI, impactador de doble etapa.			

Tabla 4

Lote	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>	Y <sub>5</sub>	Y <sub>6</sub>
1	0	0	0	1,87	2,83	15,80	66,20	78,04	4,53
2	30	0	0	1,75	2,70	17,50	80,10	91,11	2,21
3	0	30	0	3,75	5,52	19,20	34,62	89,59	2,39
4	30	30	0	2,05	3,50	18,00	72,62	88,00	1,04
5	0	0	30	6,69	12,02	18,90	9,11	92,47	0,71
6	30	0	30	2,27	3,24	17,50	68,64	89,99	1,21
7	0	30	30	13,97	28,55	19,20	2,96	85,90	0,43
8	30	30	30	1,97	3,58	17,20	69,13	87,40	1,32
9 <sup>a</sup>	15	15	15	2,05	2,58	16,60	76,84	88,79	1,82
10 <sup>a</sup>	15	15	15	1,95	2,49	17,40	76,40	86,97	1,79
11 <sup>a</sup>	15	15	15	1,99	2,28	16,40	74,27	88,82	2,11
12 <sup>a</sup>	15	15	15	n/d	2,40	17,0	n/d	n/d	1,32

<sup>a</sup> Indica el punto central del diseño. Abreviatura: n/d, no disponible.

Ejemplo 5

5 Ensayo *in vivo*

En el día 135 de edad gestacional, las ovejas preñadas (n = 5) fueron anestesiadas con tiopentona en preparación para la cirugía. Se usó isoflurano (2,5 % en oxígeno) para mantener la anestesia y se administró depomicina, penicilina procaína y dihidroestreptomina para aliviar el dolor y reducir el riesgo de infección. Cada oveja fue afeitada y se realizó una incisión de 10 cm en la piel abdominal en la línea media debajo del ombligo para exponer la pared uterina, con cuidado para evitar los vasos sanguíneos grandes.

Tres cables de acero inoxidable estériles para medir la actividad electromiográfica (EMG) (0,07 mm de diámetro, dentro de un catéter de 2 mm) se incrustaron en la capa de músculo liso del miometrio que rodea la matriz y se mantuvieron allí por dos puntos. Los electrodos se pasaron a través de un catéter y salieron de la oveja a través de una pequeña incisión (2 cm) por el flanco derecho. Se insertó un catéter en la yugular derecha para tomar muestras de sangre e inducir el parto. Las ovejas fueron devueltas a jaulas metabólicas y se les dio 3-5 días para recuperarse de la cirugía.

El parto se indujo con dos inyecciones intravenosas de 5 ml de dexametasona (que consiste en 5 mg de fosfato de dexametasona y 10 mg de fenilpropionato de dexametasona) con 24 horas de diferencia. El parto se produjo 54 ± 2 horas después de la primera inyección de dexametasona.

Las administraciones de oxitocina, como se detalla arriba, se realizaron dentro de 15 horas después del parto. Cada oveja recibió una dosis intratraqueal de formulación de oxitocina en polvo seco, una instilación intratraqueal de oxitocina en solución y una inyección intramuscular de oxitocina. Hubo al menos un periodo de lavado de una hora y media entre cada tratamiento.

Para la administración intratraqueal, se pasó un endoscopio a través de la fosa nasal hacia la tráquea y se colocó cerca de la primera bifurcación bronquial, en la que se liberó 1 ml de una alícuota de oxitocina en solución (10 UI) o se administraron 10 mg (promedio) de polvo seco a través de un dispositivo de administración de polvo PennCentury modificado.

La formulación de polvo seco comprendía una composición secada por pulverización, como se describe en el ejemplo 1. Este polvo contenía 13 unidades de oxitocina por mg en masa, secado por co-pulverización en proporciones iguales en masa de manitol, glicina y leucina.

Durante este procedimiento, las imágenes de video del broncoscopio se capturaron usando una cámara de video Linvalec IM3301 Pal conectada a un endoscopio (Pentax FG-16X), que se guardó como un archivo digital en un ordenador usando el software Video Capture. En las Figuras 9a y 9b se proporcionan ejemplos de las imágenes. La imagen de la Figura 9a muestra la tráquea de la oveja antes de la administración del polvo, y la Figura 9b muestra la imagen aproximadamente 30 segundos después de la administración. La Figura 9b muestra una evidencia clara de polvo blanco no disuelto, ya que las manchas blancas no estaban presentes antes del parto, lo que indica que no se produjo una disolución inmediata en el sistema pulmonar.

Se usó un cyberamp 380 junto con el hardware MACLAB (frecuencia de muestreo de 400Hz) y el software Chart 4 (intervalo de entrada de 10V) para mostrar y registrar el potencial de acción originado por las células musculares lisas dentro del útero. El cyberamp 380 usó la sonda AI401 con entrada positiva establecida en CA y entrada negativa establecida en tierra. El corte de CA fue de 10 Hz y la ganancia del prefiltro se estableció en 100 mV. El filtro de paso bajo se ajustó a 300 Hz, el filtro de muesca se desactivó, la ganancia de salida se estableció en 5 y la ganancia total se dejó en 500. Se realizó un ANOVA de medidas repetidas en dos direcciones para determinar la significancia estadística de nuestros datos. Véase la figura 7.

Se analizaron varias propiedades de la actividad EMG registrada. Con respecto al tiempo transcurrido (retraso) desde la administración de oxitocina hasta el brote inicial de la actividad EMG, la administración a través de los pulmones produce un tiempo de inicio más rápido para la primera contracción en contraste con la administración IM (Figura 8a). No se observaron diferencias en la duración del brote inicial de la actividad EMG (Figura 8b) ni hubo una diferencia en el número de brotes ocurridos durante los primeros 30 minutos después del brote inicial de actividad (Figura 8). Sin embargo, la duración total de la actividad EMG fue significativamente más larga para la IM de la oxitocina en comparación con la administración de las vías respiratorias y la actividad normal observada inmediatamente después del parto (Figura 8).

Estos estudios *in vivo* demuestran que las respuestas contráctiles uterinas a la oxitocina administrada por vía pulmonar ocurren en promedio después de aproximadamente 120 segundos en contraste con la administración IM que ocurrió en promedio después de aproximadamente 250 segundos. Sorprendentemente, el inicio de la acción a partir de la administración pulmonar de polvo fue significativamente más rápido en comparación con la administración intramuscular, y también fue consistente con los perfiles de plasma versus tiempo. El inicio de acción promedio fue aproximadamente un 50 % menor que para IM. Esto es a pesar del hecho de que las partículas de polvo seco contienen aproximadamente un 30 % de leucina, que es un aminoácido poco soluble e hidrófobo, que podría esperarse que retrasara la disolución. Además, se espera que una proporción sustancial de la leucina esté presente en la superficie del polvo. La imagen 9b respalda este concepto de que no se espera una rápida disolución de dicho polvo en este entorno. Los datos también demuestran que las respuestas contráctiles uterinas a la oxitocina en polvo seco pulmonar imitan la actividad que se observa de forma natural en el periodo post-parto inmediato, como se observó con la duración del brote inicial de la actividad uterina y el número total de brotes de actividad EMG registrados en los siguientes treinta minutos.

Ejemplo 6 (no dentro del alcance de las reivindicaciones)

Formulación de antígeno de gripe en polvo seco

La muestra de polvo del antígeno de gripe, hemaglutinina (HA), se disolvió primero con otros excipientes (es decir, manitol 45 % en p/p, glicina 45 % en p/p y leucina 10 % en p/p) en una solución acuosa para producir una formulación final con una carga de antígeno de 5 µg de HA por mg de polvo. Luego, esta solución se secó por pulverización en un secador de pulverización de laboratorio Buchi 190, a una temperatura relativamente baja, es decir, a una temperatura de salida de 70 grados C para minimizar el efecto del estrés por calor sobre la integridad del antígeno en las siguientes condiciones de secado por pulverización: ajuste de la bomba 6,7 ml/min; aspirador, 20 (100 %); caudal de aire, 800 l/h. La formulación de antígeno de gripe secada por pulverización se recogió luego del recipiente de recogida para su almacenamiento.

Ejemplo 7 (no dentro del alcance de las reivindicaciones)

Método para ensayar la actividad biológica de la formulación de antígeno de gripe en polvo seco

A continuación se describe el método para ensayar la actividad biológica de la formulación de antígeno de gripe en polvo seco secado por pulverización que contiene hemaglutinina (HA) como la proteína activa. El ensayo de hemaglutinación (ensayo HA) se utiliza para probar la integridad de la proteína HA en la formulación de polvo seco. La formulación de antígeno de gripe en polvo seco de interés se reconstituye primero con solución salina tamponada con fosfato (PBS) inmediatamente antes de la prueba en una solución de concentración estándar de proteína HA. Luego, una pequeña cantidad de esta solución reconstituida se coloca en la primera columna de una placa de 96 pocillos. Luego, la solución se diluye 1:2 con PBS a través de la placa de 96 pocillos mediante dilución en serie. Acto seguido se agrega una cantidad estándar de solución de glóbulos rojos de pollo con una concentración estándar de glóbulos rojos (es decir, 1 %) a cada pocillo de la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos inmediatamente después de la adición de los glóbulos rojos. Dado que la proteína HA intacta causará la hemaglutinación de los glóbulos rojos, el nivel de dilución que la solución que contiene HA puede sostener antes de que ya no sea capaz de causar hemaglutinación a los 30 minutos indicará la cantidad de proteína HA intacta en la formulación. Se descubrió que el antígeno estaba por encima del 95 % activo, dentro de los límites de este procedimiento.

Ejemplo 8

Medición de cohesión de partículas y valores de cohesión preferidos.

Aparatos y materiales

El aparato usado fue el módulo de celdas de cizalla de 1 ml y un pistón ventilado, como parte de la unidad de reómetro FREEMAN FT4 (Freeman Technology, Reino Unido) y la interfaz de usuario del ordenador y el módulo de acondicionamiento de celdas de cizalla de 1 ml. Los materiales usados fueron polvos secados por pulverización de 1:99 % p/p de leucina/manitol, 3:97 % p/p de leucina/manitol, 5:95 % p/p de leucina/manitol, y 10:90 % p/p de leucina/manitol. Estos polvos se produjeron siguiendo las condiciones del Ejemplo 1 anterior.

Una muestra de polvo se cargó en la celda y se acondicionó. Durante el acondicionamiento, el módulo de acondicionamiento de celdas de cizalla de 1 ml se empleó para alterar suavemente el polvo a medida que se movía por toda la muestra. El fin de esto fue homogeneizar el polvo eliminando el exceso de aire y las partículas aisladas de polvo precompactado. Después del acondicionamiento, se comprimió el polvo. Esto fue ejecutado por el pistón ventilado de superficie plana a fin de asegurar interacciones uniformes partícula-partícula. La compresión fue seguida por cizallamiento. Durante el cizallamiento, se empleó una celda de cizalla de 24 mm (un componente unitario de: base, deslizamiento, cuña de división y módulo de celdas de cizalla). El cabezal de cizalla que comprende 18 álabes, se movió verticalmente hacia abajo, induciendo un esfuerzo de cizalla normal, mientras que los álabes del cabezal de cizalla perforaron la superficie del polvo. Luego se midió el esfuerzo de cizalla y se alcanzó el máximo cuando el polvo no pudo resistir el esfuerzo de cizalla. El gráfico del esfuerzo de cizalla contra el esfuerzo normal fue generado por el software integrado FT4 FREEMAN. A partir del gráfico, el y-intercepto extrapolado proporciona la cohesividad del polvo en la consolidación cero. Los datos de la ffc [la relación del mayor esfuerzo principal (esfuerzo de consolidación),  $\sigma$ ], al límite elástico no confinado,  $\sigma_c$ ] también se registraron.

Tabla 5

Muestra	Cohesión media (kPa)	Fluidez (ffc)
1 % de leucina	3,4	1,4
3 % de leucina	2,4	2
5 % de leucina	2,3	2
10 % de leucina	1,4	2,9

De 1 a 10 % de contenido de leucina, un aumento en el contenido de leucina disminuye la cohesión y mejora el parámetro de fluidez (ffc).

Este experimento se repitió luego usando leucina secada por pulverización y PVP, producido y probado bajo condiciones similares. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 6

Muestra	Cohesión media (kPa)
0 % de leucina	4,0
2 % de leucina	3,5
4 % de leucina	3,4
8 % de leucina	1,2
10 % de leucina	1,2
20 % de leucina	0,7

## Ejemplo 9

### Mediciones de energía superficial

#### Muestras

Dos lotes de polvo se secaron por pulverización en agua usando las condiciones descritas en el ejemplo 1, pero en las que los polvos comprendían composiciones de manitol puro o manitol con 10 % p/p de L-leucina añadida.

### Determinación de la energía superficial mediante cromatografía de gases inversa

Las energías superficiales de estos polvos se determinaron mediante cromatografía de gases inversa (IGC, Surface Measurement Systems Ltd, y Londres, Reino Unido). Aproximadamente 0,33 g de cada polvo se empaquetaron en columnas de vidrio pre-silanizadas (300 mm x 3 mm de diámetro interno) que se taponaron ligeramente con lana de vidrio silanizada en ambos extremos. Las columnas rellenas de polvo se acondicionaron durante 2 horas a 303 K antes de cada medición para eliminar las impurezas de la superficie. Las sondas se transportaron a la columna por helio con un caudal de gas de 10 sscm (centímetro cúbico estándar por minuto) y los tiempos de retención se detectaron mediante un detector de ionización de llama. El volumen muerto se calculó basándose en el tiempo de elución del metano que se analizó a una concentración de 0,1 p/p<sup>0</sup> (en el que p denota la presión parcial y p<sup>0</sup> la presión de vapor).

### Determinación de la energía superficial en dilución infinita:

Hexano, heptano, octano, nonano y decano de calidad GC (todos de Sigma-Aldrich, GmbH, Steinheim, Alemania) para energía superficial no polar ( $\gamma^{NP}$ ) y se utilizaron dos sondas polares (es decir, diclorometano y acetato de etilo) para la energía superficial polar ( $\gamma$ ) a una concentración de 0,03 p/p<sup>0</sup>. El detalle del cálculo de  $\gamma^P$  se describió en otra parte (Thielmann *et al.*, *Investigation of the acid-base properties of an MCM-supported ruthenium oxide catalyst by inverse gas chromatography and dynamic vapour sorption*. Jackson S. D., Hargreaves. J.S.J., Lennon, D., editores. *Catalysis in application Great Britain*, Royal Soc. Chem., pág. 237 (2003), y Traini *et al.*, *Drug Development and*

Industrial Pharmacy 34: 992-1001 (2008). La Figura 1 muestra las contribuciones de energía superficial a dilución infinita.

La energía superficial total ( $\gamma^T$ ) fue el resultado aditivo de las contribuciones no polares ( $\gamma^{NP}$ ) y polares ( $\gamma^P$ ) (Grimsey *et al.*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91: 571-583 (2002). Se calculó el trabajo de cohesión ( $T_{co}$ ) (véase Vanoss *et al.*, *Langmuir* 4: 884-891 (1988) y Tay, *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* (Kidlington) 383: 62-69 (2010). Estos experimentos se realizaron por triplicado.

#### Distribuciones de energía superficial y determinación del área superficial a dilución finita:

Los perfiles de distribución de energía superficial no polar (perfil  $\gamma^{NP}$ ) se determinaron de acuerdo con el método descrito en otra parte (F. Thielmann *et al.*, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 33: 1240-1253 (2007) y Yla-Maihaniemi, *et al.*, *Langmuir* 24: 9551-9557 (2008)). Esto se muestra en la Figura 10. Las energías superficiales no polares en todas las coberturas están claramente reducidas para el polvo que contiene leucina, y en este caso muestra una reducción de más del 30 % a un nivel de cobertura del 1 %. La distribución de energía superficial polar se muestra en la Figura 11.

El área de superficie de Brunauer-Emmet-Teller (BET) se calculó a partir de isothermas de adsorción de hexano. Dividiendo la cantidad adsorbida ( $n$ ) por la capacidad de la monocapa ( $n_m$ , el número de moles de la sonda adsorbida para la cobertura de la monocapa), se calculó la cobertura de la superficie ( $n/n_m$ ). En cada cobertura de superficie, se calculó el volumen de retención neto ( $V_N$ ) para cada sonda. La energía superficial no polar ( $\gamma^{NP}$ ) se calculó a partir de la pendiente ( $2 N_A \sqrt{\gamma^{NP}}$ ) de una gráfica de  $RT \ln V_N$  contra un  $\sqrt{\gamma^{NP}}$  de alcanos. Los  $\gamma^P$  e  $\gamma^T$  se calcularon en cada cobertura de la superficie y luego se construyeron sus perfiles de distribución (como se describe en Das *et al.*, *Langmuir* 27: 521-523 (2011a)).

Las Figuras 12 y 13 muestran que las distribuciones totales de energía superficial calculadas y el trabajo de cohesión también se reducen esencialmente en el caso en que se agrega leucina, por ejemplo, en un 20 % o más, con una cobertura de superficie de aproximadamente el 1 %.

#### Ejemplo 10

##### Ensayos *in vivo* de otras formulaciones

Según el ejemplo 5, se preparó una sola oveja preñada mediante cirugía para implantar los electrodos de EMG y un catéter para permitir la extracción de sangre. La inducción del parto comenzó el mismo día de la cirugía, también según el método expuesto en el ejemplo 5. El parto y el alumbramiento se produjeron 2 días después del comienzo del periodo de inducción.

Las administraciones de oxitocina, como se detalla a continuación, se iniciaron dentro de las 22 horas posteriores al alumbramiento. Hubo un periodo de lavado de una hora y media entre cada tratamiento.

Para la administración intratraqueal, se pasó un endoscopio a través de la fosa nasal hacia la tráquea y se colocó cerca de la primera bifurcación bronquial, en la que se administró una dosis de polvo seco (como se detalla a continuación) a través de un dispositivo de administración de polvo PennCentury modificado. Además de la administración de polvo seco al pulmón, también se administró una inyección intramuscular de oxitocina (como en el ejemplo 5).

Las formulaciones de polvo seco comprendían composiciones secadas por pulverización preparadas como se describe en el ejemplo 1. Las composiciones de estos polvos junto con la dosis nominal administrada se muestran en la Tabla 7. Tiempo transcurrido (retraso) desde la administración de oxitocina hasta el brote inicial de la actividad de EMG. El retraso, el tiempo transcurrido desde la administración de oxitocina hasta el brote inicial de la actividad de EMG también se muestra en la Tabla 7. Las trazas de EMG para estas cuatro dosis se muestran en las Figuras 15 y 16.

Tabla 7

N.º de dosis	Dosis de oxitocina	% de manitol p/p	% de glicina p/p	% de trehalosa p/p	% de PVP(30) p/p	% de leucina p/p	Retraso (s)	
1	200 UI	33,3	33,3			33,3	181	
2	200 UI			90		10	65	
3	200 UI				90	10	150	
4	10 UI	1 ml de inyección intramuscular						232

Sorprendentemente, el inicio de la acción a partir de la administración pulmonar de polvo fue significativamente más rápido en comparación con la administración intramuscular, y también fue consistente con los perfiles de plasma versus tiempo. Los datos también muestran que la respuesta rápida se puede lograr con formulaciones de polvo

seco elaboradas con una variedad de excipientes tales como polioles, azúcares, aminoácidos y polímeros. Esto se debe a pesar del hecho de que las partículas de polvo seco contienen entre 10 y 30 % de leucina, que es un aminoácido poco soluble e hidrófobo, que podría esperarse que retrasara la disolución. Además, se espera que una proporción sustancial de la leucina esté presente en la superficie del polvo.

5 A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas especificados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

10 La referencia en esta memoria descriptiva a cualquier publicación anterior (o información derivada de ella), o a cualquier asunto que se conozca, no es, y no debe tomarse como un reconocimiento o admisión o cualquier forma de sugerencia de que dicha publicación previa (o información derivada de ella) o materia conocida forma parte del conocimiento general común en el campo del esfuerzo al que se refiere esta memoria descriptiva.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Un polvo seco inhalable para uso en el tratamiento o la prevención de una hemorragia postparto, en el que el polvo seco comprende:
- 5 partículas secas por pulverización que comprenden:  
oxitocina o carbetocina,  
una matriz de vidrio amorfo que comprende uno o más mono-, di- o polisacáridos y/o aminoácidos, y  
L-leucina.
- 10 2. Un polvo seco inhalable para su uso según la reivindicación 1, en el que el polvo seco inhalable está destinado a una administración nasal.
3. Un polvo seco inhalable para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho polvo seco inhalable está destinado a una inhalación en el sistema pulmonar a través de la boca.
- 15 4. Un polvo seco inhalable para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos una porción de la L-leucina está situada en la superficie de las partículas del polvo seco.
5. Un polvo seco inhalable para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que más del 40 % de las partículas del polvo seco tras la inhalación tienen un diámetro aerodinámico inferior a 5 µm.
- 20 6. Un polvo seco inhalable para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polvo seco inhalable se prepara por un procedimiento que comprende:
- 25 preparar una solución/suspensión acuosa que comprende oxitocina o carbetocina, uno o más mono-, di- o polisacáridos y/o aminoácidos capaces de formar una matriz de vidrio amorfo, y L-leucina; y  
secar por pulverización la solución/suspensión acuosa para producir el polvo seco inhalable.
7. Un polvo seco inhalable para su uso según la reivindicación 6, en el que la L-leucina está presente en una cantidad de 5 a 50 % en peso, basado en el peso seco del polvo.
- 30 8. Un polvo seco inhalable para su uso según la reivindicación 7, en el que la L-leucina está presente en una cantidad de 10 a 40 % en peso.
- 35 9. Un polvo seco inhalable para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que uno o más mono-, di- o polisacáridos y/o aminoácidos capaces de formar una matriz de vidrio amorfo comprenden D-manitol y glicina.
- 40 10. Un polvo seco inhalable para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el secado por pulverización se lleva a cabo a una temperatura por debajo de 80 °C.
11. Un polvo seco inhalable para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la matriz de vidrio amorfo comprende trehalosa.
- 45 12. Un polvo seco inhalable para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el inicio de la acción después de la inhalación del polvo seco, medido por una contracción uterina, se logra dentro de los 200 segundos de la inhalación.
- 50 13. Un polvo seco inhalable para su uso según la reivindicación 12, en el que el inicio de la acción se logra dentro de los 150 segundos de la inhalación.
14. Un polvo seco inhalable para su uso según la reivindicación 12, en el que el inicio de la acción se logra dentro de los 100 segundos de la inhalación.
- 55 15. Un polvo seco inhalable para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicho polvo seco inhalable incluye además uno o más componentes farmacéuticamente aceptables y pulmonarmente aceptables, preferentemente un vehículo pulmonarmente aceptable que incluye un estabilizador para el componente de oxitocina.

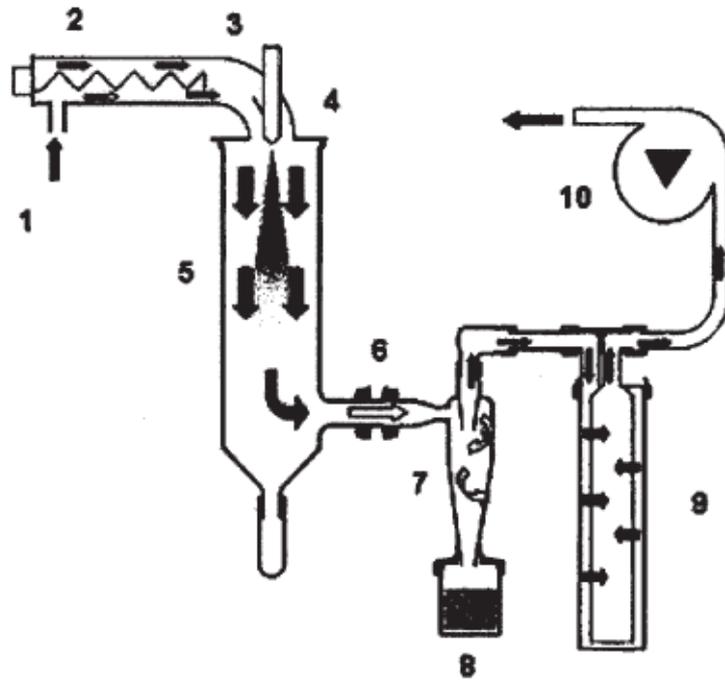
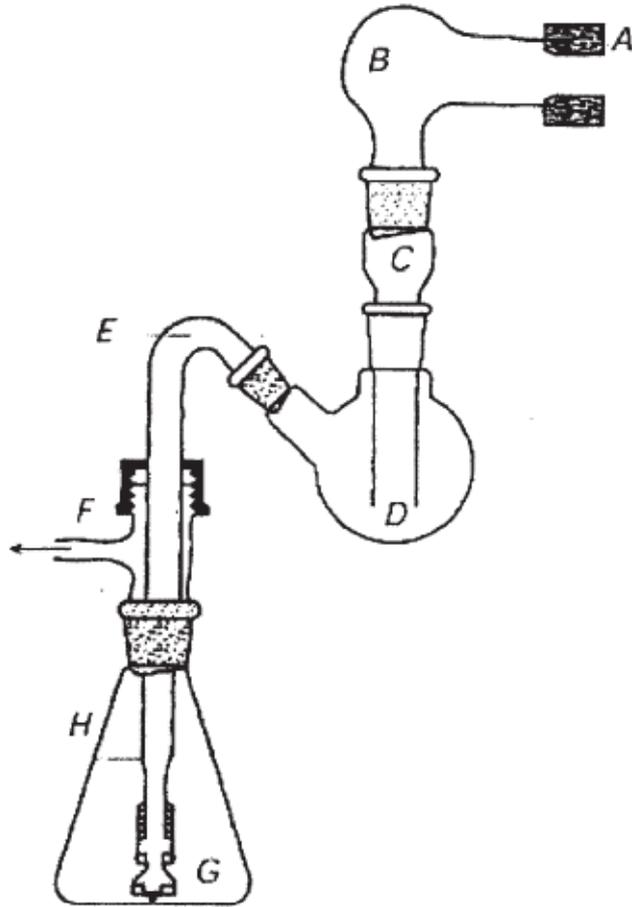
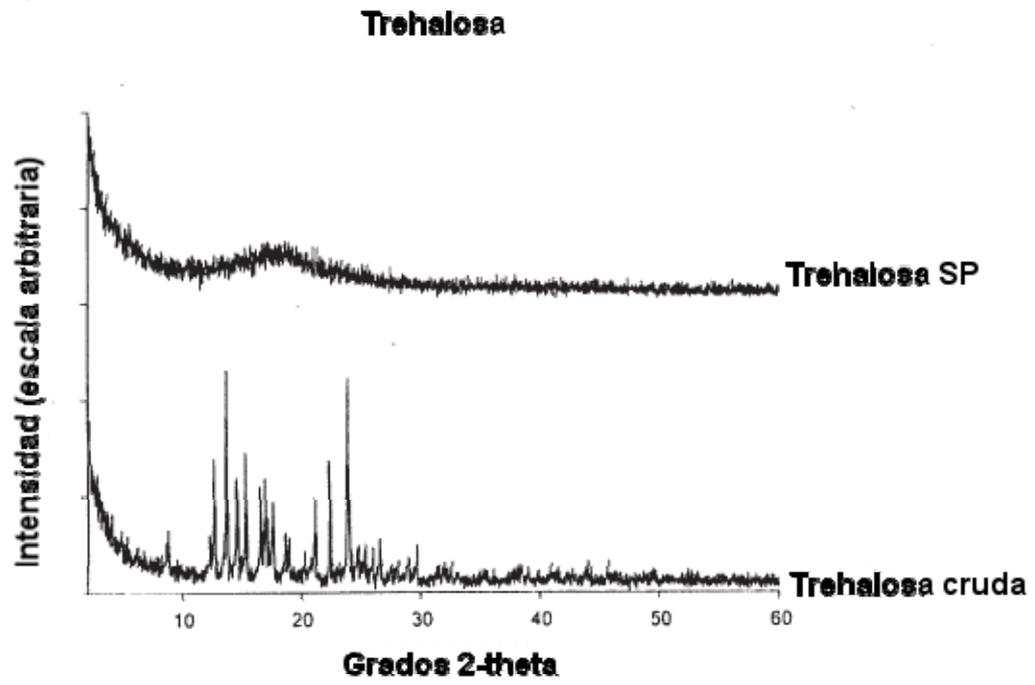


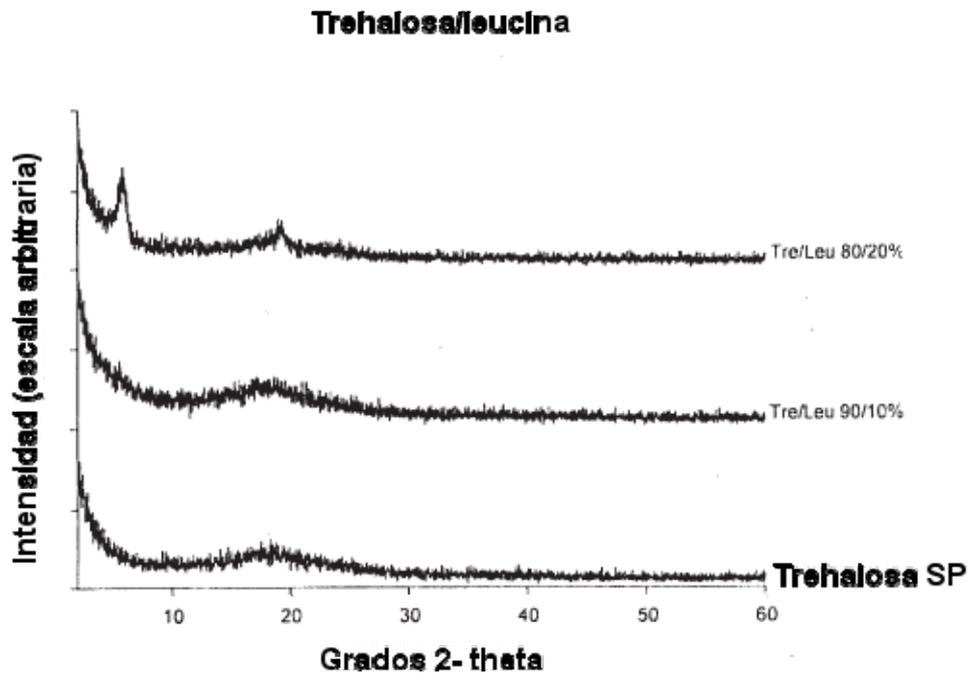
Figura 1



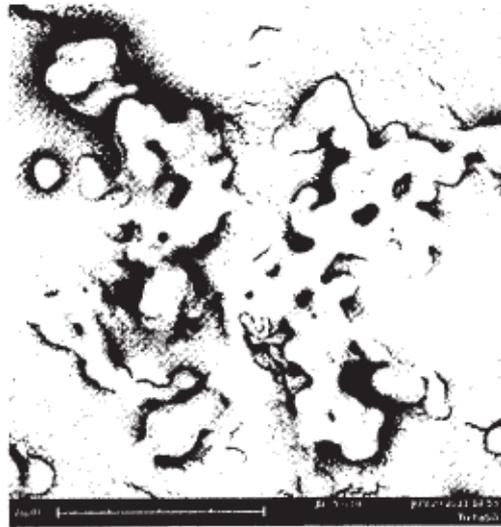
**Figura 2**



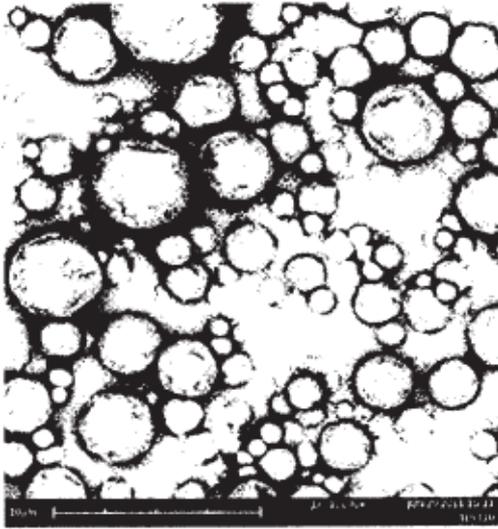
**Figura 3**



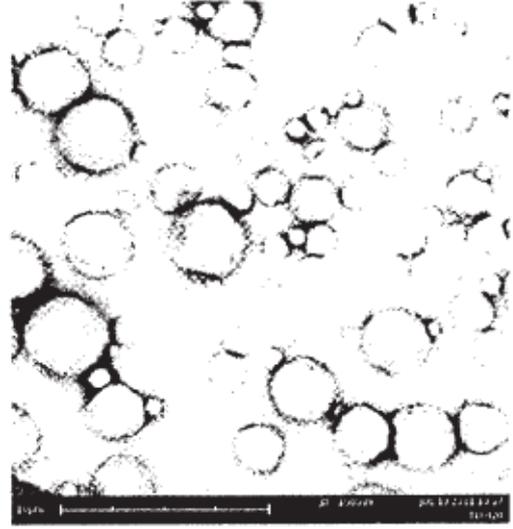
**Figura 4**



**Figure 6**

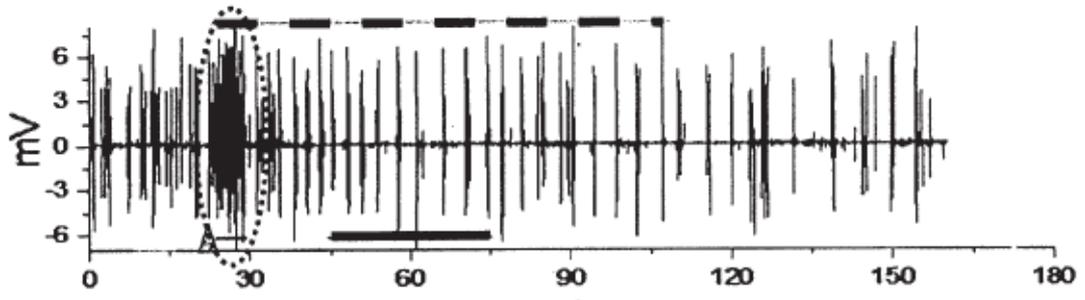


(a)



(b)

**Figura 6**



**Figura 7**

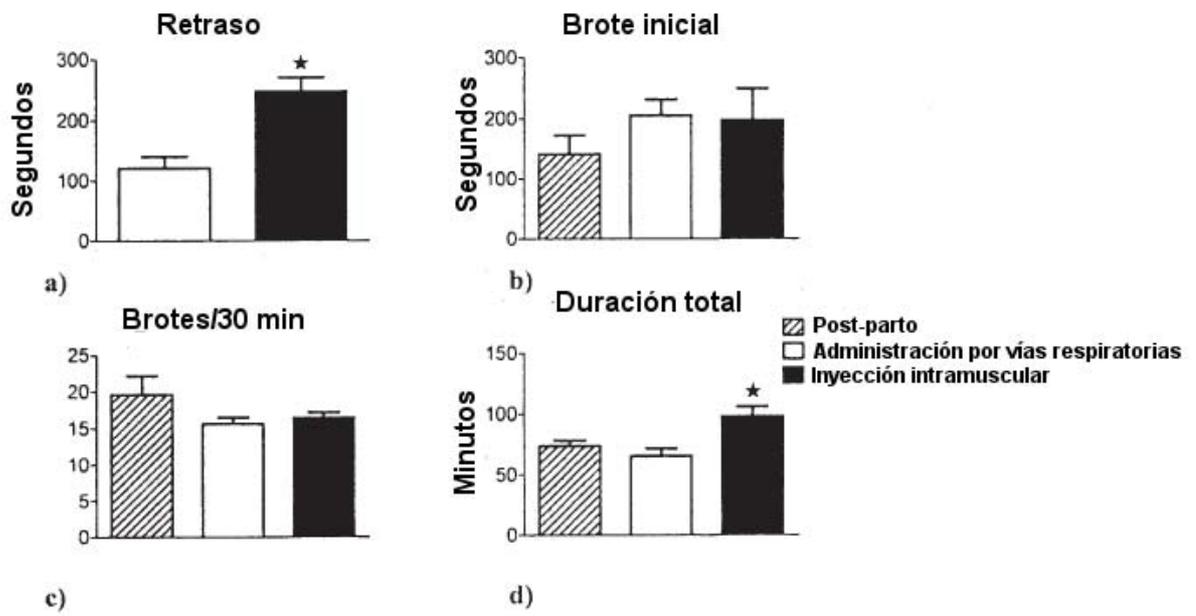
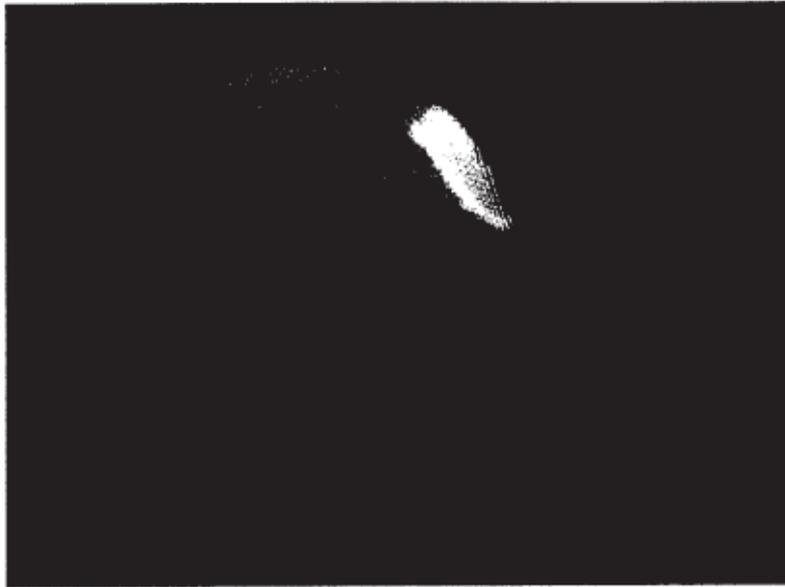
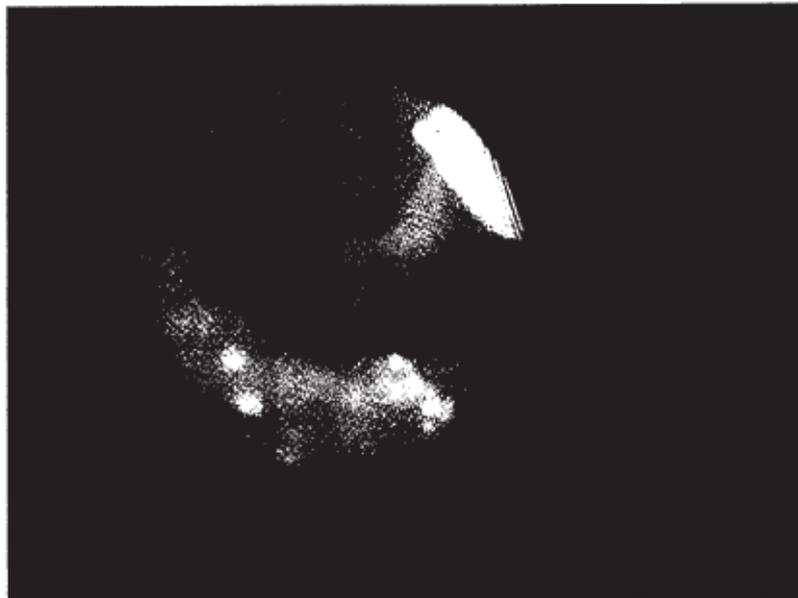


Figura 8



(a)



(b)

**Figura 9**

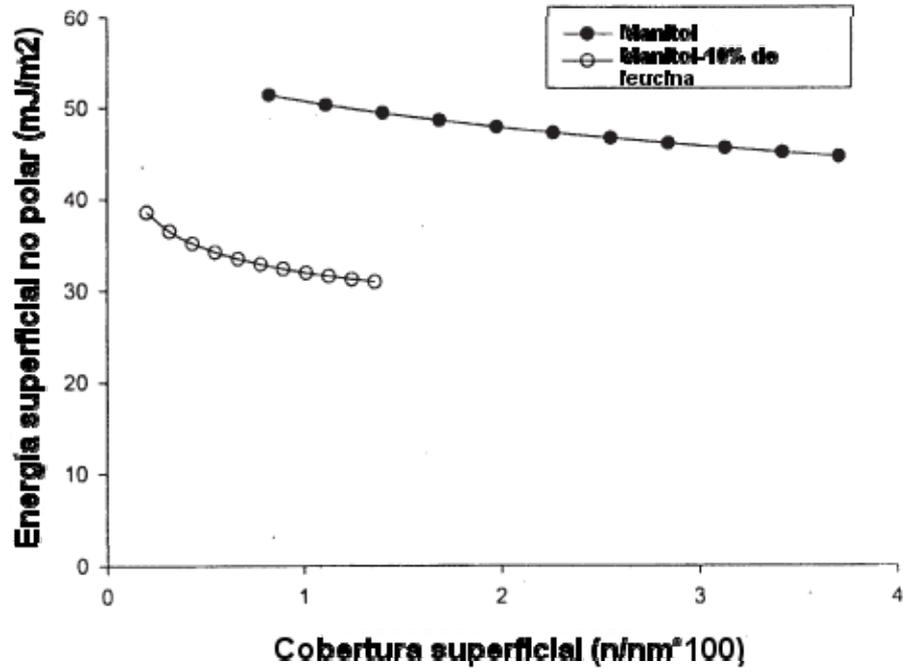


Figura 10

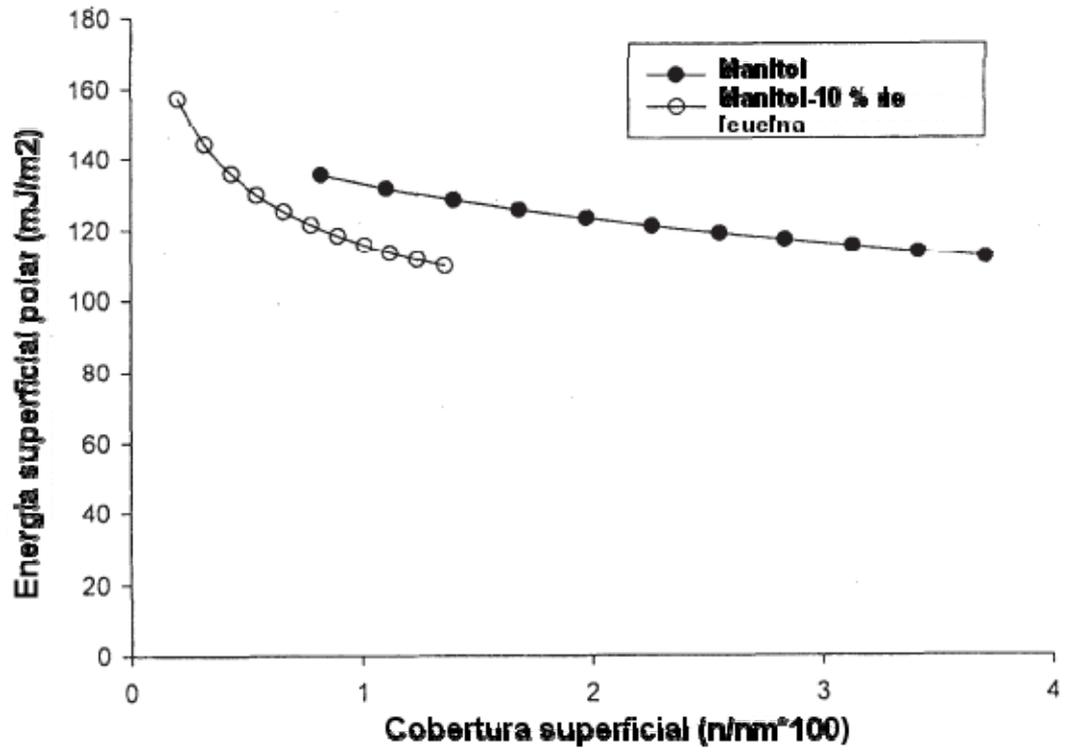


Figura 11

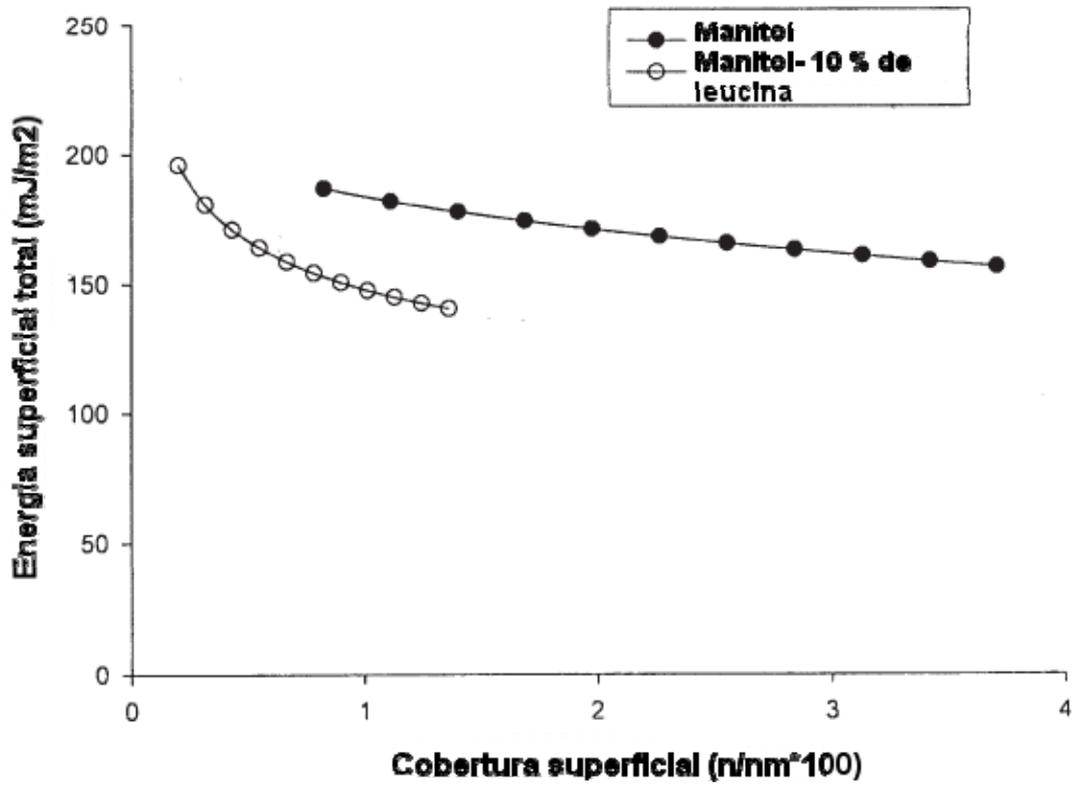


Figura 12

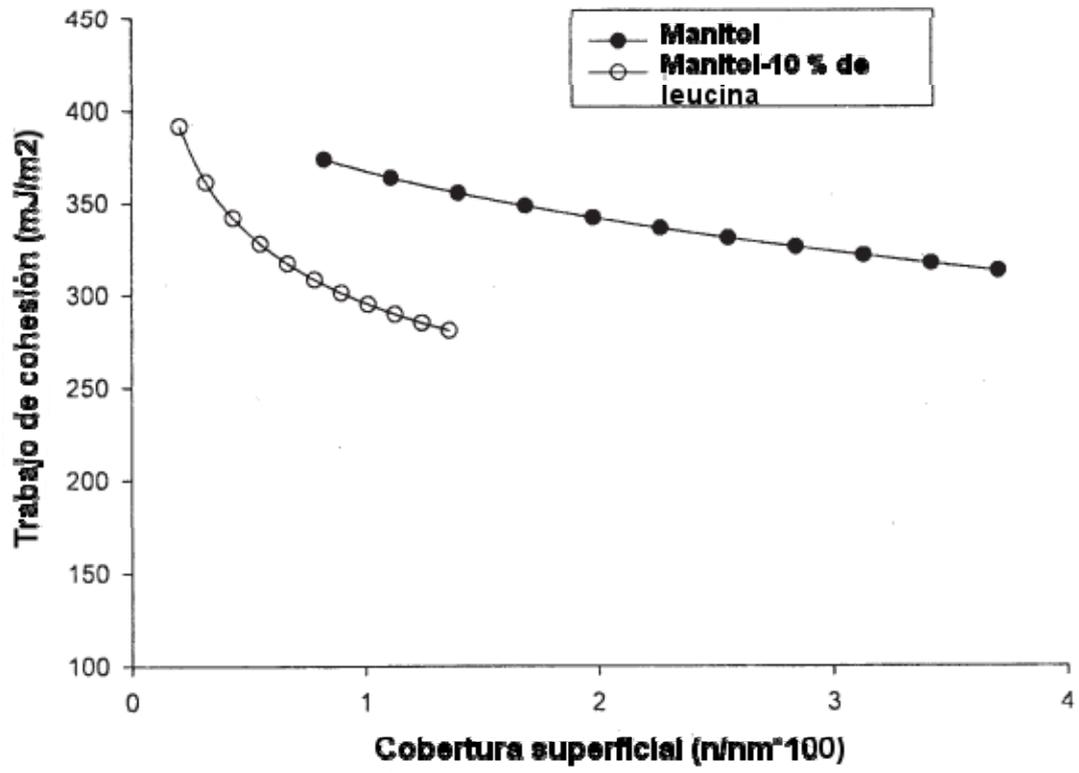
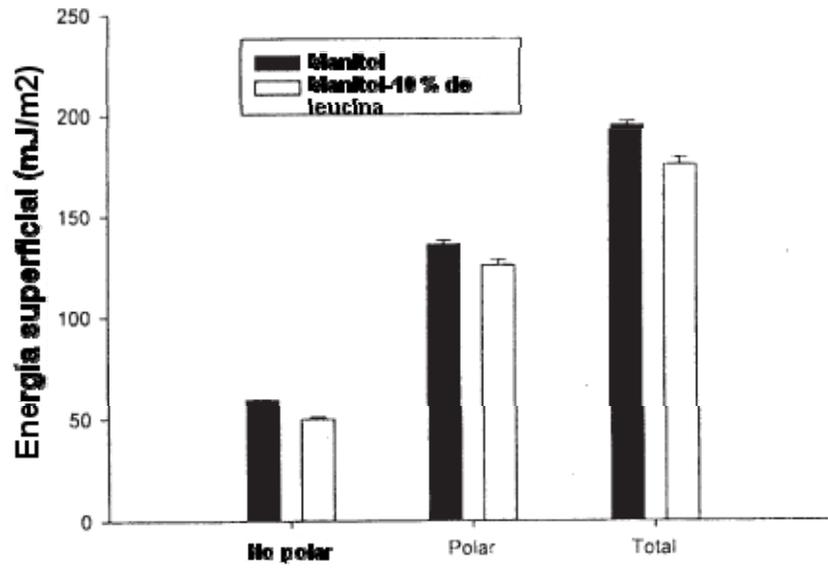
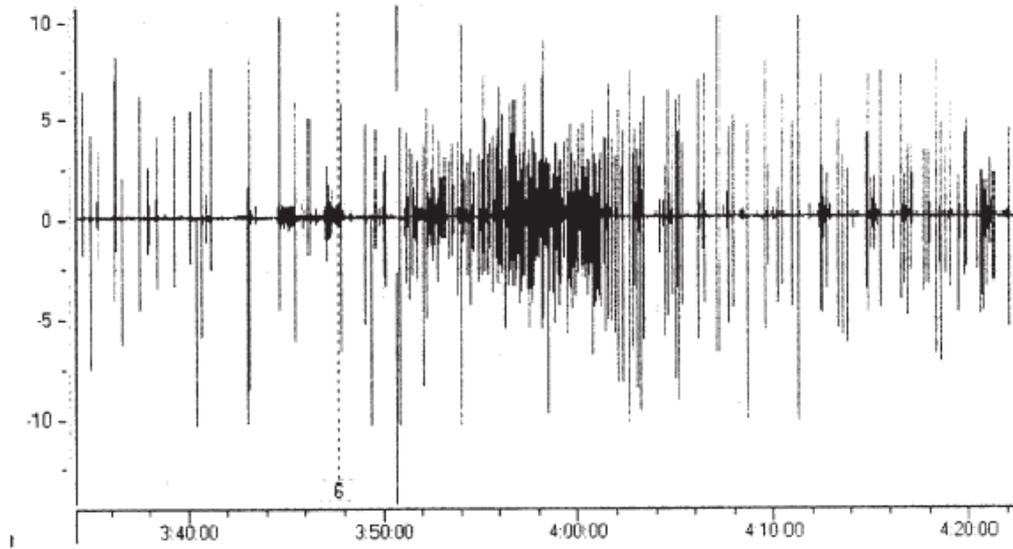


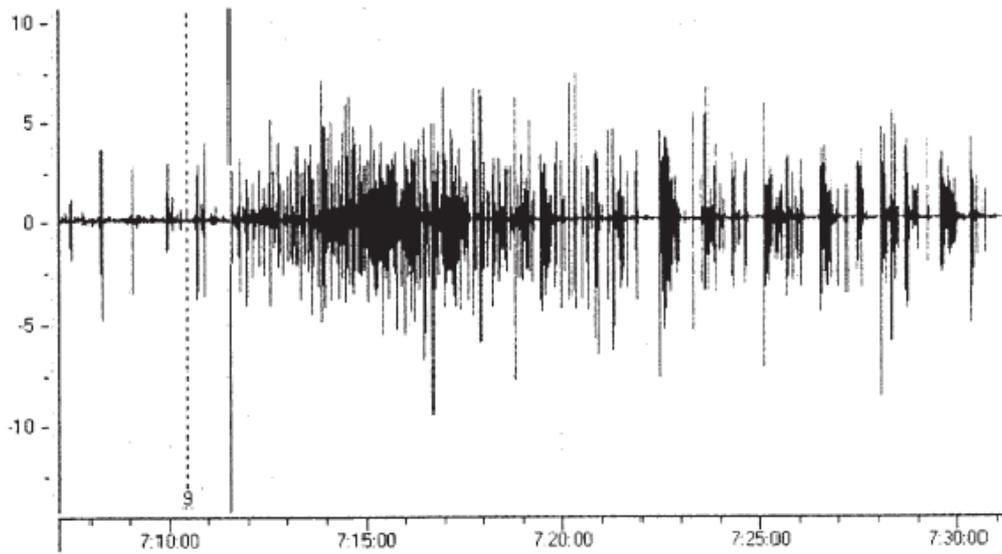
Figura 13



**Figura 14**

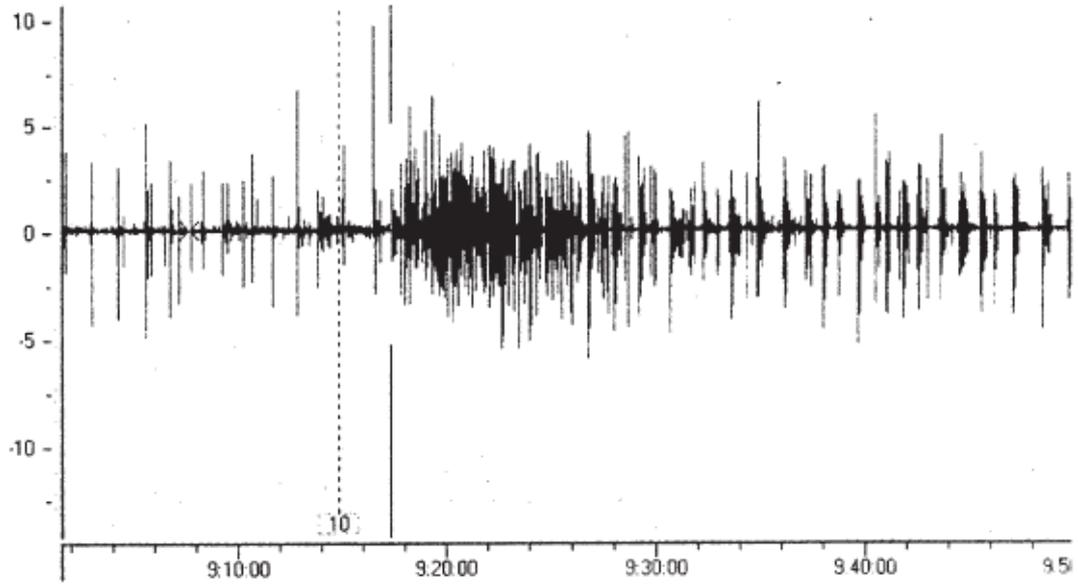


a)

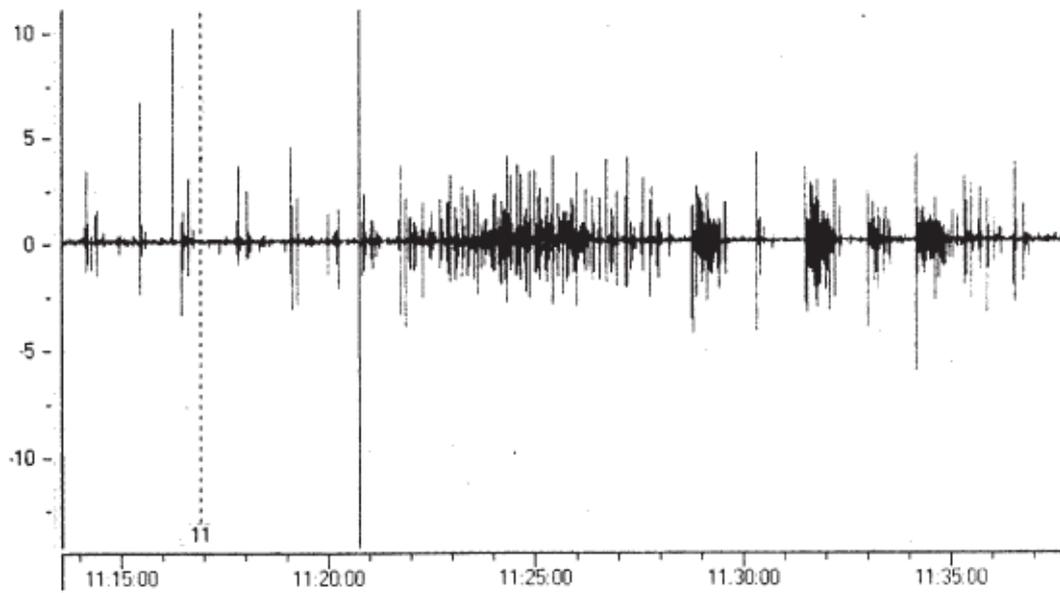


b)

**Figura 15**



a)



b)

**Figura 16**