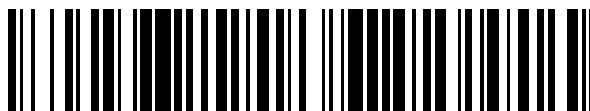


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 785**

51 Int. Cl.:

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 31/5575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2008 E 13188882 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2711024**

54 Título: **Soluciones tampón con actividad bactericida selectiva contra las bacterias gramnegativas y métodos para usarlas**

30 Prioridad:

07.09.2007 US 970716 P

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

28.10.2019

73 Titular/es:

**UNITED THERAPEUTICS CORPORATION
(100.0%)
1040 Spring Street Silver Spring
Maryland 20910, US**

72 Inventor/es:

**JEFFS, ROGER y
ZACCARDELLI, DAVID**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 728 785 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

Soluciones tampón con actividad bactericida selectiva contra las bacterias gramnegativas y métodos para usarlas

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere generalmente al campo de las soluciones tampón con actividad bacteriostática y/o bactericida. Más específicamente, la presente invención se refiere a soluciones tampón con actividad bactericida, preferentemente contra las bacterias gramnegativas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El uso de tampones para mantener un pH y solubilizar o diluir agentes farmacéuticos activos diluidos ("API", por sus siglas en inglés) antes de su administración (por ejemplo, mediante inyección) es rutinario. Muchos tampones, sin embargo, contienen componentes que mantienen un pH neutro y fomentan el crecimiento microbiano, lo que puede provocar sepsis y otras complicaciones indeseables relacionadas con las infecciones.

15

[0003] Las bacterias gramnegativas son un tipo de microorganismo particularmente problemático, ya que son comunes en los ambientes hospitalarios y difíciles de erradicar y/o controlar. Las infecciones con este tipo de bacterias tienden a tener mayores índices de morbilidad/mortalidad cuando un paciente se torna séptico, en parte porque las bacterias gramnegativas son organismos especialmente difíciles de tratar. Asimismo, las bacterias gramnegativas se asocian con la contaminación del agua, que se puede producir en los catéteres permanentes crónicos tales como los que se usan para la administración intravenosa. Por lo tanto, existe una necesidad de sistemas tampón con actividad microbicida con especificidad para las bacterias gramnegativas.

20

25

[0004] La patente EP 0347243 divulga análogos de prostaglandina para usar en la profilaxis o el tratamiento de la hipertensión pulmonar.

30

RESUMEN DE LA INVENCION

[0005] La invención se refiere al uso de un tampón que comprende glicina y tiene un pH superior a 10 y una capacidad amortiguadora de 0,01 o menos para matar bacterias gramnegativas e inhibir el crecimiento de las bacterias grampositivas en una solución que comprende treprostinil y/o treprostinil sódico. Además de las bacterias, el tampón puede inhibir también el crecimiento de hongos, moho, o ambos. Preferiblemente, el tampón tiene un pH de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 12, más preferiblemente un pH de entre aproximadamente 10,2 y aproximadamente 10,8. En otras formas de realización, el tampón tiene un pH de aproximadamente entre 3 y 4,5, más preferiblemente un pH de aproximadamente entre 3,5 y 4,5.

35

[0006] El tampón comprende glicina; y, en una forma de realización específica, el tampón es un diluyente estéril para el FLOLAN®, es decir, un tampón que comprende glicina e hidróxido sódico, añadido para ajustar el pH de 10,2 a 10,8. El agente activo es treprostinil y/o treprostinil sódico. El agente activo puede ser treprostinil sódico (en la presente denominado en ocasiones treprostinil), preferiblemente suministrado en una concentración de entre aproximadamente 0,004 mg/mL a aproximadamente 0,13 mg/mL de treprostinil sódico.

45

[0007] El tampón puede comprender ácido sórbico o ácido cítrico o cualquier otro ácido débil farmacéuticamente aceptable para uso parenteral. El pH se puede ajustar con ácido clorhídrico o hidróxido sódico para lograr un pH final de entre 3 y 4,5. El agente activo puede ser cualquier agente farmacéutico activo que requiera una solución o dilución con un tampón y se pueda inyectar (por ejemplo, por vía intravenosa).

50

[0008] En la presente se describe un método para reducir la incidencia de infecciones en el flujo sanguíneo en un mamífero tratado con un agente activo, donde el método comprende la administración del agente activo al mamífero con un tampón con un pH superior a aproximadamente 10 o inferior a aproximadamente 4,5 y una capacidad amortiguadora baja, donde el agente activo no es epoprostenol sódico, y donde su administración reduce las bacterias gramnegativas e inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas. En algunos casos, el sujeto humano puede sufrir hipertensión arterial pulmonar.

55

[0009] Preferiblemente, el tampón tiene un pH de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 12, más preferiblemente un pH de entre aproximadamente 10,2 y aproximadamente 10,8 y una capacidad amortiguadora baja. De forma alternativa, el tampón tiene un pH de preferiblemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4,5, más preferiblemente un pH de entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5 y una capacidad amortiguadora baja. El tampón puede comprender glicina; y, en una forma de realización específica, el tampón es un diluyente estéril para FLOLAN®. El agente activo puede ser cualquier agente farmacéutico activo que requiera una solución o dilución con un tampón y se pueda inyectar (por ejemplo, por vía intravenosa). El agente activo, puede ser treprostinil sódico preferiblemente suministrado en una concentración de entre aproximadamente 0,004 mg/mL y aproximadamente 0,13 mg/mL de treprostinil. La elección del tampón

60

65

dependerá del pH deseado. Mientras que los componentes del tampón deberían tener un pKa cercano al pH deseado, la capacidad amortiguadora debería ser baja para evitar cambios en el pH en la sangre tras la infusión. Una capacidad amortiguadora preferida para tales tampones es de 0,01 y menos.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0010]

La figura 1 es un cromatograma de una inyección "en blanco" de BWFI (A) y treprostínil diluido con BWFI (B).

La figura 2 es un cromatograma de una inyección "en blanco" de BNS (A) y treprostínil diluido con BNS (B).

10 La figura 3 es un cromatograma de diluyente estéril para FLOLAN® (A) y treprostínil diluido con el mismo (B).

La figura 4 es un cromatograma de 0,004 mg/mL de treprostínil en el diluyente estéril para FLOLAN® en T₀ (A) y T_{inicial} (B).

La figura 5 es un cromatograma de 0,13 mg/mL de treprostínil en el diluyente estéril para FLOLAN® en T₀ (A) y T_{inicial} (B).

15 La figura 6 es un gráfico que muestra la actividad antimicrobiana (UFC) a lo largo del tiempo (días) de varios sistemas tampón contra la bacteria grampositiva *Staphylococcus aureus* en una preparación farmacéutica con 0,004 mg/mL. Los valores para $\leq \text{Log } 1$ (treprostínil en diluyente estéril) o $\geq \text{Log } 6,48$ (treprostínil en WFI, NS) se registran como Log 1 y Log 6,48, respectivamente. La leyenda para las figuras 6 a 15 es como sigue:

- | | | |
|----|------------------------|---|
| 20 | (puntos abiertos): | FLOLAN® en el diluyente estéril para FLOLAN® |
| | (puntos cerrados): | Treprostínil en el diluyente estéril para FLOLAN® |
| | (cuadrados abiertos): | Treprostínil en agua esterilizada para inyección |
| | (cuadrados cerrados): | Treprostínil en agua bacteriostática para inyección |
| | (rombos abiertos): | Treprostínil en solución salina normal (0,9 %) |
| 25 | (rombos cerrados): | Treprostínil en solución salina normal bacteriostática |
| | (triángulos abiertos): | Treprostínil en 5 % de dextrosa en agua para inyección (D5W). |

La figura 7 es un gráfico que muestra la actividad antimicrobiana (UFC) a lo largo del tiempo (días) de varios sistemas tampón contra la bacteria gramnegativa *Escherichia coli*, en una preparación farmacéutica que comprende 0,004 mg/mL de treprostínil. Los valores para $\leq \text{Log } 1$ (treprostínil en el diluyente estéril) se registran como Log 1.

30 La figura 8 es un gráfico que muestra la actividad antimicrobiana (UFC) a lo largo del tiempo (días) de varios sistemas tampón contra la bacteria gramnegativa *Pseudomonas aeruginosa*, en una preparación farmacéutica que comprende 0,004 mg/mL de treprostínil. Los valores $\leq \text{Log } 1$ (treprostínil en el diluyente estéril) o $\geq 6,48$ (treprostínil en D5W) se registran como Log 1 y Log 6,48, respectivamente

35 La figura 9 es un gráfico que muestra la actividad antimicrobiana (UFC) a lo largo del tiempo (días) de varios sistemas tampón contra el hongo *Candida albicans* en una preparación farmacéutica que comprende 0,004 mg/mL de treprostínil.

La figura 10 es un gráfico que muestra la actividad antimicrobiana (UFC) a lo largo del tiempo (días) de varios sistemas tampón contra el moho *Aspergillus niger* en una preparación farmacéutica que comprende 0,004 mg/mL de treprostínil.

40 La figura 11 es un gráfico que muestra la actividad antimicrobiana (UFC) a lo largo del tiempo (días) de varios sistemas tampón contra la bacteria Grampositiva *Staphylococcus aureus*, en una preparación farmacéutica que comprende 0,13 mg/mL de treprostínil. Los valores para $\leq \text{Log } 1$ (treprostínil en el diluyente estéril) o $\geq \text{Log } 6,48$ (treprostínil en WFI, NS, D5W) se registran como Log 1 y Log 6,48, respectivamente.

45 La figura 12 es un gráfico que muestra la actividad antimicrobiana (UFC) a lo largo del tiempo (días) de varios sistemas tampón contra la bacteria gramnegativa *Escherichia coli*, en una preparación farmacéutica que comprende 0,13 mg/mL de treprostínil. Los valores para $\leq \text{Log } 1$ (treprostínil en el diluyente estéril) o $\geq \text{Log } 6,48$ (treprostínil en NS) se registran como Log 1 y Log 6,48, respectivamente.

50 La figura 13 es un gráfico que muestra la actividad antimicrobiana (UFC) a lo largo del tiempo (días) de varios sistemas tampón contra la bacteria gramnegativa *Pseudomonas aeruginosa*, en una preparación farmacéutica que comprende 0,13 mg/mL de treprostínil. Los valores para $\leq \text{Log } 1$ (treprostínil en el diluyente estéril) se registran como Log 1.

55 La figura 14 es un gráfico que muestra la actividad antimicrobiana (UFC) a lo largo del tiempo (días) de varios sistemas tampón contra el hongo *Candida albicans*, en una preparación farmacéutica que comprende 0,13 mg/mL de treprostínil. El valor $\geq \text{Log } 3,48$ en un tiempo de 0,25 horas para treprostínil en NS se registra como Log 3,48.

60 La figura 15 es un gráfico que muestra la actividad antimicrobiana (UFC) a lo largo del tiempo (días) de varios sistemas tampón contra el moho *Aspergillus niger* en una preparación farmacéutica que comprende 0,13 mg/mL de treprostínil.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS

[0011] La presente invención se refiere al uso de sistemas tampón para mantener un rango de pH específico como agentes microbicidas en productos farmacéuticos. El término "tampón" tal y como se utiliza en la presente se refiere en cualquier solución con un pH controlado que puede servir para disolver un medicamento sólido (por

ejemplo liofilizado) o como un diluyente para diluir un medicamento líquido. Según la invención, los tampones descritos en la presente mantienen un pH que muestra una actividad bacteriostática hacia la mayoría, si no todos, de microorganismos, entre los que se incluyen las bacterias, los mohos y los hongos, y además muestran actividad bactericida hacia las bacterias gramnegativas. Algunos ejemplos de bacterias gramnegativas incluyen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bdellovibrio*, *Legionella*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*. Las bacterias gramnegativas son una fuente común de infección en los ambientes hospitalarios y, por lo tanto, los tampones que mantienen un pH por encima de 10 o por debajo de aproximadamente 4,5 con una capacidad amortiguadora baja tienen actividad bactericida específica para las bacterias gramnegativas y son deseables. A modo de ejemplo, las bacterias grampositivas incluyen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Clostridium*.

[0012] "Bacteriostático" se define como la capacidad para retardar o evitar la expansión de un microorganismo que puede estar presente, o volverse presente, en la solución tampón. En otras palabras, la actividad "bacteriostática" no incluye la actividad bactericida, que se define aquí como la actividad que mata un microbio que puede estar presente, o volverse presente, en el tampón. Los microbios se definen en términos generales aquí e incluyen organismos unicelulares, tales como, por ejemplo, las bacterias, los mohos y los hongos.

[0013] Los presentes inventores han descubierto que los tampones con un pH alto (> 10) o un pH bajo (< 4,5) tienen actividad bactericida específica contra las bacterias gramnegativas y actividad bacteriostática hacia las bacterias grampositivas y otros microorganismos. Sin que ello esté sujeto o limitado por la teoría, actualmente se cree que las diferencias en la bioquímica, quizás en la bioquímica de la pared celular, entre las bacterias gramnegativas y grampositivas pueden deberse a su sensibilidad diferencial hacia los tampones de pH alto. En el contexto de la presente invención, un pH "alto" es un valor de pH de aproximadamente 9 a aproximadamente 12, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 12. En una forma de realización preferida de la invención, los tampones tienen un pH de aproximadamente 10,2 a aproximadamente 10,8 o de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,5.

[0014] Además del pH alto, los presentes inventores han aprendido que los tampones que comprenden glicina son particularmente ventajosos. En tales formas de realización, la glicina está presente en una concentración (p/p) de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 80 %, preferiblemente de aproximadamente el 45 % a aproximadamente el 65 % y, más preferiblemente, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 60 %. El término "aproximadamente" se utiliza en la presente como reconocimiento de las inexactitudes inherentes a los cálculos y mediciones de la técnica y para incluir variaciones nominales y aceptadas con respecto a "aproximadamente" el número citado.

[0015] Además de glicina, los tampones tal y como se describen en la presente pueden comprender cualquier otro sistema tampón, que incluye aquellos conocidos en la técnica, que pueda mantener un pH en el rango aquí mencionado.

[0016] En una forma de realización específica de la presente invención, el diluyente para FLOLAN® (epoprostenol sódico) emplea glicina como componente tampón. Tal y como se describe con mayor detalle más adelante, se descubrió de forma inesperada que el diluyente para FLOLAN® tiene actividad microbicida específica hacia las bacterias gramnegativas y actividad bacteriostática hacia el resto de microbios. El diluyente para FLOLAN® comprende 50 mL de 94 mg de glicina, 73,3 mg de cloruro sódico, e hidróxido sódico, añadido para ajustar el pH hasta de 10,2 a 10,8. (Aproximadamente un 44 % de NaCl en glicina).

[0017] La presente invención no debería limitarse a un rango limitado de concentraciones. Además, las propiedades microbicidas nuevas e inesperadas de los tampones pueden ser especialmente adecuadas para medicamentos que se administran mediante inyección. De hecho, se anticipa que el uso de los tampones con pH alto tal y como se describe en la presente puede reducir la incidencia de infecciones en el flujo sanguíneo en un mamífero tratado con un agente activo. Debe observarse, sin embargo, que la presente invención no está limitada a los medicamentos que se prescriben para inyección (incluyendo la inyección intravenosa), sino a cualquier medicamento que requiera solución y/o dilución (por ejemplo, para la administración oral).

[0018] En una forma de realización específica de la presente invención, los sistemas tampón descritos se usan con treprostinil sódico. Más específicamente, como se describirá a continuación mediante ejemplos, el diluyente para FLOLAN® se utiliza para amortiguar el treprostinil sódico.

EJEMPLOS

[0019] Se llevó a cabo un estudio de compatibilidad de treprostinil con un dispositivo de administración CADD de 100 mL. Más específicamente, se determinó la compatibilidad y la estabilidad del treprostinil diluido con agua bacteriostática para inyección ("BWF1", por sus siglas en inglés) o solución salina normal bacteriostática ("BNS", por sus siglas en inglés), ambos conservados con parabenos. Las soluciones de muestra se prepararon en 0,004 mg/mL y 0,13 mg/mL de treprostinil, que incluye todo el rango de concentraciones en el que se puede

prescribir el treprostínil, y se colocaron en un dispositivo de administración de bomba SIMS Deltec, Inc. CADD-Legacy™ 1 (modelo 6400) que se bombeó continuamente durante un periodo de 52 horas mientras estaba almacenado a 40 °C y con humedad relativa ambiental ("HR").

5 [0020] En puntos temporales específicos (por ejemplo, T₀, inicial, 24 horas y 52 horas), se recogieron muestras del extremo distal del tubo después del bombeo y se caracterizaron según su aspecto, pH y concentración de treprostínil. Además, las soluciones se sometieron a pruebas de eficacia antimicrobiana ("AET", por sus siglas en inglés) durante un periodo de tiempo similar de aproximadamente 2 días. Se siguió un procedimiento experimental similar para las soluciones reconstituidas de Flolan. Sin embargo, las pruebas de esterilidad y AET se llevaron a cabo en FLOLAN® después de solo 8 horas a temperatura ambiente a causa de la estabilidad limitada del medicamento en solución.

15 [0021] La estabilidad del treprostínil se vigiló mediante un ensayo de cromatografía líquida de alta eficacia (en lo sucesivo HPLC, por sus siglas en inglés) plenamente validado indicador de estabilidad. Para averiguar si los parabenos, presentes en las soluciones "bacteriostáticas", causarían interferencias en la cromatografía con treprostínil, un experimento preliminar confirmó que los "picos" de parabeno no interferían con el "pico" de treprostínil o cualquier "pico" de impurezas. Las soluciones de BWFI y BNS, y de treprostínil diluido en BWFI y BNS se analizaron mediante una HPLC. Las figuras 1 y 2 muestran que los picos de parabeno de metilparabeno o etilparabeno no interferían (por ejemplo, superponiéndose) con el pico de treprostínil. Asimismo, no se produjo ninguna interferencia cromatográfica de treprostínil con diluyente estéril para FLOLAN® (figura 3).

25 [0022] También se llevó a cabo un estudio de linealidad de bajo nivel para cubrir el rango de concentración de treprostínil previsto en las soluciones diluidas. Se prepararon cinco soluciones de treprostínil en 0,002, 0,01, 0,05, 0,1 y 0,15 mg/mL (diluidas en 1,0 mg/mL de solución estándar) y cada solución se inyectó por duplicado. La intención era comprobar la linealidad entre la respuesta detectora y la concentración de treprostínil en el rango de concentración diluida para usar un estándar monopunto en 0,1 mg/mL durante el análisis. Se determinó que la respuesta detectora del treprostínil era lineal de 0,002 a 0,15 mg/mL. El coeficiente de correlación (r) para el experimento fue de 0,999995, de acuerdo con el requisito de al menos 0,999.

30 [0023] Las soluciones de 0,004 mg/mL de treprostínil en BWFI, BNS o diluyente estéril para FLOLAN® se prepararon a partir de 1,0 mg/mL de dosis de Remodulin. Las soluciones de 0,13 mg/mL de treprostínil en BWFI y en BNS se prepararon a partir de 10 mg/mL de dosis de Remodulin. Los frascos de FLOLAN® se reconstituyeron con 5 mL de diluyente estéril para FLOLAN® usando el procedimiento descrito en el prospecto.

35 [0024] Se eliminó una porción (aproximadamente 2 mL) de cada una de las cuatro soluciones para el análisis T₀. La solución restante se cargó en cada uno de los cuatro depósitos de casetes de medicación SIMS Deltec, Inc. 100-mL Medication Cassette™ Reservoirs diferentes. Los casetes y los tubos se unieron a la bomba CADD-Legacy™ 1 siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El cuatro conjuntos de casetes/bombas CADD se colocaron en una cámara a 40 °C/HR ambiental. Se colocó una aguja al final del tubo en un frasco de HPLC sellado (con abertura para la aguja). El flujo en la bomba se estableció en 40 mL/24 horas y comenzó. La solución de cada bomba se recogió en frascos de HPLC diferentes (durante aproximadamente una hora) para realizar una prueba en el intervalo "Inicial". A continuación, la aguja se transfirió a un contenedor de residuos sellado (con abertura para aguja). Después de 24 y 52 horas, se recogió la solución de nuevo en un nuevo frasco de HPLC sellado para la prueba.

45 [0025] Las soluciones recogidas en T₀, inicial, 24 horas y 52 horas se analizaron según su aspecto físico, pH, y se ensayaron por HPLC para el treprostínil. Las tablas 1 y 2 resumen los resultados del treprostínil diluido con BWFI y BNS, respectivamente. El aspecto de todas las soluciones fue claro e incoloro, desprovisto de material particulado visible. Por lo tanto, los resultados no muestran problemas de compatibilidad de la solución de treprostínil en BWFI o BNS en cualquier concentración.

Tabla 1. Resultados de las pruebas químicas del treprostínil en BWFI

Concentración (mg/ml)	Pruebas	Preparación	Intervalo de pruebas			
			T ₀	T _{inicial}	24 horas	52 horas
0,004	Ensayo con treprostínil (% SP)	1	104,1	99,5	100,8	99,6
		2	100,6	100,6	101,1	101,0
		Media	102,4	100,0	101,0	100,3
	pH	NA	6,7	6,8	6,8	6,8
0,13	Ensayo con treprostínil (% SP)	1	100,1	99,6	100,4	101,2
		2	100,0	99,8	100,5	100,9
		Media	100,0	99,7	100,5	101,0
	pH	NA	6,7	6,9	6,8	7,0

SP: según prospecto

Tabla 2. Resultados de las pruebas químicas con treprostínil en BNS

Concentración (mg/ml)	Pruebas	Preparación	Intervalo de pruebas			
			T ₀	T _{inicial}	24 horas	52 horas
0,004	Ensayo con treprostínil (% SP)	1	97,8	94,8	96,7	99,9
		2	102,9	94,0	97,9	102,3
		Media	100,4	94,4	97,3	101,1
	pH	NA	6,4	6,6	6,6	6,6
0,13	Ensayo con treprostínil (% SP)	1	100,1	96,3	99,8	100,3
		2	100,5	96,0	99,7	100,2
		Media	100,3	96,1	99,7	100,2
	pH	NA	6,3	6,7	6,7	6,5

SP: según prospecto

[0026] Se obtuvieron resultados similares con las soluciones de treprostínil en el diluyente estéril para FLOLAN®, que se resumen en la tabla 3. El aspecto de todas las soluciones fue claro, incoloro y desprovisto de material particulado visible. Del mismo modo, los resultados no muestran problemas de compatibilidad para las soluciones de treprostínil en el diluyente estéril para FLOLAN® para treprostínil con cualquier concentración (figuras 4 y 5). Por lo tanto, los resultados no muestran problemas de compatibilidad para las soluciones de treprostínil diluido en cualquiera de las soluciones de diluyente con cualquier concentración.

Tabla 3. Resultados de las pruebas químicas con treprostínil en el diluyente estéril para FLOLAN®

Concentración (mg/ml)	Pruebas	Preparación	Intervalo de pruebas			
			T ₀	T _{inicial}	24 horas	52 horas
0,004	Ensayo con treprostínil (% SP)	1	95,9	108,4	100,6	100,7
		2	96,1	108,9	101,4	101,2
		Media	96,0	108,7	101,0	101,0
	pH	NA	10,6	10,5	10,6	10,5
0,13	Ensayo con treprostínil (% SP)	1	100,3	102,9	101,4	102,3
		2	100,2	102,7	101,4	102,1
		Media	100,2	102,8	101,4	102,2
	pH	NA	10,5	10,4	10,5	10,5

SP: según prospecto

[0027] Para las soluciones de treprostínil, después de 52 horas en el casete a 40 °C/HR ambiental, las soluciones se retiraron y se llevó a cabo la AET de acuerdo con el suplemento NF USP 24 Supplement 2<51> con una inclusión de todos los organismos en placas durante 48. Para la solución de FLOLAN®, la prueba se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento, pero después de que la solución hubiera estado 8 horas en el casete a temperatura ambiente. También se realizaron pruebas en FLOLAN® para evaluar la esterilidad.

[0028] Los requisitos de USP para la AET para un producto de categoría 1, en la que se incluyen las soluciones parenterales, son las siguientes: para las bacterias, no debe producirse una reducción menor a 1,0 log con respecto al recuento calculado inicial pasados 7 días y no menor a una reducción de 3,0 log con respecto al recuento inicial pasados 14 días y ningún aumento con respecto al recuento de los 14 pasados 28 días. Para la levadura y el moho, no debería producirse aumento con respecto al recuento calculado inicial pasados 7, 14 y 28 días.

[0029] El FLOLAN® diluido en diluyente estéril para Flolan cumplió los requisitos USP para la AET, pero las soluciones de treprostínil en BWFI y BNS fallaron. Estas soluciones de treprostínil diluidas fallaron en la AET porque la tasa de reducción bacteriana no fue suficiente, principalmente en el caso de las bacterias gramnegativas. Sin embargo, el treprostínil en el diluyente estéril para FLOLAN® cumplió el criterio USP. Véase las figuras 6 a 15.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un tampón que comprende glicina y tiene un pH superior a 10 y una capacidad amortiguadora de 0,01 o menos, para matar las bacterias gramnegativas e inhibir el crecimiento de las bacterias grampositivas en una solución que comprende el tampón y treprostinil y/o treprostinil sódico.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde la solución se destina a su administración a un sujeto humano que sufre de hipertensión arterial pulmonar.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el tampón comprende además hidróxido sódico.
- 15 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el tampón tiene un pH de entre 10 y 12.
- 15 5. Uso según la reivindicación 4, donde el tampón tiene un pH de entre 10,2 y 10,8.
- 20 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la solución tiene una concentración de treprostinil y/o treprostinil sódico de entre 0,002 mg/mL y 0,15 mg/mL.
- 20 7. Uso según la reivindicación 6, donde la concentración es de entre 0,004 mg/mL y 0,13 mg/mL.
- 25 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la solución es para inyección.
- 25 9. Uso según la reivindicación 8, donde la inyección es una inyección intravenosa.
- 25 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde las bacterias gramnegativas incluyen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bdellovibrio*, *Legionella*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*.
- 30 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde las bacterias grampositivas incluyen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Clostridium*.
- 35 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde 50 mL del tampón comprenden 94 mg de glicina, 73,3 mg de cloruro sódico e hidróxido sódico, y tienen un pH de 10,2 a 10,8.
- 35 13. Uso o solución según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el tampón comprende glicina en una concentración (p/p) del 30 % al 80 %, preferiblemente en una concentración (p/p) del 45 % al 65 %, más preferiblemente en una concentración (p/p) del 50 % al 60 %.

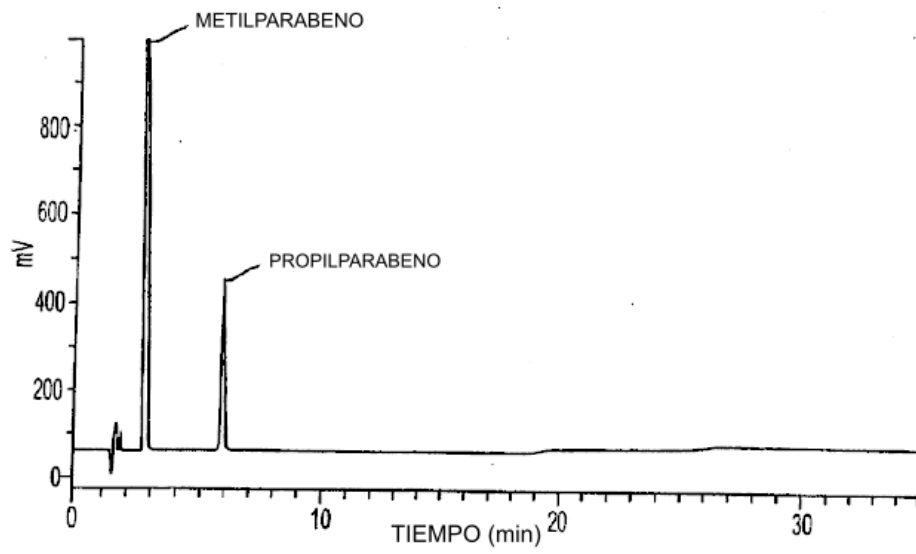


FIG. 1A

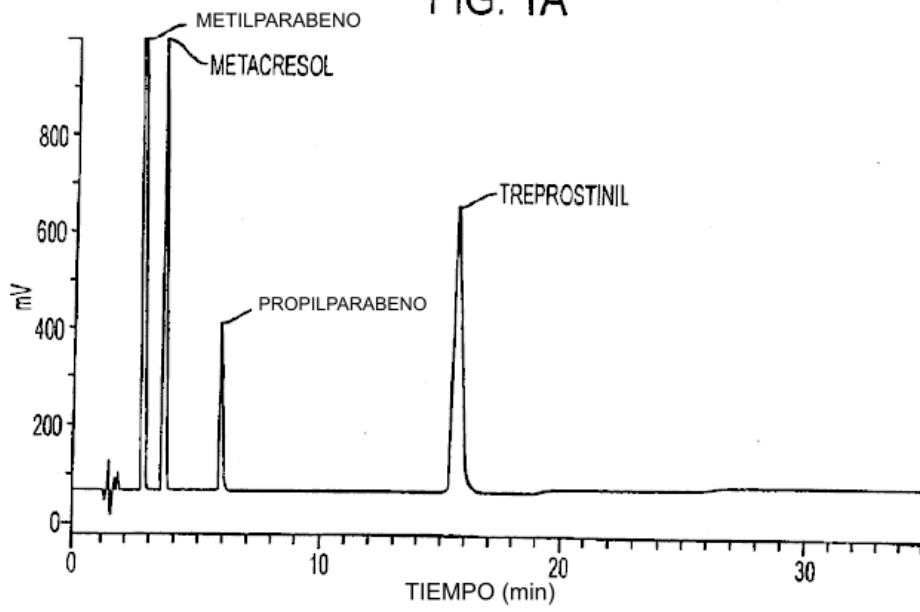


FIG. 1B

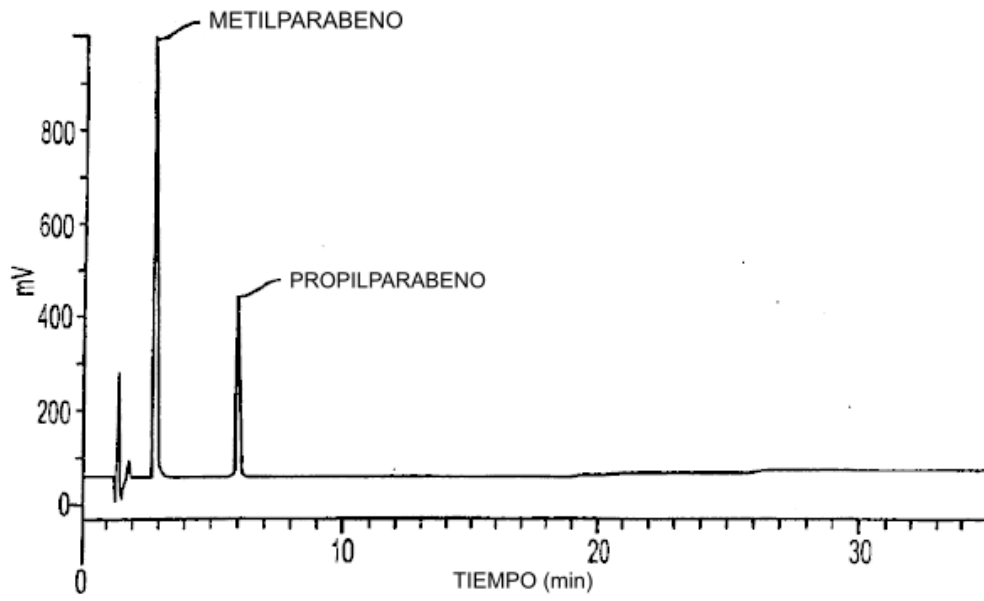


FIG. 2A

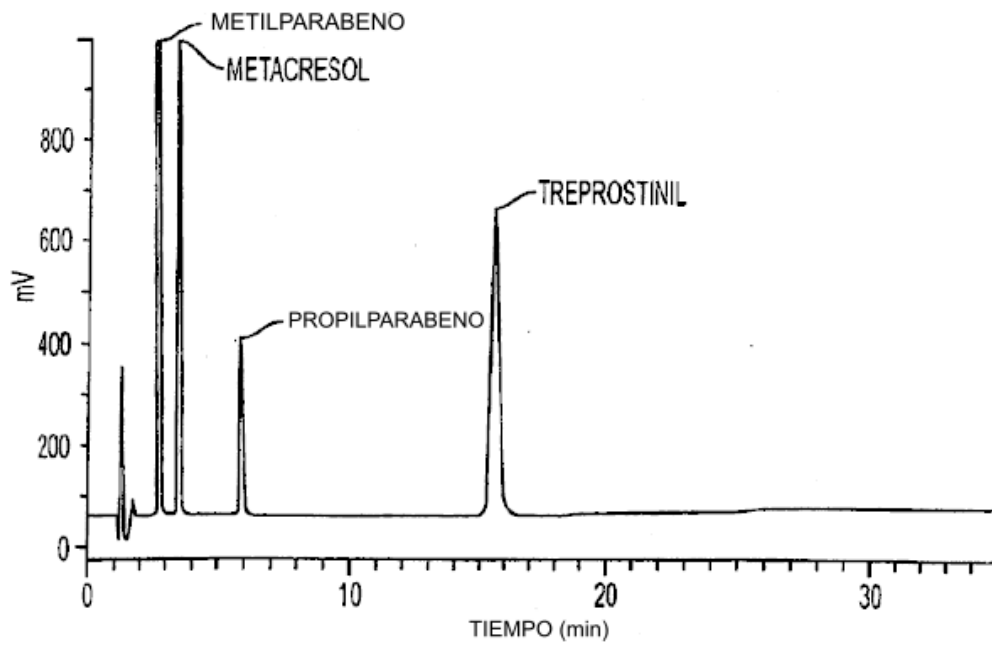


FIG. 2B

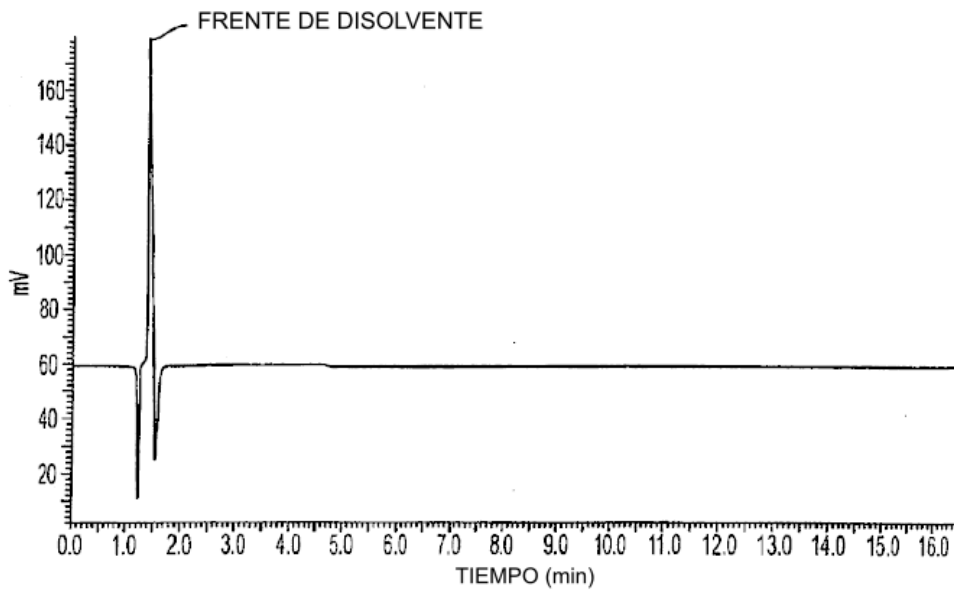


FIG. 3A

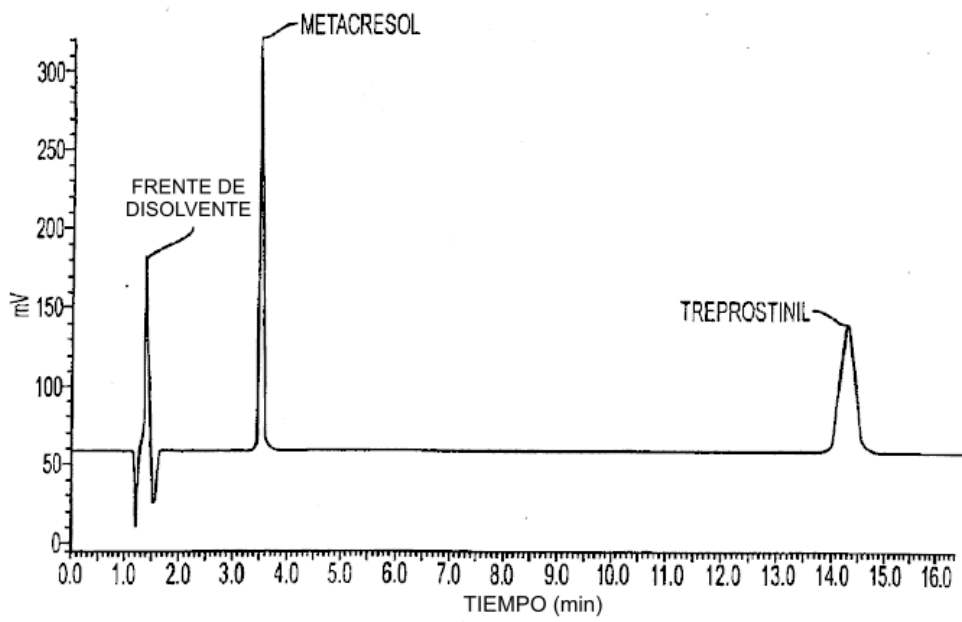


FIG. 3B

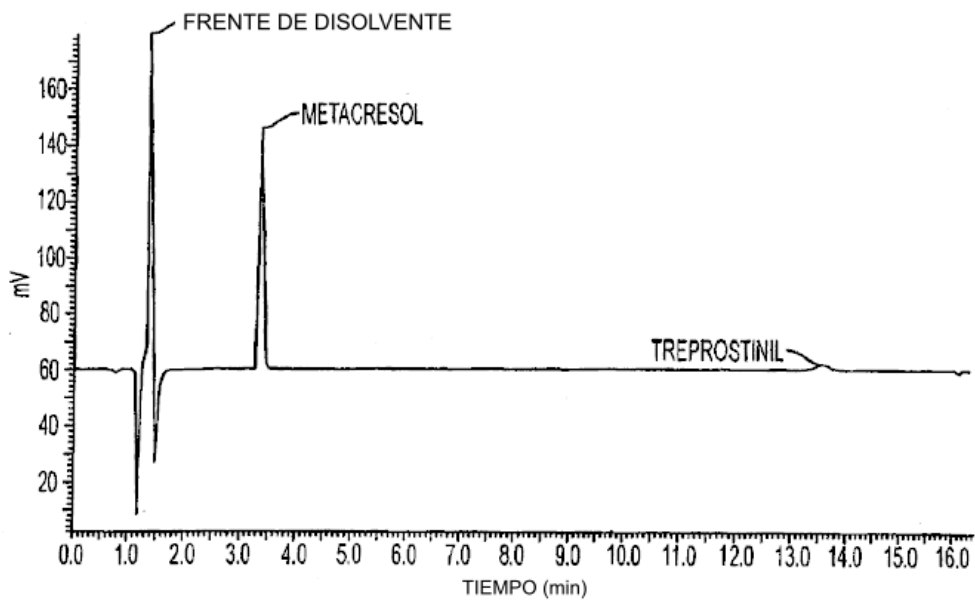


FIG. 4A

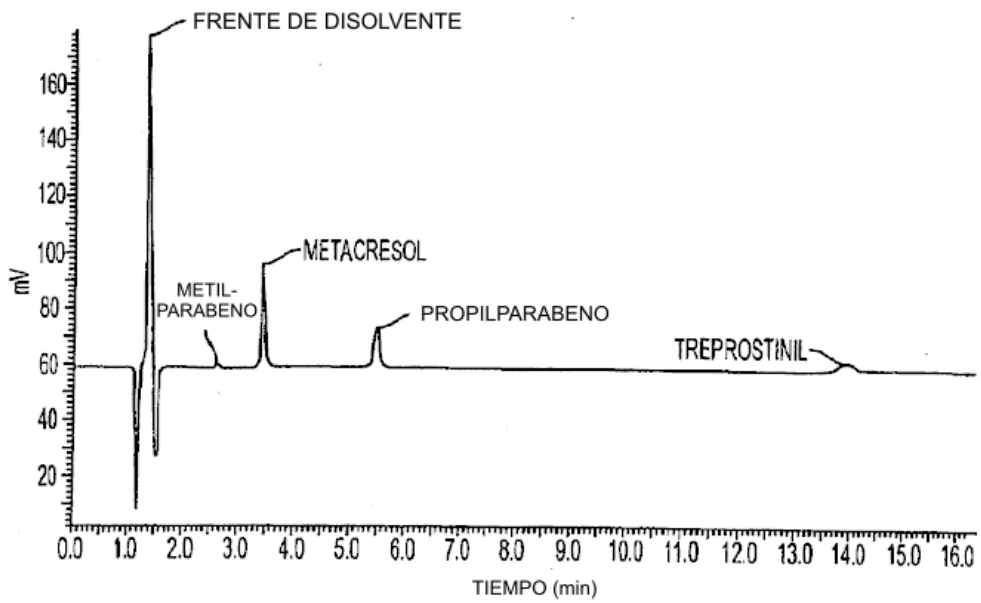


FIG. 4B

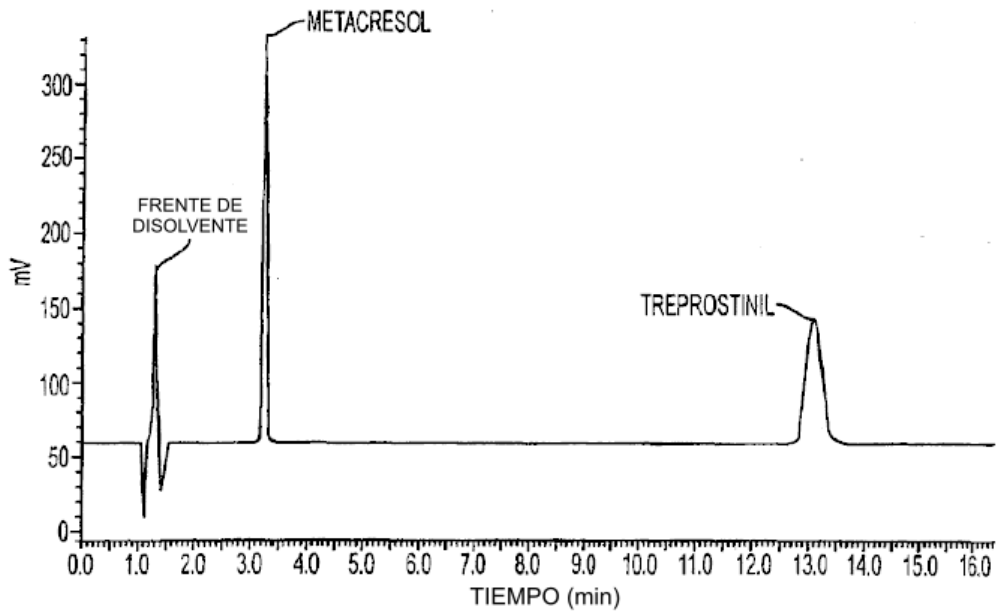


FIG. 5A

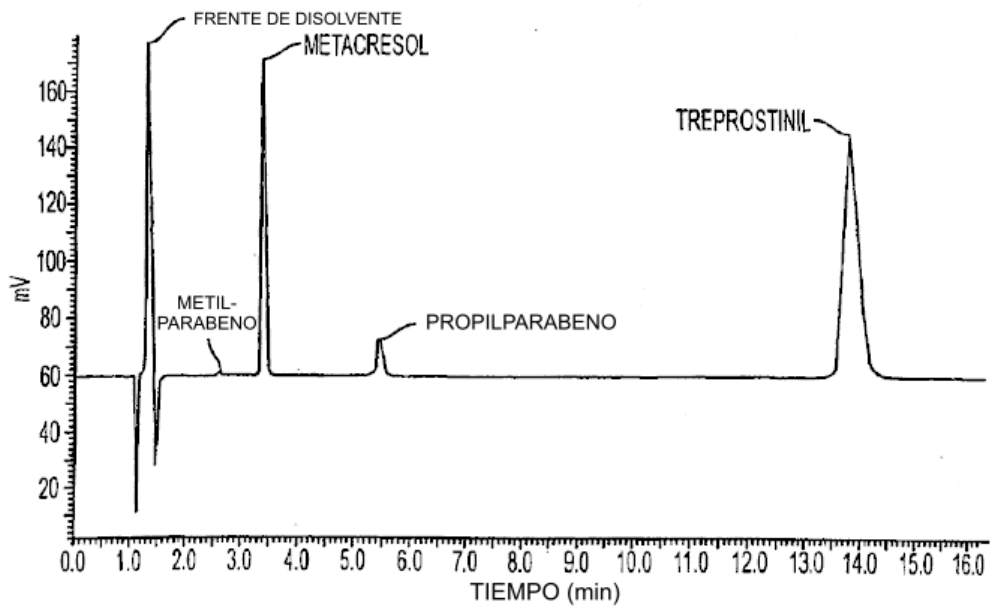


FIG. 5B

FIGURA 6

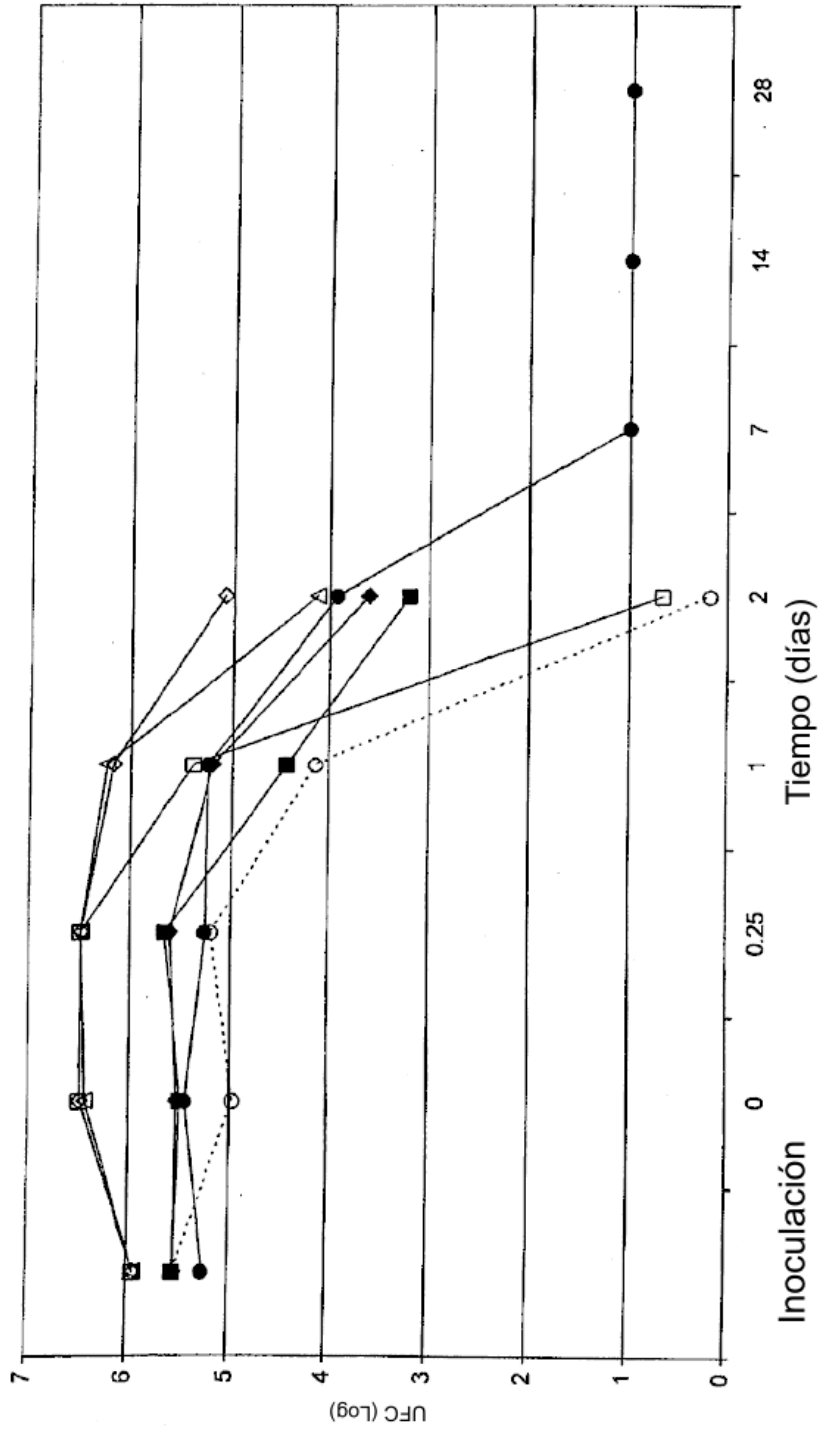


FIGURA 7

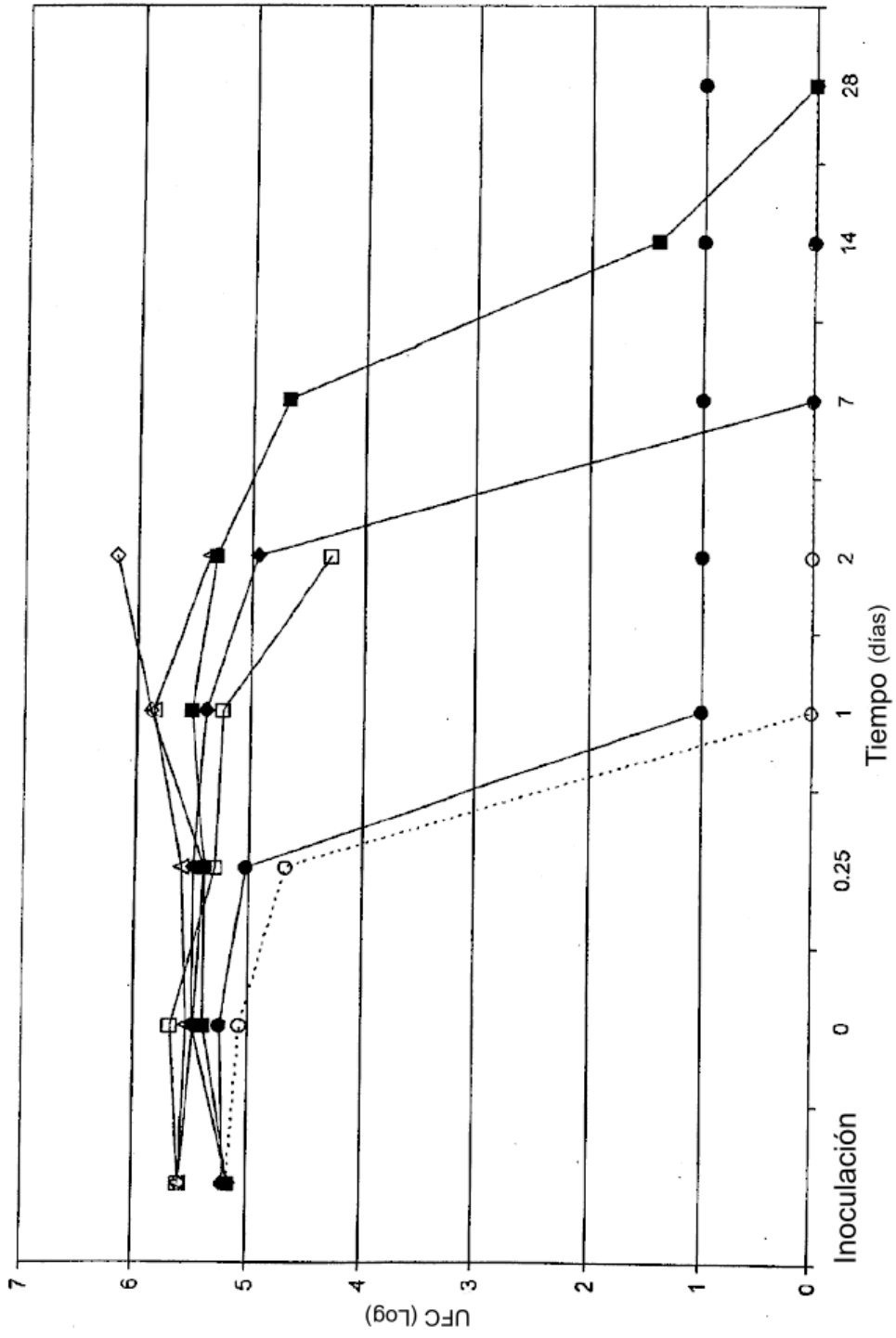


FIGURA 8

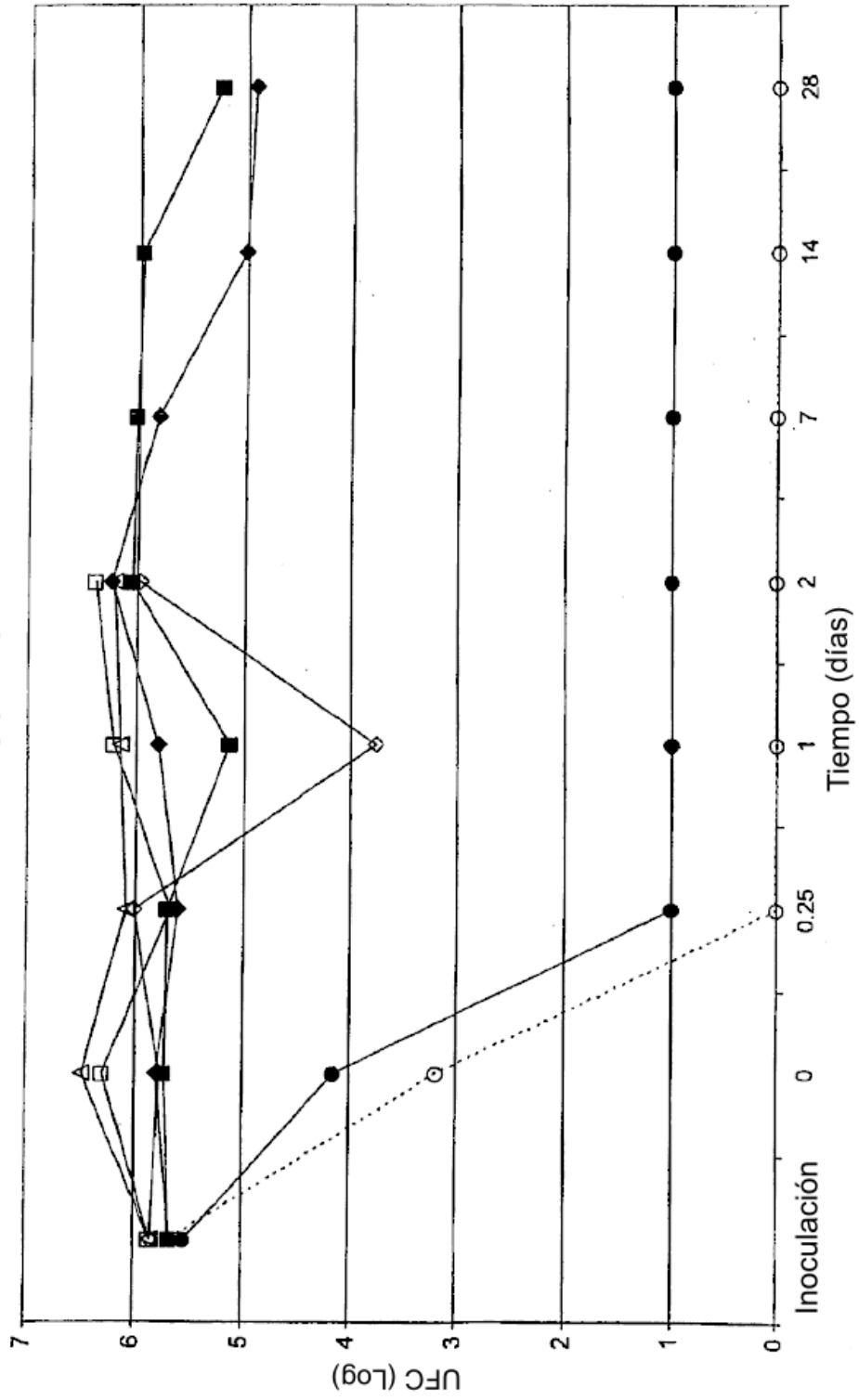


FIGURA 9

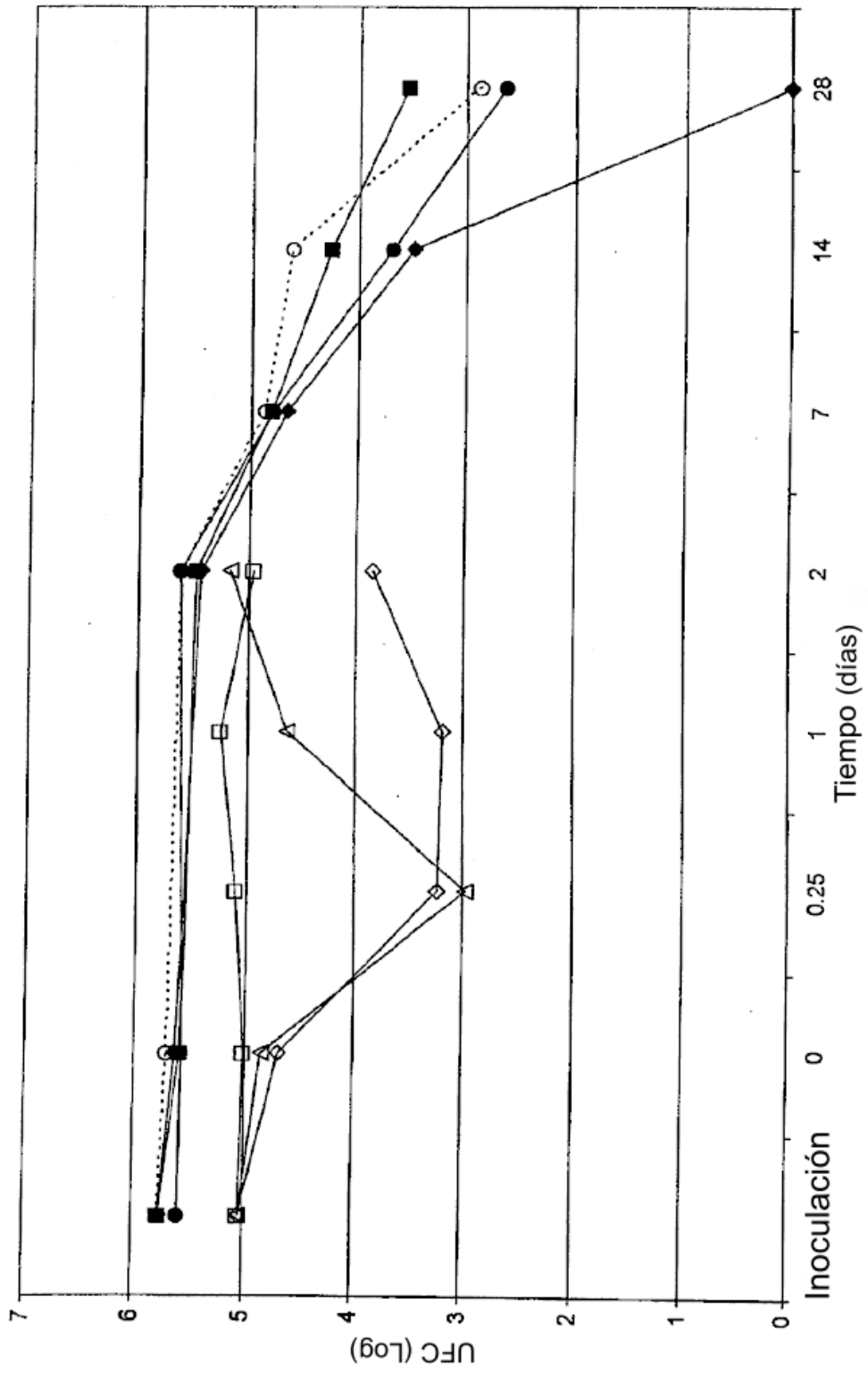


FIGURA 10

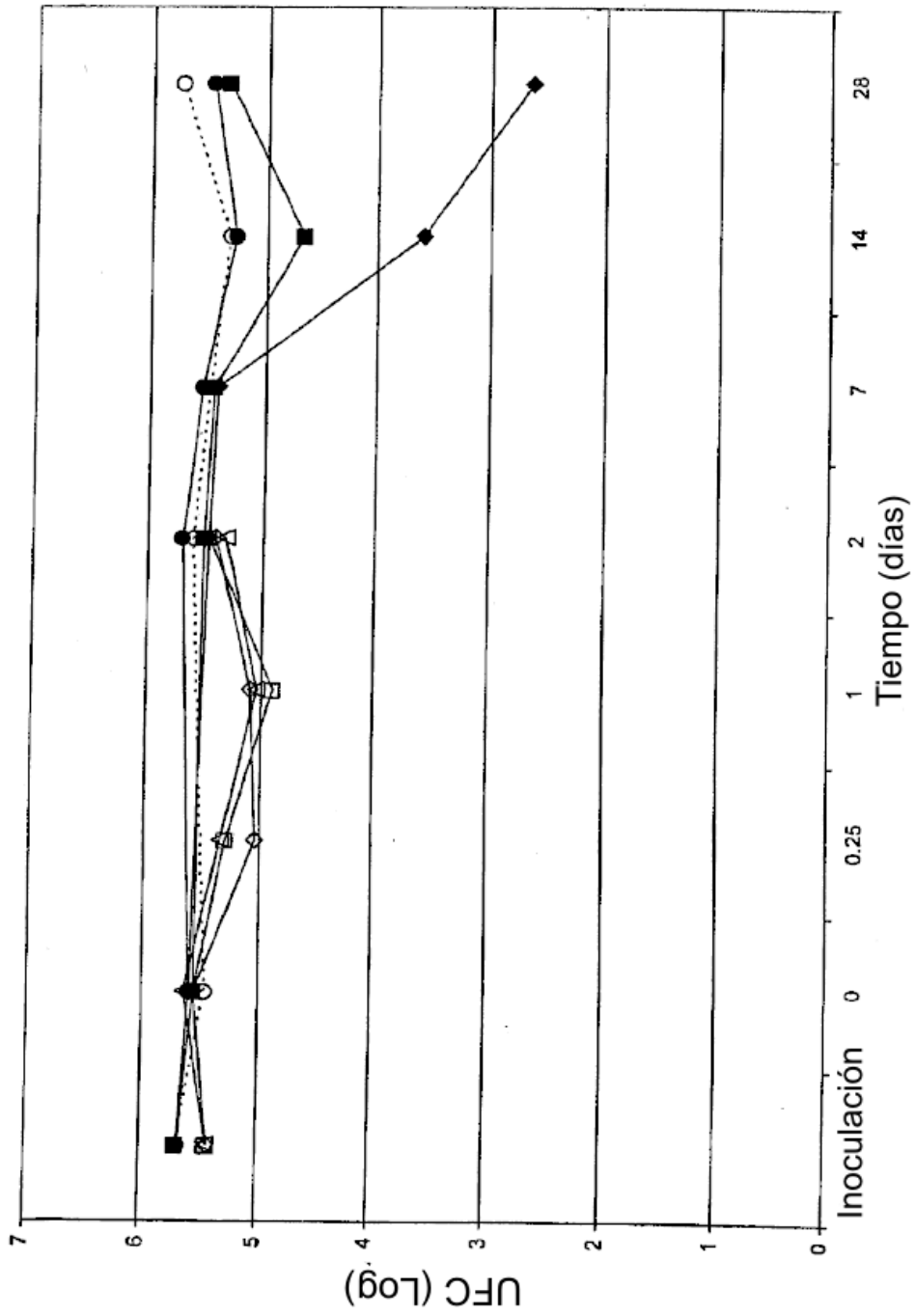


FIGURA 11

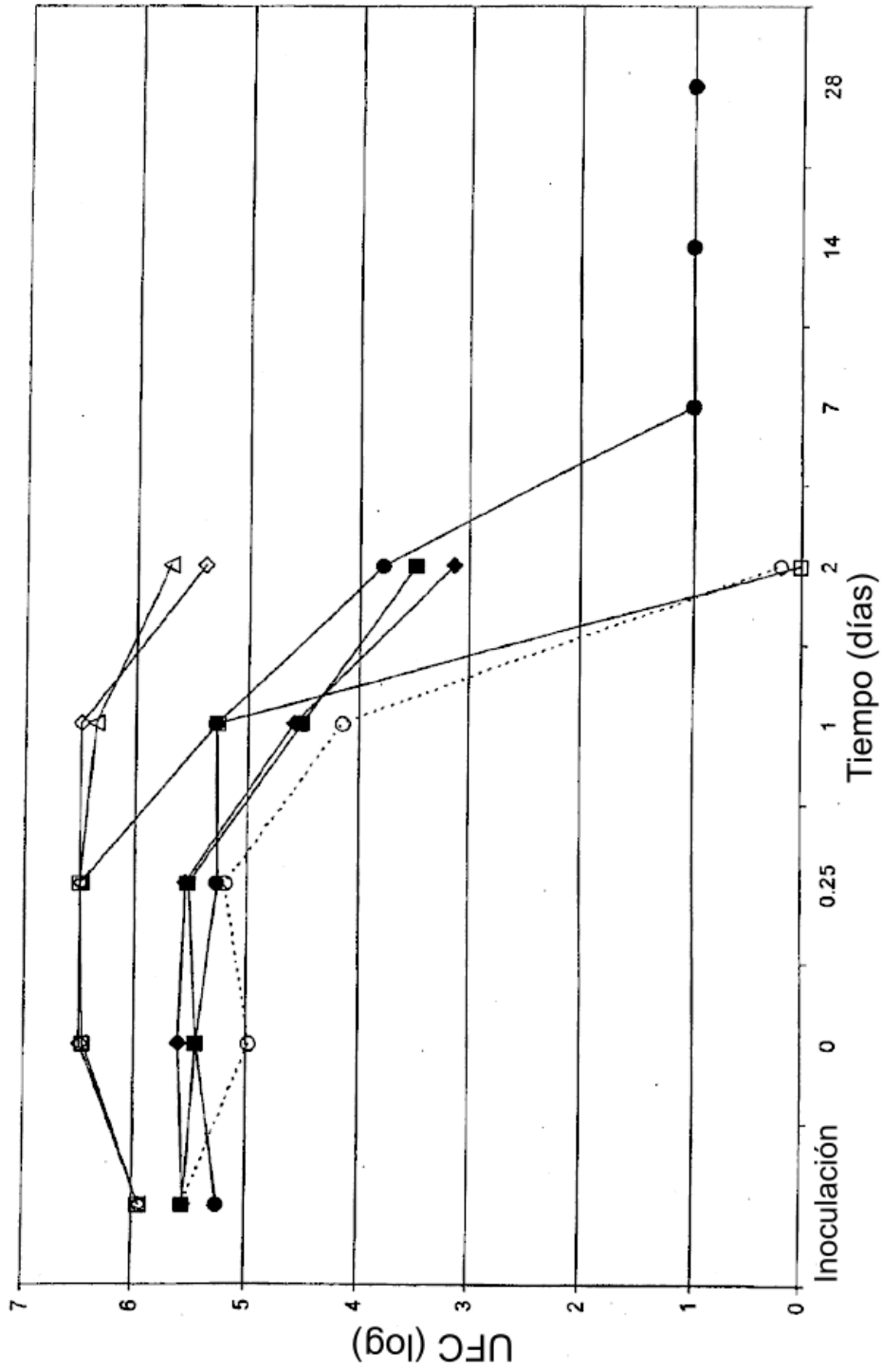
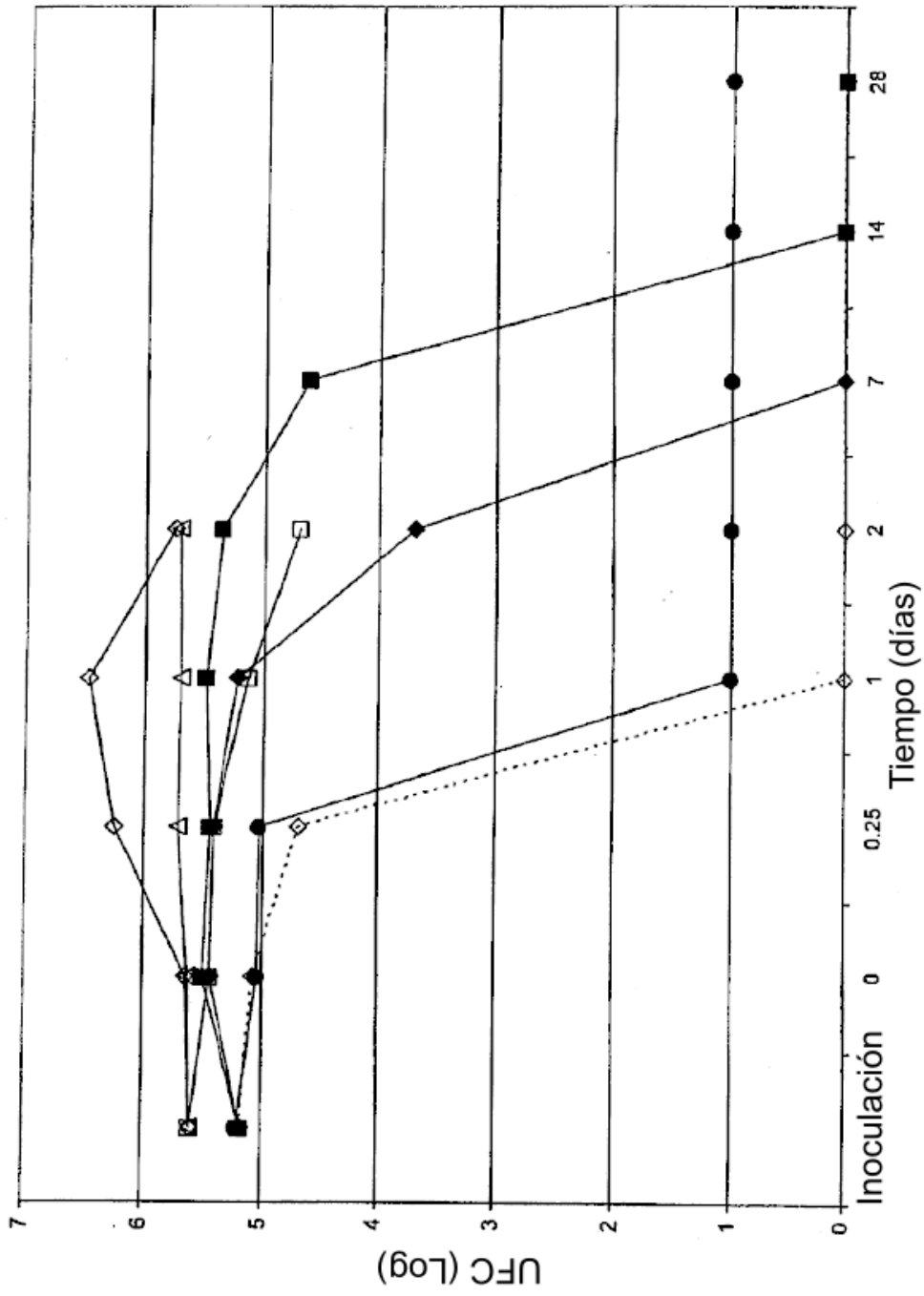


FIGURA 12



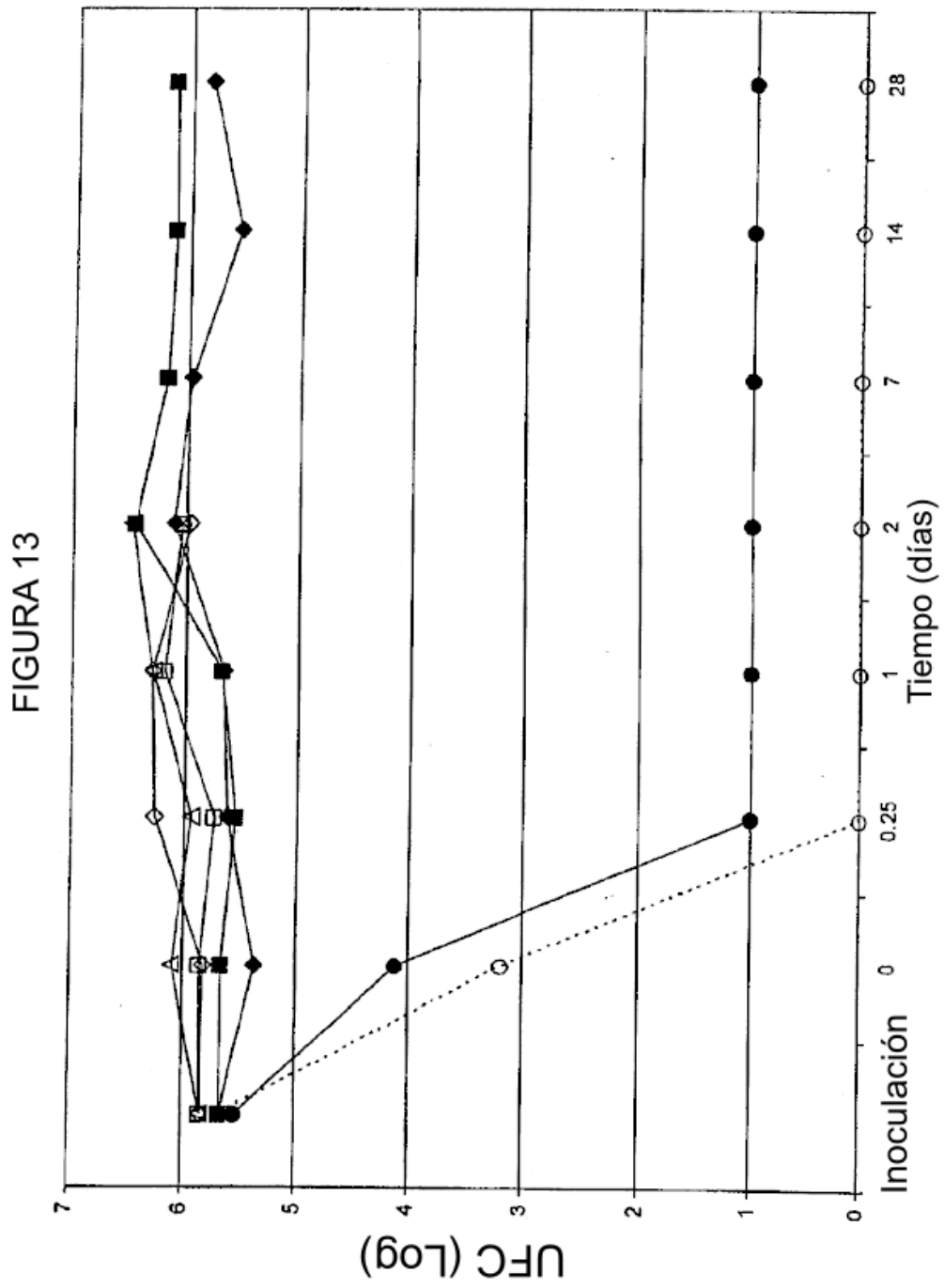


FIGURA 14

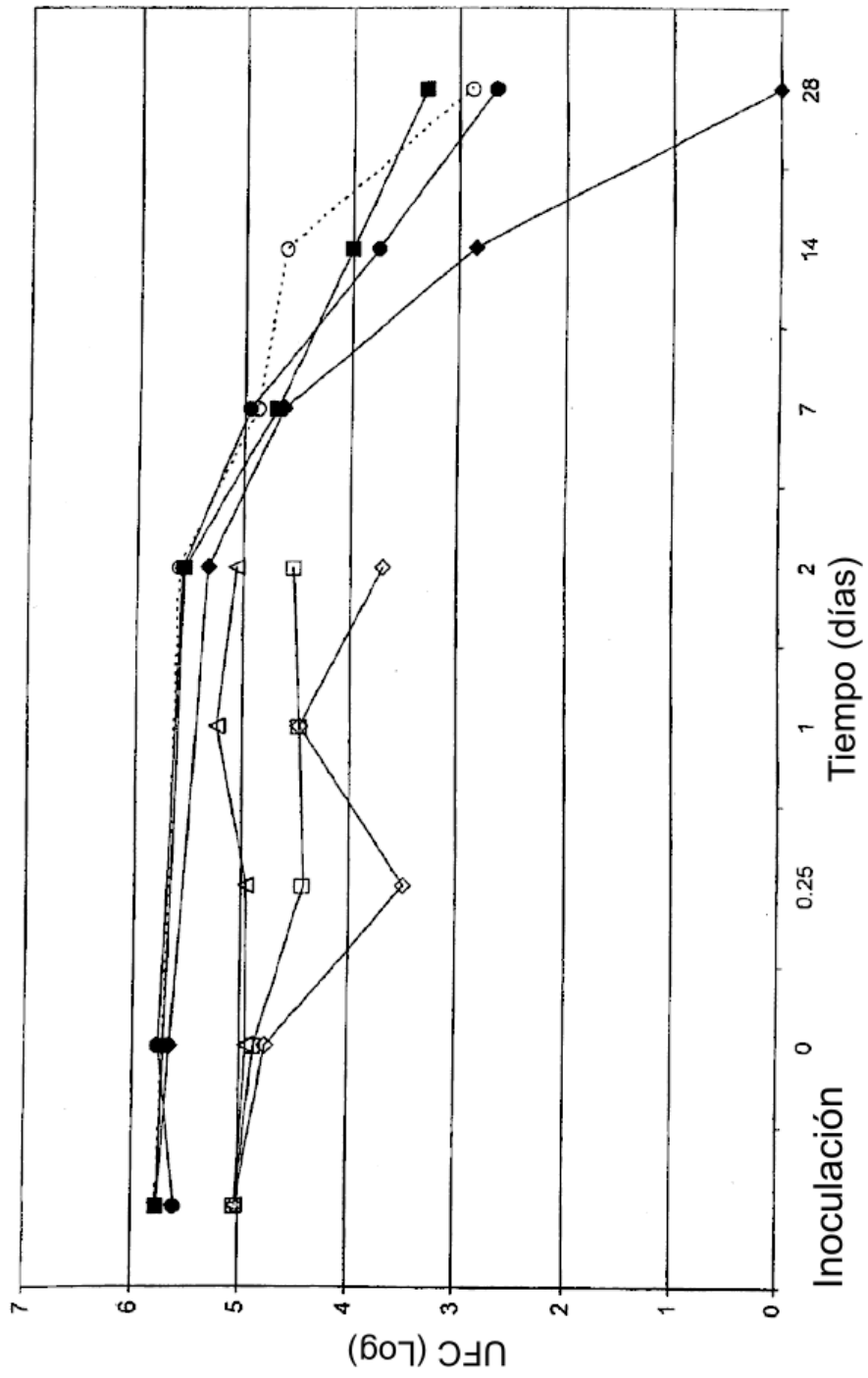


FIGURA 15

