

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 845 281**

21) Número de solicitud: 202031248

51) Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 9/72 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22) Fecha de presentación:

15.12.2020

43) Fecha de publicación de la solicitud:

26.07.2021

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

24.04.2024

Fecha de concesión:

15.10.2024

45) Fecha de publicación de la concesión:

22.10.2024

73) Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(65.0%)**

Avenida de Séneca, 2

28040 Madrid (Madrid) ES;

UNIVERSIDAD CARDENAL HERRERA CEU (5.0%);

TRINITY COLLEGE OF DUBLIN (20.0%);

FRENCH NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH AND

MEDICAL RESEARCH (INSERM) (4.0%);

POITIERS UNIVERSITY HOSPITAL (3.0%) y

POITIERS UNIVERSITY (3.0%)

72) Inventor/es:

SERRANO LÓPEZ, Dolores Remedios;

DE PABLO TOMERO, Esther;

TORRADO DURÁN, Juan José;

BALLESTEROS PAPANTONAKIS, M^a Paloma;

BOLÁS FERNÁNDEZ, Francisco;

HEALY, Anne Marie;

MARCHAND, Sandrine y

DEA AYUELA, M^a Auxiliadora

54) Título: **Formulaciones de antifúngicos para inhalación basadas en micropartículas colapsadas conteniendo carbohidratos y aminoácidos**

57) Resumen:

Formulaciones de antifúngicos para inhalación basadas en micropartículas colapsadas conteniendo carbohidratos y aminoácidos.

Las formulaciones comerciales con antifúngicos para el tratamiento y la profilaxis de infecciones pulmonares causadas por hongos o patógenos intracelulares (como leishmaniosis o tuberculosis), suelen estar basadas en excipientes lipídicos y, en la mayoría de los casos, su uso está destinado a la administración intravenosa o por medio de aerosoles. Sin embargo, sería más deseable una formulación que permitiera su administración empleando inhaladores de polvo seco.

En base a la necesidad clínica, se han desarrollado formulaciones adaptadas a la vía pulmonar sin excipientes lipídicos conteniendo anfotericina B, γ -ciclodextrina y manosa en proporción 1:1:1, aminoácidos como leucina, y que, opcionalmente, puede contener, además, otros fármacos antifúngicos y broncodilatadores.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 845 281 B2

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de antifúngicos para inhalación basadas en micropartículas colapsadas
conteniendo carbohidratos y aminoácidos

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el campo técnico de la fabricación de
preparaciones farmacéuticas. De forma más concreta, se refiere a la preparación y
10 obtención de formulaciones de composiciones farmacéuticas de anfotericina B.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La anfotericina B (AmB) es el fármaco que se utiliza actualmente como *gold-standard*
15 en el tratamiento de infecciones fúngicas pulmonares y leishmaniosis debido a su
amplio espectro de actividad y baja resistencia. Actualmente, la anfotericina B solo se
comercializa como polvo liofilizado para reconstitución extemporánea antes de
administración intravenosa. Sin embargo, su uso se asocia con efectos adversos como
fiebre, escalofríos, náuseas y vómitos y, más significativamente, con nefrotoxicidad.

20

Para disminuir esta toxicidad, se han propuesto anteriormente formulaciones lipídicas
de anfotericina B como alternativa al tratamiento clásico. Estas formulaciones permiten
una dosificación más alta y, con ello, un aumento del índice terapéutico.

25

En la mayoría de los casos, estas formulaciones basadas en lípidos se administran
por vía intravenosa. Normalmente, estas formulaciones lipídicas de AmB se
comercializan en forma de polvo liofilizado para reconstitución inmediata antes de su
administración intravenosa (AmBisome® y Abelcet®, por ejemplo).

30

Sin embargo, es deseable disponer de una formulación de AmB administrable por vía
inhalatoria, ya que permite una rápida acción de los fármacos siendo útil, en particular,
para la administración local de fármacos que actúan sobre las vías respiratorias
inferiores

35

De hecho, la mayoría de los ensayos clínicos sobre administración de AmB están

enfocados en la seguridad y eficacia de formulaciones lipídicas de AmB inhaladas comerciales.

Los medicamentos inhalados se pueden administrar utilizando inhaladores de dosis
5 medida (conocidos como pMDIs por sus siglas en inglés) como aerosoles y nebulizadores; o inhaladores de polvo seco (DPIs, por sus siglas en inglés). Cada uno de ellos requiere una estrategia de formulación para asegurar el éxito de la liberación del fármaco en el pulmón. Pero, entre todos ellos, los DPIs presentan ventajas como la consistencia de la dosis administrada a las vías respiratorias, una buena eficacia de
10 deposición, facilidad de administración y estabilidad de la formulación. En la mayoría de los casos, su uso está destinado a la administración mediante aerosoles.

Una de las limitaciones de las formulaciones de DPI es que el flujo inspiratorio del paciente determina la eficacia de la inhalación y la deposición del fármaco en los
15 pulmones (De Pablo, E, Fernández-García R, Ballesteros MP, Torrado JJ, Serrano D.R. *Nebulised antibiotherapy: conventional versus nanotechnology based approaches, is targeting at a nano scale a difficult subject?* Annals of Translational Medicine, **2017** 5(22): p. 1-16.). Por lo tanto, es posible que los medicamentos no se administren con éxito en pacientes que padecen infecciones pulmonares de hongos o
20 parásitos graves, con una capacidad pulmonar muy disminuida o pacientes con falta de coordinación mano-respiración. En este sentido, sería de gran ventaja una formulación DPI versátil que pudiera ser tanto administrado como un DPI como fácilmente reconstituido en agua seguido de nebulización; especialmente para población pediátrica y geriátrica o pacientes con dificultades para lograr una inspiración
25 profunda (Vartiainen, V., et al., *Pulmonary administration of a dry powder formulation of the antifibrotic drug tilorone reduces silica-induced lung fibrosis in mice.* Int J Pharm, **2018**. 544(1): p. 121-128). La última estrategia basada en la reconstitución del polvo en agua para nebulización, podría ser útil en aquellos pacientes que requieren ajuste de dosis como, por ejemplo, en el caso de tratamientos profilácticos o infecciones
30 graves (Rijnders, B.J., et al., *Aerosolized liposomal amphotericin B for the prevention of invasive pulmonary aspergillosis during prolonged neutropenia: a randomized, placebo-controlled trial.* Clin Infect Dis, **2008**. 46(9): p. 1401-8; Paranjpe, M. and C.C. Muller-Goymann, *Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review.* Int J Mol Sci, **2014**. 15(4): p. 5852-73).

35

Por otra parte, la experiencia de antibióticos inhalados diseñados para administración parenteral muestra que pueden causar irritación bronquial debido al uso de excipientes no fisiológicos en su composición. Además, no sólo hay una necesidad clínica de antifúngicos DPI sino también de formulaciones para DPI que combinen antifúngicos y broncodilatadores.

Por ello, sería deseable una formulación de anfotericina B que se pueda administrar por inhalación y esté libre de excipientes que causen irritación bronquial.

10 **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención describe formulaciones farmacéuticas de anfotericina B para el tratamiento y la profilaxis de infecciones pulmonares causadas por hongos o patógenos intracelulares como la leishmaniosis o la tuberculosis.

15

De forma más concreta, la invención se refiere a nuevas formulaciones farmacéuticas de anfotericina B (AmB) sin excipientes lipídicos para administración por vía pulmonar, así como a su método de preparación y sus aplicaciones.

20 En base a la necesidad clínica, se han desarrollado formulaciones adaptadas a la vía pulmonar conteniendo AmB. Opcionalmente, la AmB puede combinarse con otros fármacos antifúngicos (como el itraconazol) para incrementar su eficacia. También opcionalmente, las formulaciones pueden contener fármacos broncodilatadores (como el salbutamol). Se trata de formulaciones que se pueden administrar tanto en polvo seco (cuya administración es mucho más sencilla sin necesitar de la coordinación entre la respiración y la pulsación) como en forma de aerosoles administradas con un nebulizador previa reconstrucción en agua.

25

Un primer aspecto de la invención se refiere al desarrollo de micropartículas colapsadas sin excipientes lipídicos que presentan un tamaño geométrico y aerodinámico apto para la vía pulmonar (1 – 5 μm) y con una carga de fármaco antifúngico superior al 25% del contenido total en peso del polvo seco del contenido total de la formulación.

30

35

En concreto, el método para la preparación de las formulaciones de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- a) Se prepara una disolución en medio acuoso de γ -ciclodextrina y se ajusta el pH de dicha disolución entre 12 y 14.
- 5 b) A continuación se añade la AmB (en una cantidad entre el 5 – 40% del total del peso de la formulación) a la disolución de la etapa (a) en una relación peso AmB: γ -ciclodextrina 1:1 y se agita constantemente hasta su completa disolución.
- c) Se ajusta el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 6 y 8, y se sonica
10 si es necesario para conseguir una mezcla homogénea.
- d) Se añade un monosacárido (como, por ejemplo, manosa, rafinosa o manitol) a la suspensión acuosa en una proporción entre el 5 y el 40% en peso del total (relación peso AmB: monosacárido de 1:1)
- e) A continuación se incorpora un aminoácido (como la leucina o isoleucina) a la
15 suspensión anterior en proporciones por debajo del 20% en peso del total de la formulación.

Para la preparación de la formulación en polvo seco para inhalación, se realizan también las siguientes etapas:

- 20 f) Se atomiza la suspensión acuosa mediante atomizador. El flujo de entrada de aire o nitrógeno puede variar entre 600 y 800 L/h, aunque preferiblemente se utiliza 742 L/h; la suspensión acuosa es bombeada a una velocidad entre 2 y 6 ml/min, preferiblemente a 2,5 ml/min; la temperatura de evaporación se mantiene por encima de 110°C, preferiblemente de 150°C; y la fuerza de
25 aspiración por encima del 90%.
- g) Tras la atomización se recoge el polvo atomizado del vaso colector.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a la utilización de mono y oligosacáridos de bajo peso molecular como excipientes bioactivos para la vectorización del fármaco
30 antifúngico hacia el epitelio pulmonar como, por ejemplo, ciclodextrinas y manosa.

Respecto a los oligosacáridos, es conocido que la ciclodextrina tiene la capacidad de difundir a través del moco producido en ciertas infecciones pulmonares y facilitar la desestabilización del biofilm formado por microorganismos. Estos defectos suelen ser
35 temporales y reversibles, minimizando su toxicidad a nivel pulmonar. La proporción de

ciclodextrina utilizada en la presente invención para la solubilización de ciertos antifúngicos como la AmB es inferior a la descrita anteriormente (WO2012042072). Un proporción baja de ciclodextrinas y AmB (por ejemplo, 1:1 en peso) permite que se establezca un equilibrio entre AmB solubilizada y agregada. Este equilibrio mejora el balance beneficio-riesgo a nivel pulmonar.

También es conocido que la combinación de AmB con monosacáridos, como la manosa, tiene un doble efecto: por un lado, actúa como agente quimiotáctico atrayendo patógenos celulares y, por otro lado, interviene en la regulación de la inmunidad celular al ser capaz de interactuar con receptores localizados en la superficie de macrófagos activándose la respuesta inmunitaria capaz de interactuar con receptores localizados en la superficie de macrófagos, activándose la respuesta inmunitaria y promoviéndose la erradicación de organismos patógenos (Brown, G.D., *Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 33-43). Por tanto, las formulaciones de la presente invención pueden ser de utilidad para el tratamiento contra patógenos intracelulares que se encuentren localizados a nivel de los macrófagos, como la tuberculosis o leishmaniosis (Pinto, M.R., E. Barreto-Bergter, and C.P. Taborda, *Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system*. Braz J Microbiol, 2008. **39**(2): p. 195-208).

Un tercer aspecto de la invención se refiere a la combinación de AmB con aminoácidos, como la leucina, en bajas proporciones (< 20 %) como facilitadores del flujo de partículas a nivel del tracto respiratorio (Focaroli, S., et al., *A Design of Experiment (DoE) approach to optimise spray drying process conditions for the production of trehalose/leucine formulations with application in pulmonary delivery*. Int J Pharm, 2019. **562**: p. 228-240; Molina, C., et al., *Agglomerated novel spray-dried lactose-leucine tailored as a carrier to enhance the aerosolization performance of salbutamol sulfate from DPI formulations*. Drug Deliv Transl Res, 2018. **8**(6): p. 1769-1780), confiriendo así a las partículas una morfología colapsada con carácter antiadherente permitiendo una mejor deposición pulmonar y una menor susceptibilidad a la humedad, prolongando su estabilidad fisicoquímica (Mah, P.T., et al., *The use of hydrophobic amino acids in protecting spray dried trehalose formulations against moisture-induced changes*. Eur J Pharm Biopharm, 2019. **144**: p. 139-153). Además, la combinación de

manosa y leucina en la formulación tiene capacidad protectora frente a los glóbulos rojos, lo cual es muy importante para fármacos hemolíticos como la AmB.

5 Un cuarto aspecto de la invención se refiere al desarrollo de formulaciones pulmonares mediante atomización con alta versatilidad, que pueden administrarse tanto como inhaladores en polvo seco como aresoles con baja susceptibilidad al caudal de aire inspirado por el paciente. Las micropartículas colapsadas desarrolladas en estado sólido presentan una buena deposición pulmonar a distintos flujos de aire inspiratorio (entre 60 y 30 L/min). Además, pueden reconstituirse en agua, dando lugar a un tamaño óptimo en suspensión pudiendo ser aerosolizadas manteniendo una correcta desposición en el tracto respiratorio. Además, la desposición *in vivo* tras administración pulmonar ha demostrado tiempos más prolongados de las micropartículas en el pulmón y, por consiguiente, un mejor efecto terapéutico.

15 Un quinto aspecto de la invención es la combinación de AmB con otros fármacos antifúngicos o broncodilatadores. En función de los excipientes utilizados y las condiciones empleadas para su fabricación, las micropartículas pueden contener más de un fármaco antifúngico, como el itraconazol, pudiendo incrementar su eficacia. Se ha conseguido cargar hasta un 40% de fármacos dentro de las micropartículas manteniendo un buen perfil de deposición pulmonar *in vitro*. De la misma forma, la combinación con fármacos broncodilatadores, como el salbutamol, también es factible, manteniéndose una buena deposición de las partículas a nivel pulmonar.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

30 **Figura 1.** Actividad *in vitro* antifúngica frente a *Candida ssp.* Clave: Diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) en *C. albicans*, *C. parasilopsis* y *C. glabrata* están expresadas mediante *, # y &, respectivamente, en comparación con los discos comerciales de Neosensitab® de AmB.

35

Figura 2. Estudio de la captación por macrófagos: captación de micropartículas de AmB en presencia de macrófagos utilizando una concentración de AmB de 1,56 µg/ml tras 1, 4 y 24 h de exposición.

5 **Figura 3.** Perfil farmacocinético tras la administración intratraqueal de 5 mg/kg de la formulación F1 de AmB comparada con la formulación comercial AmBiosme®. Clave: -- ■ -- Concentración de AmBiosme® en plasma tras ser administrada por vía intravenosa, - ▲ - Concentración de AmB en tejido epitelial pulmonar y - ■ - Concentración de AmB en plasma.

10

A continuación se proporciona una lista de los distintos elementos representados en las figuras que se integran en la invención:

F1: Formulación de AmB que contiene una proporción de AmB: γ-ciclodextrina:manosa en peso 1:1:1 (29,8%:29,8%:29,8%) y un 10,4 % de leucina.

15

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

20

Ejemplo 1.

Este ejemplo se refiere a la preparación de la formulación de AmB siguiendo el método descrito en la invención.

25

Se prepara una disolución en medio acuoso de γ-ciclodextrina y se ajusta el pH de dicha disolución entre 12 y 14. A continuación se añade la AmB (en una cantidad equivalente en peso al de la ciclodextrina (ratio 1:1) y se agita constantemente hasta su completa dispersión. Se ajusta el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 6 y 8, y se sonica durante 10 min en un baño de agua. Se añade manosa a la suspensión acuosa en una proporción AmB:γ-ciclodextrina:manosa de 1:1:1 (en peso) para la formulación descrita como F1. A continuación se incorpora un aminoácido (como la leucina) a la suspensión anterior en proporciones por debajo del 20% en peso del total de la formulación, en particular en un 10.4% para la F1.

35

La suspensión obtenida se atomiza en un Mini Büchi.B191 (Büchi Labortechnik AG, Switzerland) usando un ciclón de alta eficiencia, fijando la temperatura de entrada en 130 - 170°C, el caudal de pulverización en 2 – 6 mL/min (tasa de pulverización 5-15%), el caudal de nitrógeno en 500 – 800 NL/h y la fuerza del aspirador en un 85 – 100 %.

5 Una vez atomizada la disolución, las partículas se recogen en un colector.

Ejemplo 2.

En este ejemplo se muestra el efecto del tipo de monosacárido en las micropartículas colapsadas obtenidas.

10

La sustitución de manosa por rafinosa dio lugar a micropartículas con un tamaño geométrico superior (5-10 µm).

Ejemplo 3.

15 En este ejemplo se prueba la actividad antifúngica *in vitro* de la formulación de AmB.

Se prueba la actividad antifúngica de la formulación de AmB atomizadas descritas en el ejemplo 1 contra tres cepas diferentes de *Candida spp.* (*Candida spp.*, *Candida albicans*; CECT 1394, *Candida Glabrata* 60750 y *Candida Parassilopsis* 57744). La actividad antifúngica se prueba por ensayo de difusión en agar (Ruiz, H.K. et al. *Int, J. Pharm*, **2014**. 473(1-2): p. 148-57).

20

Los diámetros de la zona de inhibición se miden en puntos donde hay una inhibición completa de crecimiento de levadura. Los aislados se clasifican en susceptibles a AmB (S) cuando la zona de inhibición es mayor de 15 mm, resistentes (R) si la zona de inhibición es menor de 10 mm e intermedios (I) si la zona de inhibición está entre 11 y 14 mm. En la Figura 1, se observa que las tres cepas de *Candida* probadas son susceptibles a la formulación F1 con un halo de inhibición mayor de 15 mm. F1 muestra una mayor eficacia significativa ($p < 0,05$) que los discos de AmB comerciales Neo-Sansitabs® contra *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

25

30

Ejemplo 4.

En este ejemplo se estudia la captación por macrófagos de la AmB de la formulación de la invención.

35

Se crecen células de línea J774 (línea celular similar a monocitos murinos) en MEM (*Minimum Essential Medium*) desarrollado por Eagle en presencia de FBS (*Fetal Bovine Serum*), 100 UI/mL de penicilina G y 100 µg/mL de estreptomicina en matraz de 25 mL a 37°C y atmósfera humidificada 5% CO₂/aire. Las células J774 (100 µl 5 equivalente a 5x10⁵ células/ml) se incuban a 37°C con 100 µl de cada formulación de AmB antes de ser reconstituidas con agua desionizada y diluidas a varias concentraciones, entre 25 y 0,195 µg/ml). Después de varios tiempos de incubación (1, 4 y 24 h), el sobrenadante se elimina y se lava toda la placa con medio macrófago frío (RPMI). La lisis celular se lleva a cabo con 250 µl de Triton 1% en PBS seguido de 10 30 minutos bajo agitación leve. Después, se transfieren 100 µl a otra placa de 96 pocillos y se incorporan 100 µl de metanol para solubilizar la AmB y precipitar los restos celulares. La placa se centrifuga durante 10 minutos a 2500 rpm. Finalmente, se recoge el sobrenadante y se analiza por HPLC.

15 La Figura 2 muestra captación de micropartículas de AmB en presencia de macrófagos utilizando una concentración de AmB de 1,56 µg/ml tras 1, 4 y 24 h de exposición.

Ejemplo 5.

En este ejemplo se muestra el efecto hemolítico de los excipientes de la formulación de AmB atomizada. 20

Se centrifuga sangre de personas sanas voluntarias contenida en tubos Vacutainer recubierto de EDTA a 1000 rpm durante 5 minutos y se marcan los niveles de plasma y hematocrito en el tubo. En el tubo se descarta el sobrenadante y tubo se rellena 25 hasta el nivel de plasma marcado con disolución de NaCl 150 mM y se mezcla. Se centrifuga de nuevo el tubo (5 minutos a 1000 rpm) y se descarta de nuevo el sobrenadante. Las células rojas de la sangre (RBC, del inglés *Red Blood Cells*) se lavan dos veces con disolución de NaCl 150 mM. Después se descarta el sobrenadante y las RBCs se diluyen con PBS (tampón fosfato salino) a pH 7,4 hasta 30 una concentración final del 4% (4,81 x 10⁵ RBC/ml). Las RBCs diluidas se añaden en placas de 96 pocillos (180 µl/pocillo).

Para comparar el efecto de la leucina y la manosa en diferentes estados de agregación de la AmB, se preparan disoluciones de la formulación de AmB y se colocan 20 µl de 35 cada una de ellas en los pocillos. Para control positivo, se añaden también en un pocillo

20 µl de disolución de Triton X-100. Para control negativo, se añaden 20 µl de PBS a pH = 7,4. Las placas se incuban a 37°C durante 1 hora. Después, se centrifugan a 2500 rpm durante 5 minutos para sedimentar eritrocitos. Los sobrenadantes (50 µl) se transfieren a una placa transparente de 96 pocillos de fondo plano. Se mide la
 5 absorbancia (ABS) de los sobrenadantes usando un lector de placas (BioTek, ELx808) a 595 nm. El porcentaje de hemolisis se calcula mediante la ecuación:

$$\text{Hemolisis (\%)} = \frac{(\text{ABS}_{\text{muestra}} - \text{ABS}_{\text{PBS}})}{(\text{ABS}_{\text{Triton}} - \text{ABS}_{\text{PBS}})}$$

10 Resultó que los excipientes (leucina y manosa) tienen un efecto protector en las RBCs solo cuando se usan en proporción 1:1 en peso, pero no de forma separada.

Ejemplo 6.

Se muestra la deposición pulmonar de la formulación de AmB.

15

Para determinar la deposición pulmonar *in vitro* de la formulación F1, se calcula el tamaño de partícula aerodinámico (MMDA) y la fracción de partículas (FPF) por debajo de las 5 y 3 µm, de acuerdo a las especificaciones de la *European Pharmacopoeia 9.0 – Preparations por Inhalation* para dos condiciones diferentes: y 60 L/min durante 4
 20 segundos y 30 L/min durante 8 segundos.

La formulación también se reconstituye en agua desionizada a 5 mg/ml para estudiar la deposición pulmonar durante nebulización durante 15 minutos a 25 L/min. También se realizan pruebas con AmBisome® (formulación liposomal liofilizada intravenosa)
 25 siendo incorporado en cápsulas para inhalación de polvo seco o siendo reconstituido en agua desionizada a la misma concentración.

Resultó que las formulación F1 atomizada muestra una buena deposición pulmonar a 60 L/min con un FPF < 5 µm próximo al 80% y un MMAD por debajo de 3 µm. A
 30 diferentes caudales de aire, F1 muestra un perfil consistente a los cambios del caudal de aire, exhibiendo una reducción importante del 25% en la FPF < 5 µm a 25 y 30 L/min. La formulación comercial AmBisome® muestra un perfil de deposición muy diferente entre 60 L/min a partir de su liberación de una cápsula en un inhalador en

polvo seco y nebulizada después de ser reconstituida en agua desionizada y nebulizada a 25 L/min.

5 Las micropartículas colapsadas de F1 en estado sólido presentan una buena deposición pulmonar a distintos flujos de aire inspiratorio (entre 60 y 30 L/min). Además, pueden reconstituirse en agua, dando lugar a un tamaño óptimo en suspensión pudiendo ser aerosolizadas manteniendo una buena deposición en el tracto respiratorio.

10 **Ejemplo 7.**

Este ejemplo se refiere al perfil farmacocinético de la formulación de AmB.

15 El perfil farmacocinético de la formulación de la presente invención, se determina utilizando ratas OFA 250/275 gr. A un primer grupo (G1) se le administró 5 mg /kg de AmBisome® por vía intravenosa; a los grupos G2 y G3 se les administró la formulación F1 en dosis de 5 mg/kg por vía intratraqueal. Se mantienen concentraciones en plasma por encima de 1 µg/ml durante, al menos, 24 h; esto indica que una sola administración diaria sería suficiente para proporcionar efecto profiláctico o terapéutico frente a *Aspergillus spp.*

20

Sin embargo, los niveles de AmB en plasma caen muy rápidamente después de administración intravenosa de AmBisome® (por debajo de 1 µg/ml a las 4 horas), lo cual explica la baja eficiencia de esta formulación cuando se administra por vía parenteral en pacientes críticos (Figura 3).

25

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n de anfotericina B (AmB) basada en micropart3culas colapsadas para ser administrada por v3a inhalatoria en forma de polvo seco, o en forma de aerosoles previa reconstrucci3n en agua, que comprende amino3cidos, oligosac3ridos y monosac3ridos como excipientes, caracterizada por que no contiene excipientes lip3dicos, los oligosac3ridos y monosac3ridos son γ -ciclodextrina y manosa en proporci3n AmB: γ -ciclodextrina:manosa es 1:1:1; el amino3cido es leucina en proporci3n 10 -13 % en peso del total de la formulaci3n; las micropart3culas presentan un tama3o geom3trico y aerodin3mico apto para la v3a pulmonar (1 – 5 μ m) con una carga de f3rmaco antif3ngico superior al 25% en peso del polvo seco del contenido total de la formulaci3n.
2. M3todo para la preparaci3n de la formulaci3n objeto de la reivindicaci3n 1 que comprende las siguientes etapas:
 - a) Preparar una disoluci3n en medio acuoso de γ -ciclodextrina y ajustar el pH de dicha disoluci3n entre 12 y 14.
 - b) A3adir a continuaci3n anfotericina B (en una cantidad entre el 5 – 40% del total del peso de la formulaci3n) a la disoluci3n de la etapa (a) en una relaci3n peso AmB: γ -ciclodextrina entre 1:1 y agitar constantemente hasta su completa dispersi3n.
 - c) Ajustar el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 6 y 8, y sonicar si es necesario para conseguir una mezcla homog3nea.
 - d) A3adir el monosac3rido a la suspensi3n acuosa en una relaci3n peso AmB: monosac3rido de 1:1
 - e) Incorporar a continuaci3n el amino3cido a la suspensi3n anterior en una proporci3n del 10,4 % en peso del total de la formulaci3n.
 - f) Atomizar la suspensi3n acuosa mediante atomizador para la preparaci3n de la formulaci3n en polvo seco.
 - g) Recoger el polvo atomizado del vaso colector
3. M3todo, seg3n reivindicaci3n 2, donde el antif3ngico es anfotericina B (AmB) el monosac3rido es manosa, y el amino3cido es leucina.
4. M3todo, seg3n reivindicaci3n 2, donde la etapa de atomizaci3n se lleva a cabo

empleando un flujo de entrada de aire o nitrógeno entre 600 y 800 L/h, la suspensión acuosa es bombeada a una velocidad entre 2 y 6 ml/min, la temperatura de evaporación se mantiene por encima de 110°C, y la fuerza de aspiración por encima del 80%.

5

5. Método, según reivindicación 4, donde el caudal de aire o nitrógeno se mantiene en 742 L/h, la suspensión se bombea a 2,5 ml/min, la temperatura de evaporación se mantiene a 150°C y la fuerza de aspiración por encima del 90%.

10

6. Uso de la formulación reivindicada para la fabricación de un medicamento antifúngico de administración por inhalación.

7. Uso, según reivindicación 6, donde la administración se realiza mediante inhalador de polvo seco (DPI).

15

8. Uso, según reivindicación 7, donde la administración se realiza mediante aerosoles, previa reconstitución del polvo en agua.

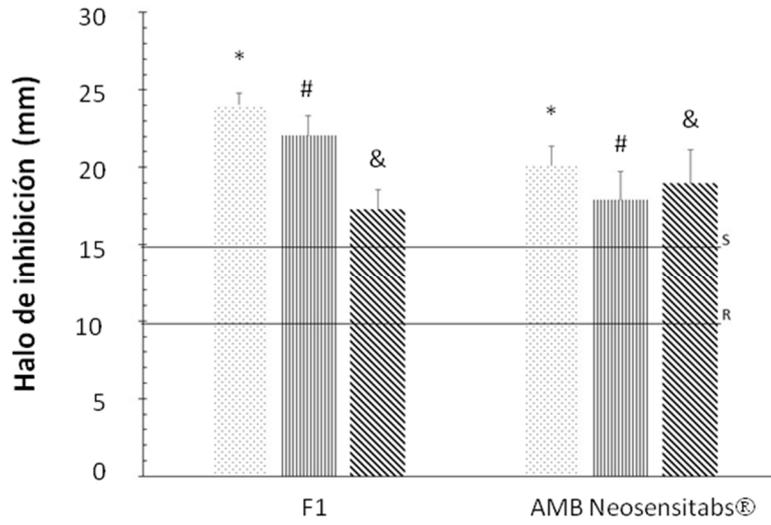


Figura 1

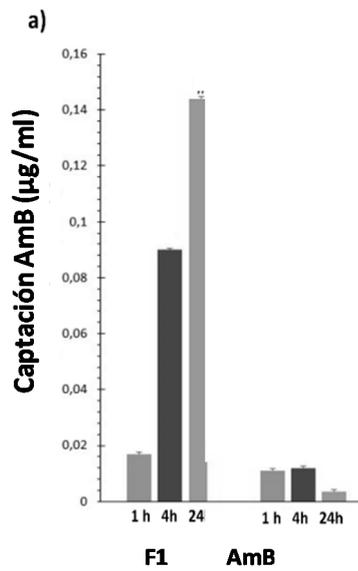


Figura 2

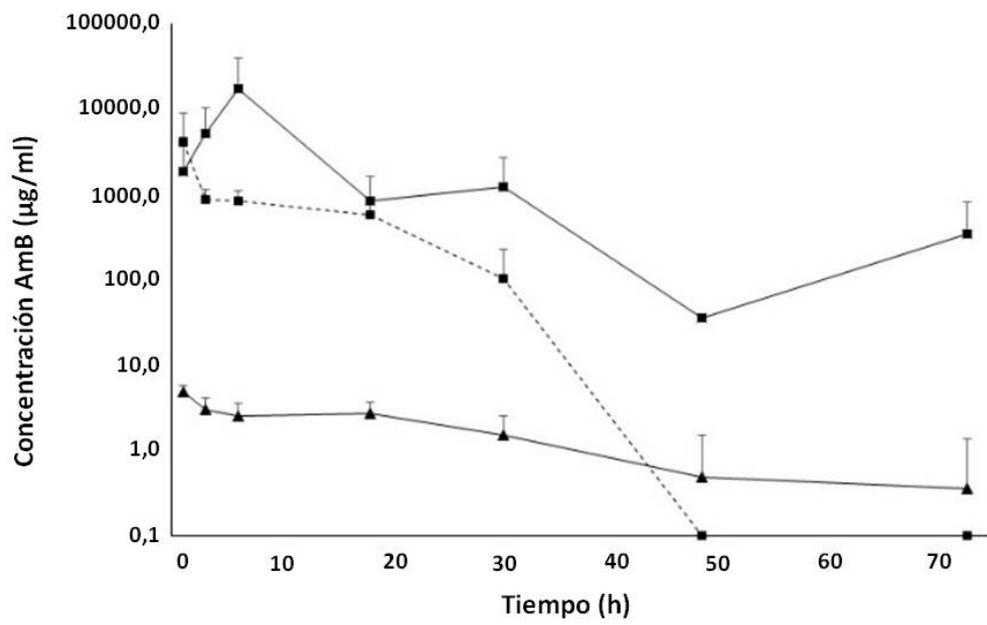


Figura 3