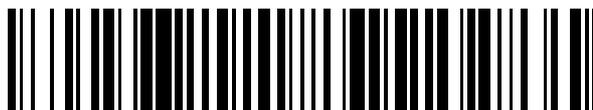


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 030**

51 Int. Cl.:

A61K 31/427 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 9/72 (2006.01)

A61K 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2004 PCT/US2004/021517**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2005 WO05007132**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2004 E 04777564 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **10.05.2017 EP 1641436**

54 Título: **Formulación de lisinato de aztreonam inhalable para el tratamiento y la prevención de infecciones pulmonares bacterianas**

30 Prioridad:

03.07.2003 US 613639

30.06.2004 US 882985

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
25.07.2017

73 Titular/es:

**GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)
333 LAKESIDE DRIVE
FOSTER CITY, CA 94404, US**

72 Inventor/es:

**MONTGOMERY, ALAN, BRUCE;
LINTZ, FRANK-CHRISTOPHE y
KELLER, MANFRED**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 428 030 T5

DESCRIPCIÓN

Formulación de lisinato de aztreonam inhalable para el tratamiento y la prevención de infecciones pulmonares bacterianas

5

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a una nueva formulación de lisinato de aztreonam inhalable, segura, no irritante y fisiológicamente compatible para el tratamiento de infecciones pulmonares bacterianas causadas por bacterias gram negativas tales como *Escherichia coli*, especies de enterobacterias, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans*. En particular, la invención se refiere a la formulación de
15 lisinato de aztreonam inhalable derivada de aztreonam α o β adecuada para el tratamiento y la profilaxis de infecciones pulmonares bacterianas crónicas y agudas, particularmente, las causadas por las bacterias gram negativas *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos que son resistentes al tratamiento con otros antibióticos.

20 La formulación de lisinato de aztreonam inhalable se administra como un aerosol o como un polvo seco inhalable. Para la administración en aerosol, se disuelven de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 mg de lisinato de aztreonam en aproximadamente 1 a aproximadamente 5 ml de solución salina u otra solución acuosa que tenga un pH entre 4,5 y 7,5, administrada en el espacio endobronquial del pulmón en un aerosol que tiene partículas de diámetro promedio de la mediana de masa predominantemente de entre 1 y 5 μm , usando un nebulizador capaz de
25 atomizar la solución de lisinato de aztreonam en partículas de los tamaños requeridos. Una combinación de la nueva formulación con el nebulizador atomizante permite suministrar aproximadamente el 50 % de la dosis administrada de lisinato de aztreonam a las vías respiratorias. Para la administración de polvo inhalable seco, el lisinato de aztreonam se liofiliza, se muele o se seca por pulverización hasta tamaños de partícula de aproximadamente entre 1 y 5 μm . La formulación de polvo seco o un sólido de lisinato de aztreonam reconstituido para la administración en
30 aerosol tienen una estabilidad de almacenamiento y un período de caducidad mayores.

La invención se refiere además a un proceso para la fabricación y la fabricación a gran escala de lisinato de aztreonam α .

35 Antecedentes y divulgaciones relacionadas

Una amplia variedad de bacterias gram negativas provocan infecciones pulmonares graves. Muchas de estas bacterias son o se vuelven resistentes a antibióticos usados habitualmente o de especialidad, y requieren el tratamiento con nuevos tipos de antibióticos. Las infecciones pulmonares causadas por bacterias gram negativas
40 son particularmente peligrosas para los pacientes que tienen respuestas inmunoprotectoras reducidas tales como, por ejemplo, pacientes con fibrosis quística y VIH, pacientes con bronquiectasia o los que se someten a ventilación mecánica.

La terapia actualmente aceptada para infecciones bacterianas graves del tracto respiratorio, particularmente para el tratamiento de la neumonía en pacientes con enfermedades subyacentes, incluye el tratamiento con diversos agentes antibacterianos intravenosos, frecuentemente usados en una combinación de dos o tres vías. La mayoría de estos agentes no son adecuados, no están disponibles o no están aprobados por la FDA para la dosificación oral o en aerosol. En algunos casos, la dosis oral o intravenosa sistémica eficaz requiere dosis que están en el límite o son
45 plenamente tóxicas, evitando de este modo con frecuencia un uso de antibiótico perfectamente válido para el tratamiento de las infecciones pulmonares.
50

Así pues, sería deseable tener disponibles otros modos de vías de administración de estos antibióticos que permitieran un suministro dirigido de menores cantidades del antibiótico en el espacio endobronquial de las vías respiratorias para el tratamiento de estas infecciones bacterianas en lugar de administrar el antibiótico
55 sistémicamente en grandes cantidades.

Además, los pacientes enfermos crónicos con frecuencia están afectados por infecciones causadas por bacterias que son resistentes en gran medida a antibióticos usados de forma habitual o, tras un uso prolongado de cierto antibiótico, a menudo desarrollan una gran resistencia a tal antibiótico. Por ejemplo, la colonización pulmonar crónica
60 con *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística es una causa principal de su alta mortalidad. Cuando se establece, la infección pulmonar crónica es muy difícil, si no imposible, de erradicar. Más del 60 % de los pacientes con fibrosis quística están colonizados con cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* que son resistentes en gran medida a antibióticos habituales y de especialidad, tales como piperacilina, ticarcilina, meropenem, netilmicina y solamente un poco sensibles a azlocilina, ciprofloxacina, timentina y ceftazidima. También
65 se ha mostrado que muchas cepas desarrollan resistencia a tobramicina y a colistina, si se usan de forma continuada.

Con frecuencia, después de terapia prolongada con antibióticos, se desarrolla una superinfección con organismos intrínsecamente resistentes a antibióticos orales, intravenosos o inhalados en pacientes con fibrosis quística y otras infecciones pulmonares crónicas. Los cuatro organismos resistentes a fármacos más comunes son *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos.

Los pacientes con fibrosis quística infectados con *Burkholderia cepacia* tienen una mayor tasa de mortalidad que los pacientes con infecciones de *Pseudomonas aeruginosa*. En algunos pacientes con fibrosis quística, *Burkholderia cepacia* puede provocar una letalidad rápida, como se describe, por ejemplo en *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160: 5, 1572-7 (1999).

El alto nivel de resistencia a antibióticos demostrado por la mayoría de las cepas de *Burkholderia cepacia* limita gravemente las opciones terapéuticas para su tratamiento (*Clinics Chest Med.*, 19: 473-86 (sept. 1998)). Además, a diferencia de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* puede provocar una propagación epidémica entre pacientes con fibrosis quística y, por lo tanto, cualquier paciente infectado con *Burkholderia cepacia* se aísla habitualmente de otros pacientes. Esto provoca gastos adicionales relacionados con el cuidado de estos pacientes y también puede ser psicológicamente devastador para el paciente. Además, la mayoría de los centros de trasplante de pulmón no realizarán un trasplante de pulmón a pacientes infectados con *Burkholderia cepacia* (*Clinics Chest Med.*, 19: 473-86 (sept. 1998)). Por lo tanto, la infección de *Burkholderia cepacia* con frecuencia se ve como una sentencia de muerte por los pacientes con fibrosis quística.

Burkholderia cepacia es habitualmente resistente a la administración parenteral de diversos antibióticos, incluyendo lisinato de aztreonam, mostrando solamente el 5 % de los aislados sensibilidad a dicho tratamiento (*Antimicrob. Agents Chemother.*, 34: 3, 487-8 (Mar. 1990)). Por lo tanto, sería ventajoso tener disponible tratamiento para las infecciones por *Burkholderia cepacia*.

Otras bacterias gram negativas intrínsecamente resistentes a la tobramicina también pueden complicar el cuidado del paciente con fibrosis quística. Estas bacterias incluyen *Stenotrophomonas maltophilia* y *Alcaligenes xylosoxidans*. La terapia de antibióticos de estas infecciones también suele ser ineficaz o conduce a la rápida aparición de resistencia al fármaco. Por lo tanto, el tratamiento satisfactorio de todas estas infecciones requiere que las muestras de estos aislados se envíen a un laboratorio para la determinación de la sinergia de antibióticos compleja de la terapia apropiada para cada paciente individual (*Ped. Pulmon.*, S17: 118-119 (1998)). Por lo tanto, también sería ventajoso proporcionar una terapia para estas infecciones bacterianas poco comunes pero difíciles de tratar.

De igual manera, el desarrollo de infección por *P. aeruginosa* con cepas que son resistentes a, es decir, que tienen una alta concentración inhibitoria mínima (CIM) para una mayoría de antibióticos incluyendo la tobramicina, predice un deterioro de la función pulmonar y también puede descalificar al paciente para tomarle en consideración para un trasplante de pulmón (*Clinics Chest Med.*, 19: 535-554 (sept. 1998)).

Los tratamientos de antibióticos existentes para infecciones pulmonares por *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos son ineficaces o conducen a un surgimiento rápido de resistencia a fármacos.

El aztreonam es un antibiótico sintético que tiene una buena actividad biológica contra bacterias gram negativas, y su sal de arginina derivada de la forma beta ya se ha usado previamente para el tratamiento intravenoso de infecciones bacterianas. Sin embargo, su uso está gravemente limitado debido a su baja eficacia que requiere la administración de dosis intravenosas muy altas de entre 1.000 y 4.000 mg al día para tratar las infecciones causadas por bacterias gram negativas y también por la derivatización de su sal, que no es adecuada a efectos de inhalación. Aunque sería un antibiótico de elección para el tratamiento complementario de pacientes tratados con tobramicina y otros antibióticos, tal tratamiento no es práctico debido a las altas dosis requeridas y a la complicación encontrada con la sal de arginina.

El aztreonam actualmente sólo está disponible como una sal de arginina. Se ha mostrado que la arginina es tóxica para el pulmón y provoca irritación del tejido pulmonar, inflamación, broncoespasmos y tos y, por lo tanto, no es adecuada para la administración por aerosol. Por consiguiente, la sal de arginina de aztreonam no está aprobada para su uso por inhalación en Estados Unidos ni en ningún otro lugar. Sin embargo, como antibiótico para el tratamiento de infecciones pulmonares bacterianas causadas por bacterias gram negativas, el aztreonam podría convertirse en un fármaco de elección para tal tratamiento si se pudiera administrar por inhalación a concentraciones terapéuticamente eficaces directamente en los pulmones y si los problemas relacionados con la arginina de aztreonam se pudieran resolver proporcionando un derivado de la sal diferente, más seguro y fisiológicamente aceptable.

La administración eficaz de aztreonam por inhalación se complica más por la falta de formulaciones seguras, fisiológicamente aceptables y estables para su uso por inhalación. Aparte de la sal fisiológicamente aceptable, tal formulación debe cumplir varios criterios tales como un cierto intervalo de tamaño de partículas inhalables, un cierto

intervalo de pH y un cierto grado de salinidad. Cuando el aerosol contiene un gran número de partículas con un diámetro promedio de la mediana de masa (DAMM) superior a 5 µm, éstas se depositan en las vías respiratorias superiores reduciendo la cantidad de antibiótico suministrado en el sitio de infección del espacio endobronquial de las vías respiratorias. De forma similar, las condiciones altamente ácidas y alcalinas, o hipotónicas o hipertónicas conducen a complicaciones respiratorias tales como broncoespasmos y tos, lo que evita la inhalación del fármaco.

Es, por tanto, un objeto principal de la presente invención proporcionar una formulación de aztreonam inhalable adecuada para la administración eficaz de aztreonam en el pulmón para el tratamiento de infecciones pulmonares gram negativas, especialmente las causadas por *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos, proporcionando una formulación segura, fisiológicamente aceptable y eficaz para inhalación de una sal de lisinato de aztreonam concentrada pura, formulación que contiene una concentración suficiente pero no excesiva de aproximadamente 75 mg/ml de lisinato de aztreonam, formulación que se puede administrar en aerosol eficazmente usando nebulizadores de inyección, ultrasónicos o de atomización, en un aerosol que tiene tamaños de partícula dentro de un intervalo de 1 a 5 µm o administrarse como un polvo seco, que sea tanto bien tolerado por pacientes con fibrosis quística como por pacientes con función pulmonar alterada debido a infecciones, inflamación u otra enfermedad subyacente. Es otro objeto de la presente invención proporcionar un proceso para la fabricación de lisinato de aztreonam α a partir de aztreonam α a gran escala.

El documento WO 03/035030 describe un kit para la preparación de una composición farmacéutica líquida.

El documento WO 02/051356 describe aztreonam inhalable para el tratamiento y la prevención de infecciones pulmonares bacterianas.

Resumen

La presente invención proporciona un proceso para la preparación de una formulación en polvo seco inhalable de lisinato de aztreonam que consiste en lisinato de aztreonam, proceso que comprende las etapas de:

- a) disolver la forma alfa de aztreonam en agua para formar una suspensión;
- b) valorar una solución acuosa de lisina para formar lisinato de aztreonam en solución; y
- c) secar el lisinato de aztreonam de la solución por liofilización o secado por pulverización; y donde el lisinato de aztreonam se muele, precipita, se seca por pulverización o se procesa de otro modo hasta obtenerse un tamaño de partícula de 1 a 5 micrómetros.

Se describe un método para el tratamiento de infecciones pulmonares causadas por bacterias gram negativas por inhalación de lisinato de aztreonam en aerosol.

También se describe un método para el tratamiento de infecciones pulmonares bacterianas causadas por bacterias gram negativas, comprendiendo dicho método la administración de un lisinato de aztreonam puro concentrado inhalable en forma de un polvo seco o de un aerosol que contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 mg de lisinato de aztreonam, siendo dicho lisinato de aztreonam administrado en forma de un polvo seco inhalable o disuelto en de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 ml de una solución administrable en aerosol de pH entre 4,5 y 7,5 que contiene del aproximadamente 0,1 al aproximadamente 0,9 % de cloruro u otro anión en el espacio endobronquial pulmonar de las vías respiratorias de un paciente en necesidad del mismo mediante nebulización en un aerosol que tiene un diámetro promedio de la mediana de masa de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 µm, una o varias veces al día, en general, hasta una dosis diaria de lisinato de aztreonam de 350 mg al día, pero en ningún caso, más de 750 mg al día.

Se describe un método para el tratamiento de infecciones pulmonares bacterianas causadas por *Escherichia coli*, especies de enterobacterias, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos usando una formulación inhalable de lisinato de aztreonam administrada por inhalación en el espacio endobronquial de las vías respiratorias en forma de un polvo seco o de un aerosol.

Se describe una formulación que comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 mg de lisinato de aztreonam en una solución salina diluida que varía de una décima parte a la mitad de una solución salina normal u otro disolvente acuoso que contenga cloruro u otro anión, donde dicha formulación tiene un pH de entre 5,5 y 7,0 y se administra en aerosol en aproximadamente 1-5 ml de solución, donde el aerosol tiene partículas de DAMM predominantemente de entre 1 y 5 µm, donde dicha formulación se nebuliza usando un nebulizador de inyección, de atomización, electrónico o ultrasónico.

Se describe una formulación en polvo seco que comprende de aproximadamente 1 a 200 mg de lisinato de aztreonam α, donde dicha formulación se liofiliza, se muele, se seca por pulverización o se hace precipitar en un

polvo fino que tiene partículas con DAMM de entre 1 y 5 μm usado para la inhalación del polvo seco administrado de una a cuatro veces al día sin superar los 750 mg diarios.

5 Se describe un proceso para la fabricación de una solución a granel o un lisinato de aztreonam α puro liofilizado que comprende aproximadamente 75 mg de aztreonam por 1 ml de disolvente.

10 El proceso de fabricación se puede usar para la preparación de lisinato de aztreonam α a partir de aztreonam α sin la necesidad de convertir el aztreonam α en aztreonam β , donde el lisinato de aztreonam α resultante tiene una mejor estabilidad, una mayor pureza y un mejor rendimiento.

Se describe un sistema de reconstitución de dos partes que comprende un lisinato de aztreonam α en forma de polvo seco o liofilizado y un diluyente almacenados por separado hasta su uso.

15 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un esquema que ilustra los parámetros de liofilización usados para la fabricación de un lisinato de aztreonam α liofilizado.

20 La Figura 2 es un gráfico que muestra el análisis de impurezas de soluciones a granel y liofilizados de aztreonam α preparados de acuerdo con el procedimiento de fabricación I en comparación con el ácido libre de aztreonam expresado como un ingrediente farmacéutico activo (IFA).

La Figura 3 es un gráfico que muestra el análisis de impurezas de soluciones a granel y liofilizados de aztreonam β preparados de acuerdo con el procedimiento de fabricación I en comparación con el ácido libre de aztreonam expresado como un ingrediente farmacéutico activo (IFA).

25 La Figura 4 es un gráfico que muestra el análisis de impurezas de soluciones a granel y liofilizados de aztreonam α preparados de acuerdo con el procedimiento de fabricación II en comparación con el ácido libre de aztreonam expresado como un ingrediente farmacéutico activo (IFA).

La Figura 5 es un gráfico que muestra el análisis de impurezas de soluciones a granel y liofilizados de aztreonam β preparados de acuerdo con el procedimiento de fabricación II en comparación con el ácido libre de aztreonam expresado como un ingrediente farmacéutico activo (IFA).

30 La Figura 6 es un gráfico que muestra el análisis de impurezas de soluciones a granel, liofilizados y liofilizados reconstituidos de aztreonam α preparados de acuerdo con el procedimiento de fabricación II en comparación con el ácido libre de aztreonam expresado como un ingrediente farmacéutico activo (IFA).

35 La Figura 7 muestra la actividad del lisinato de aztreonam contra *P. aeruginosa* en ausencia (Figura 1A) o presencia (Figura 1B) de mucina gástrica de cerdo. Se añadió lisinato de aztreonam hasta proporcionar una concentración final en los siguientes múltiplos de la CIM: 0,0 (\blacklozenge); 0,1 (\square); 1,0 (\blacksquare), y 10 (\diamond). Figura 1A, sin mucina añadida; Figura 1B, mucina al 10 % añadida.

40 La Figura 8 muestra la actividad del lisinato de aztreonam contra *P. aeruginosa* en presencia o ausencia de esputo con fibrosis quística (FQ). Se añadió lisinato de aztreonam hasta proporcionar una concentración final en los siguientes múltiplos de la CIM: 0,0 (\blacklozenge); 0,1 (\square); 1,0 (\blacksquare), y 10 (\diamond). Figura 2A, sin esputo añadido; Figura 2B, esputo al 1 % añadido.

La Figura 9 muestra la actividad de la tobramicina frente a *P. aeruginosa* en presencia o ausencia de mucina añadida. Se añadió tobramicina hasta proporcionar una concentración final en los siguientes múltiplos de la CIM: 0,0 (\blacklozenge); 1,0 (\square); y 10 (\blacksquare). Figura 3A, sin mucina añadida; Figura 3B, mucina al 10 % añadida.

45 Definiciones

Como se usan en la presente memoria:

“DAMM” significa diámetro promedio de la mediana de masa.

50 “Solución salina normal” significa solución en agua que contiene NaCl al 0,9 % (p/v).

“Solución salina diluida” significa solución salina normal que contiene NaCl al 0,9 % (p/v) diluido a su concentración menor, del aproximadamente 0,1 % al aproximadamente 0,8 %.

“Mitad de una solución salina normal” o “ $\frac{1}{2}$ SN” significa solución salina normal diluida hasta la mitad de su concentración que contiene NaCl al 0,45 % (p/v).

55 “Un cuarto de una solución salina normal” o “ $\frac{1}{4}$ SN” significa solución salina normal diluida hasta un cuarto de su concentración que contiene NaCl al 0,225 % (p/v).

“Un décimo de una solución salina normal” o “ $\frac{1}{10}$ SN” significa solución salina normal diluida hasta un décimo de su concentración que contiene NaCl al 0,09 % (p/v).

“FQ” significa fibrosis quística.

60 “Predominantemente” significa que incluye al menos el 70 %, pero preferentemente el 90 % de los tamaños de partícula de entre 1 y 5 μm .

“Solución fisiológicamente aceptable” significa una solución salina diluida hasta entre $\frac{1}{10}$ SN y 1 SN u otra solución acuosa que comprende cloruro de aproximadamente 31 a aproximadamente 154 nM o una concentración equivalente de bromo o yodo.

65 “Composición” significa formulación que contiene lisinato de aztreonam α o β que además contiene otros

componentes tales como excipientes, diluyentes, soluciones isotónicas, tampones, etc.

“Formulación” significa una composición específica formulada para un uso específico tal como para la administración en aerosol de solución que contiene lisinato de aztreonam α o β o la nebulización de polvo seco.

“Composición de lisinato de aztreonam”, “formulación de lisinato de aztreonam” o “lisinato de aztreonam” significa una composición o una formulación que comprende una cantidad indicada de sal de lisinato de aztreonam α o aztreonam β . Así pues, si, por ejemplo, la dosis del lisinato de aztreonam comprende una cantidad molar de la base libre de aztreonam, ésta contiene una cantidad molar múltiplo de 1,8 de lisina. Se entenderá que tanto el lisinato de aztreonam α como el lisinato de aztreonam β pretenden estar incluidos en la expresión “lisinato de aztreonam”, a menos que se designe específicamente bien como lisinato de aztreonam α o como lisinato de aztreonam β .

“Lisinato de aztreonam concentrado” significa lisinato de aztreonam α o β concentrado en una forma que permite la dilución de, o más de, 75 mg de aztreonam en 1 ml de diluyente.

“Forma alfa de aztreonam” o “aztreonam α ” significa una configuración estereoquímica alfa de aztreonam. La forma alfa de aztreonam se distingue de la forma beta, gamma y delta de aztreonam. Cada forma parece tener diferentes propiedades físicas y químicas tales como, por ejemplo, estabilidad, punto de cristalización y curva de difracción. Las diferencias entre estas dos formas se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 4.946.838. La sal de arginina de aztreonam alfa o beta se describen en la solicitud EP 0 297 580 B1. Las formas alfa, beta, gamma y delta de aztreonam y sus propiedades químicas y físicas se describen en la patente de EE.UU. N° 4826, 973.

“Composición de lisinato de aztreonam α ” o “formulación de lisinato de aztreonam α ” significa una composición o una formulación que comprende una cantidad indicada de sal de lisinato de aztreonam α . La composición de lisinato de aztreonam α generalmente puede comprender de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 300 mg de aztreonam α anhidro, y de aproximadamente 35 mg a aproximadamente 420 mg de monohidrato de lisina por un mililitro de agua para inyección.

“Liofilizado” significa un residuo seco de lisinato de aztreonam α obtenido mediante un proceso de liofilización a partir de una solución a granel de lisinato de aztreonam α .

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de que un lisinato de aztreonam inhalable formulado de forma específica, particularmente lisinato de aztreonam α , es eficaz para el tratamiento de infecciones pulmonares causadas por bacterias gram negativas.

Por consiguiente, en la presente memoria, se describe una composición inhalable y un método de tratamiento para infecciones pulmonares bacterianas causadas por *Escherichia coli*, especies de enterobacterias, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, incluyendo cepas resistentes a ampicilina y otras productoras de penicilinasas y especies de nitrobacterias, así como para el tratamiento de bacterias menos comunes, tales como *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos. El lisinato de aztreonam se administra en el espacio endobronquial de las vías respiratorias del paciente por inhalación de un polvo seco o una solución de aerosol.

El método de tratamiento de las infecciones pulmonares bacterianas es especialmente adecuado para el tratamiento de pacientes con fibrosis quística, bronquioectasis y pacientes con neumonía asistida por ventiladores. Sin embargo, también es útil para el tratamiento de otras afecciones que se complican por infecciones causadas por *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos u otras bacterias gram negativas.

Se describe una nueva composición de lisinato de aztreonam inhalable eficaz, segura, no irritante y fisiológicamente compatible adecuada para el tratamiento de infecciones pulmonares bacterianas causadas por bacterias gram negativas, particularmente las que son resistentes al tratamiento con otros antibióticos. La formulación inhalable de lisinato de aztreonam es adecuada tanto para el tratamiento como para la profilaxis de infecciones pulmonares crónicas y agudas. La formulación inhalable se suministra como un aerosol o como un polvo seco inhalable. Para la administración en aerosol, el lisinato de aztreonam se disuelve en un volumen mínimo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 ml de un disolvente acuoso que comprende ión cloruro, bromo o yodo, que tiene un pH de entre 4,5 y 7,5, se administra en el espacio endobronquial en un aerosol que tiene partículas de diámetro aerodinámico de la mediana de masa predominantemente de entre 1 y 5 μm usando un nebulizador capaz de aplicar en aerosol la solución de lisinato de aztreonam en partículas de los tamaños requeridos.

La presente invención se refiere al descubrimiento de que el lisinato de aztreonam derivado del aztreonam α , en comparación con el aztreonam β , tiene mejores propiedades y es más adecuado para la preparación de la sal de lisinato de aztreonam para el producto inhalable. El uso del aztreonam α para la preparación de lisinato de aztreonam proporciona ventajas demostrables en ambos procesos de fabricación y da lugar a un producto con mayor pureza y mejor estabilidad.

El proceso para la preparación de un lisinato de aztreonam α puro y estable presenta la novedad de que, hasta ahora, el aztreonam α se había descrito como un producto intermedio inestable que solo era adecuado para la preparación de un aztreonam β estable, siendo necesaria su conversión a aztreonam β para la preparación de arginina de aztreonam terapéuticamente útil.

5 Ahora se ha descubierto que el lisinato de aztreonam derivado de aztreonam α , en comparación con el aztreonam β , preparado de acuerdo con el proceso de la invención genera un producto más puro. El uso de aztreonam α para la preparación de lisinato de aztreonam α proporciona ventajas demostrables en los procesos de fabricación de un producto liofilizado o en polvo seco, y genera el producto con mayor pureza y mejor estabilidad.

10 I. Lisinato de aztreonam para inhalación

El aztreonam es un compuesto conocido con el nombre químico de ácido (Z)-2-[[[(2-amino-4-tiazolil)][(2S,3S)-2-metil-4-oxo-1-sulfo-3-azetidini]carbamoil]metilen]aminoxil]-2-metilpropiónico.

15 El aztreonam es un antibiótico sintético conocido con actividad antibacteriana contra la mayoría de bacterias gram negativas. El aztreonam es un monobactámico y, como tal, tiene un único núcleo de lactama beta monocíclico y, por lo tanto, es estructuralmente diferente de otros antibióticos de lactama β tales como, por ejemplo, penicilinas, cefalosporinas o cefamicinas. El sustituyente de ácido sulfónico en la posición 1 del anillo activa el resto de lactama beta. Una cadena lateral de oxima de aminotiazolil en la posición 3 y un grupo metilo en la posición 4 confieren el espectro antibacteriano específico y la estabilidad ante la beta-lactamasa.

20 El aztreonam es químicamente conocido y está disponible como formas alfa, beta, gamma y delta. La sal de arginina de aztreonam, conocida con el nombre comercial de AZACTAM® se obtiene de la forma beta. AZACTAM® (arginina de aztreonam para inyección, USP), disponible en el mercado en DURA Pharmaceuticals, Inc., San Diego, California, contiene sal de arginina de aztreonam como principio activo, y en la actualidad solo está aprobado por la FDA para uso intramuscular o intravenoso (PDR, p. 1159 (2001)).

30 A. Desventajas de la sal de arginina del aztreonam

Actualmente, el único aztreonam disponible en el mercado (AZACTAM®) comprende arginina, de la que se ha descubierto que causa inflamación pulmonar cuando se administra en forma de aerosol en los pulmones de los pacientes humanos. Cuando se usó como un potencial agente mucolítico en aerosol en pacientes con fibrosis quística, causó inflamación pulmonar, broncoespasmos e irritación. Un estudio descrito en "Pediatrics", 55: 96-100 (1975) identifica la arginina como sustrato para la producción de radicales de óxido nítrico, y recomienda que la arginina no se debería usar para la inhalación en los pacientes.

40 Los radicales de óxido nítrico reaccionan con el anión súper-óxido para formar peronitrilo, que es por sí mismo tóxico para el tejido y también puede seguir reaccionando, formando radicales hidroxilo tóxicos y altamente reactivos. Puesto que la inflamación es una alteración grave para la fibrosis quística y todas las demás enfermedades que la presente invención intenta tratar, el uso de sal de arginina no es adecuado, pues frustraría este propósito y empeoraría en lugar de mejorar las afecciones del paciente.

45 La arginina también es un sustrato importante para la lesión del complejo inmune en el pulmón, como se divulga en "PNAS", 14: 6338-6342 (1991). Puesto que la administración en aerosol concentra altos niveles del fármaco en aerosol en el pulmón en comparación con la dilución vista después de la administración intravenosa, la administración en aerosol de la sal de arginina de aztreonam sería un tratamiento perjudicial en lugar de ventajoso para los pacientes con fibrosis quística o los pacientes que padecen infecciones pulmonares. Además, diluiría y/o anularía el efecto del aztreonam.

50 Debido a su formulación como sal de arginina, la arginina de aztreonam no es adecuada ni está aprobada para un tratamiento de inhalación ni la administración en aerosol en Estados Unidos. Por consiguiente, no se conoce ninguna formulación que contenga aztreonam o lisinato de aztreonam disponible para la administración en aerosol en el espacio endobronquial de las vías respiratorias.

55 El único intento para administrar arginina de aztreonam de forma intermitente a sujetos con fibrosis quística se describe en "Spanish Annals on Pediatrics", 40: N° 3 (1994), donde tal administración se realizó en un ensayo abierto en pacientes con fibrosis quística con 500 y 1.000 mg de sal de arginina USP AZACTAM® administrada de forma intermitente, dos veces al día durante 21 días, usando nebulizador unitario CR60 System 22. El propósito de este estudio fue tratar organismos con *Pseudomonas aeruginosa* sensible al aztreonam, pero no *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos. No se intentaron tratar *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, infecciones causadas por *Alcaligenes xylosoxidans* ni otras bacterias gram negativas.

65 Basándose en estas observaciones, para proporcionar una forma inhalable segura de aztreonam, claramente, se necesita otra sal de aztreonam para el tratamiento de infecciones pulmonares por inhalación. Se descubrió que el

lisinato de aztreonam, particularmente, el lisinato de aztreonam derivado de aztreonam α , era farmacológicamente más aceptable para los propósitos de inhalación sin causar reacciones indeseables.

5 La sal de lisinato de aztreonam farmacéuticamente aceptable preferida se obtiene mediante la reacción de aztreonam α o β con lisina.

B. Lisinato de aztreonam α y β

10 Antes, una preparación de arginina de aztreonam y otras sales, pero no de lisinato, implicaba casi exclusivamente la forma β de aztreonam. Ya se había descubierto que la forma alfa de aztreonam es inestable y no se podía usar para la preparación de composiciones terapéuticas. Por otro lado, aztreonam β era considerada la forma estable, y si se usaba aztreonam α , siempre se tenía que convertir antes en aztreonam β .

15 La patente de EE.UU. N° 4.946.838 presenta pruebas concluyentes de que, hasta la fecha, aztreonam α es considerada una forma inestable de aztreonam que se debe convertir en aztreonam β antes de usarla para la preparación de cualquier producto terapéutico.

a. Estabilidad de aztreonam α y β

20 El aztreonam puede existir bien en formas amorfas y cristalinas anhidras o en formas cristalinas hidratadas y solvatadas. Las formas amorfas e hidratadas se convierten unas en otras en determinadas condiciones de temperatura y humedad, siendo ambas inestables. En estado sólido, las formas cristalinas anhidras y solvatadas muestran una buena estabilidad sin interconversión. Sin embargo, en presencia de excipientes que liberan humedad, la forma cristalina anhidra se descompone rápidamente en un grado dependiente del contenido de
25 humedad y de la temperatura.

La estabilidad del compuesto de aztreonam α o β se determina por su pérdida a diversas temperaturas. La técnica anterior apoya la creencia general de que aztreonam α es una forma inestable de aztreonam. De acuerdo con los
30 informes de la técnica anterior, tras una semana de almacenamiento, aztreonam α muestra aproximadamente el 1 % de pérdida a temperatura ambiente mientras que a 80 °C la pérdida alcanza el 80 %. Por el contrario, el aztreonam β , tras 12 meses de almacenamiento a temperatura entre -20 °C y 40 °C, tiene un aumento inferior al 2 % del nivel de impurezas y una disminución de solo un 3,0 al 3,5 % de la potencia. En base a estos resultados, el aztreonam β parecería ser un compuesto mejor y más estable.

35 Sin embargo, se encontró que el lisinato de aztreonam α preparado de acuerdo con el proceso de la invención contiene menos impurezas y tiene una mejor estabilidad, siendo por lo tanto un compuesto más puro y estable.

2. Pureza de aztreonam α y β

40 Para la preparación de productos inhalables, el principio activo debe ser relativamente puro o se debe purificar para eliminar las impurezas que causan o podrían causar broncoespasmo, inflamación, irritación o tos. Por consiguiente, el aztreonam para inhalación bien se debe preparar en una forma pura o se debe purificar.

45 El tipo y grado de impurezas de la formulación de inhalación son importantes y tienen un impacto específico en la estabilidad a largo plazo del fármaco y en el período de caducidad del producto final.

De acuerdo con la técnica anterior, la forma cristalina de aztreonam α se considera un intermediario inestable que se debe convertir en el aztreonam β estable. Tal conversión se consigue mediante la recristalización de aztreonam α en un disolvente orgánico, normalmente etanol, en un aztreonam β muy estable. Sin embargo, como consecuencia de
50 la etapa de recristalización, el aztreonam β recristalizado generalmente contiene entre 1-2 % de disolvente orgánico residual y otras impurezas. La presencia de estas impurezas convierte el aztreonam β en menos adecuado para la administración por inhalación.

55 Un proceso de recristalización para la preparación de aztreonam β a partir de aztreonam α utiliza etanol como disolvente. El uso de este proceso, sin embargo, conduce a entre 5.000-10.000 ppm de etanol residual que queda en el aztreonam β preparado. La FDA limita la presencia permitida de etanol a menos de 5.000 ppm. Por otra parte, con el tiempo, la presencia del etanol residual en aztreonam β conduce a la producción de etiléster, una impureza que no es deseable y que no está presente en el aztreonam α .

60 En el proceso de desarrollo de la presente invención, se encontró inesperadamente que para la preparación de una solución a granel o forma liofilizada de lisinato de aztreonam para administración en aerosol o nebulización, el aztreonam α , antes considerado inestable, era en realidad una forma preferida de un material de partida para la producción de lisinato de aztreonam. Cuando se comparó con el aztreonam β , se encontró que el lisinato de aztreonam α contiene menos impurezas. Además, el proceso para su preparación es más fácil, más rápido y no

requiere el uso de disolventes orgánicos que dejan impurezas residuales.

El lisinato de aztreonam α preparado de acuerdo con el proceso de la invención es un compuesto sustancialmente puro que no contiene ninguna cantidad sustancial de impurezas ni contaminantes.

5

3. Solubilidad de aztreonam α y β

Para la preparación de productos farmacéuticos inhalables, la solubilidad del principio activo, en este caso, del aztreonam, en agua o en disolventes acuoso es de importancia.

10

El aztreonam β es relativamente insoluble en agua, y precipita en una determinada materia y forma grumos cuando se mezcla con agua u otro disolvente acuoso durante una etapa de disolución del proceso de preparación de la sal de lisina. Tal precipitación y formación de grumos conducen a un aumento de las impurezas, al menos parcialmente causado por la apertura de un anillo nucleófilo de cadena abierta. En presencia de humedad y en diferentes condiciones de temperatura y humedad, la apertura del anillo nucleófilo de cadena abierta aumenta de manera impredecible, lo que resulta en una mayor inestabilidad del compuesto. Los datos de las pruebas demuestran que los niveles de impurezas iniciales generados por la reacción del aztreonam β con sal de lisina se encuentran en el intervalo del 1 % y cerca del nivel de impurezas permitido por la FDA.

15

Por otro lado, los niveles de impurezas del lisinato de aztreonam α generado mediante una reacción directa de aztreonam α con una sal de lisina son inferiores al 0,1 %.

20

El lisinato de aztreonam α preparado de acuerdo con el proceso de la invención es un compuesto puro fácilmente soluble en disolventes acuosos tales como solución salina o agua.

25

4. Comparación de las propiedades del aztreonam α y β

Se determinaron las propiedades del aztreonam α y β y su idoneidad para ser usados en un proceso de fabricación de una solución a granel, polvo seco o liofilizado de lisinato de aztreonam α y β para inhalación, haciéndose las siguientes observaciones.

30

Para la preparación de lisinato de aztreonam adecuado para su inhalación, es importante que un compuesto de partida, aztreonam α o β , se disuelva bien en agua y tenga un pH fisiológico manejable.

35

a. Aztreonam β

Cuando se estudió con respecto a los requisitos indicados anteriormente, durante la fabricación de soluciones a granel para la criodesecación y la liofilización, se descubrió que el aztreonam β no se puede suspender en agua a valores de pH intrínsecos, ya que comienza inmediatamente a polimerizarse y decolorarse. Independiente de la temperatura, el aztreonam β a concentraciones que varían de 50 a 150 mg/ml de agua gelifica en 15 minutos. Esto elimina la posibilidad de usar las reacciones mediante las cuales se añadiría una solución de lisina a aztreonam β . La otra única posibilidad para la preparación de lisinato de aztreonam β es, por lo tanto, añadir aztreonam β a la solución de lisina.

40

Un proceso de adición de aztreonam β a la solución de lisina requiere un tratamiento de la solución de aztreonam β con equipos de alto cizallamiento para lograr una rápida disolución de aztreonam β antes de su adición a la solución de lisina. En cualquier caso, el pH elevado (de aproximadamente 10) de la solución de lisina produce una formación significativamente mayor de cierta impureza, denominada en la presente memoria impureza B, en el aztreonam β en un breve período de tiempo.

45

50

Aunque el método anterior produjo la fabricación de sal de lisinato de aztreonam β con un nivel relativamente alto pero aceptable de impurezas, se encontró que el procedimiento para su preparación era factible, pero no demasiado práctico para la producción de lisinato de aztreonam β a escala comercial, pues implica una adición rápida de aztreonam β a la solución de lisina. Ambas soluciones, es decir, la solución de aztreonam β y la solución de lisina, se han de manejar de forma independiente con un equipo y un cuidado especial. La solución de aztreonam β requiere un mezclador de alto cizallamiento para la mezcla del aztreonam β y mantenerlo en la solución, así como un equipo de dosificación especial para su rápida adición a la solución de lisina.

55

b. Aztreonam α

60

Por otra parte, el aztreonam α se puede suspender fácilmente en agua para formar una suspensión homogénea que tenga un pH ácido que mejore su estabilidad. Por lo tanto, la formación de sales se puede llevar a cabo fácilmente mediante la adición de una solución de lisina a la suspensión de aztreonam α . Esta etapa permite el seguimiento del pH durante la formación de la sal, y la formulación se puede mantener fácilmente en un pH inferior a 6, es decir, en

un intervalo de pH que ofrezca una estabilidad adecuada del lisinato de aztreonam α . No hay necesidad de un mezclador de alto cizallamiento, de un equipo de dosificación ni de cualquier otro equipo.

c. Diferencias entre aztreonam α y β

5 La distinción importante entre aztreonam α y β es su solubilidad en agua. El aztreonam α es hidrosoluble a un pH ligeramente ácido, el aztreonam β no es hidrosoluble y no se puede disolver en los valores intrínsecos de pH.

10 El aztreonam β se polimeriza, forma grumos y se solidifica cuando se mezcla con agua sin la intervención de un equipo de mezcla de alto cizallamiento. El aztreonam α es fácilmente hidrosoluble y forma una suspensión.

Además, el aztreonam β se debe añadir a la solución de lisina mientras que la solución de lisina se puede añadir a la suspensión de aztreonam α .

15 Hace falta un equipo de mezclado y dosificación y un mezclado rápido para lograr la disolución del aztreonam β en agua y añadirla a la solución de lisina. No se necesita equipo para la disolución del aztreonam α en agua, pues el aztreonam α es fácilmente soluble a pH inferior a 6 y la solución de lisina se puede añadir ventajosamente al aztreonam α sin ningún cambio sustancial de pH.

20 d. Evaluación de las opciones de fabricación

Para evaluar las opciones de fabricación para la preparación de lisinato de aztreonam para inhalación, se usaron aztreonam α y aztreonam β como materiales de partida para la fabricación de soluciones a granel, polvo seco y liofilizados. Los procedimientos usados para la fabricación de las soluciones a granel representan las dos
25 posibilidades obvias: 1) adición de aztreonam α o β a una solución de lisina; y 2) adición de la solución de lisina a la solución de aztreonam β o a la suspensión α .

Los resultados analíticos descritos a continuación indican que la adición de una solución de lisina a la forma
30 cristalina de aztreonam α ofrece las opciones de un manejo más versátil para la fabricación a gran escala.

C. Desarrollo del proceso de fabricación para la preparación de lisinato de aztreonam

En cumplimiento del objetivo original para desarrollar un proceso viable y práctico para la fabricación a gran escala
35 de lisinato de aztreonam para inhalación, se investigaron tanto el lisinato de aztreonam α como el lisinato de aztreonam β .

1. Materiales

40 Todos los materiales usados se encuentran disponibles en el mercado. El aztreonam α se obtuvo en Butical SpA. El aztreonam β se obtuvo en Teva Corp., Israel. El monohidrato de lisina se adquirió en Merck KGaA. El agua se purificó mediante ósmosis inversa.

2. Métodos

45 Se usaron dos procesos de fabricación para el desarrollo y la optimización del proceso de fabricación para la preparación de una solución a granel y, en última instancia, para la preparación de un lisinato de aztreonam liofilizado.

Los dos procesos se identifican como un proceso de fabricación I, donde las cantidades apropiadas de aztreonam α
50 o β se añadieron a la solución de lisina, y un proceso de fabricación II, donde la solución de lisina se añadió al aztreonam α o β .

Previamente, se determinó que, para obtener un producto de aztreonam inhalable eficaz, la solución a granel
55 necesita contener aproximadamente 75 mg/ml de lisinato de aztreonam. Por consiguiente, se calcularon las cantidades necesarias de aztreonam, lisina y agua para alcanzar una concentración de aztreonam óptima de 75,0 mg/ml en la solución a granel y una proporción de aztreonam y lisina de 1,4:1. La solución a granel necesita tener un pH en torno a pH 4,8. Los tamaños de los lotes de las soluciones a granel preparadas para la prueba fueron de 200 ml.

60 Normalmente, la elaboración de la solución a granel y el proceso de formación de la sal se realizaron dentro de un matraz de vidrio de doble camisa con el fin de controlar la temperatura durante todo el proceso. Las soluciones a granel se elaboraron de acuerdo con los siguientes procedimientos.

3. Procesos de fabricación

a) Proceso de fabricación I

El proceso de fabricación I comprende cuatro etapas.

5 Etapa 1): se pesó una cantidad requerida de monohidrato de lisina y se disolvió en una cantidad apropiada de agua purificada generada por ósmosis inversa usando un agitador magnético y, posteriormente, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,22 μm a temperatura ambiente ($20\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$).

10 Etapa 2): tras completarse la disolución del monohidrato de lisina, se llevó la solución de lisina a la temperatura de 2-8 $^\circ\text{C}$ usando el enfriador refrigerado conectado al matraz de vidrio de doble camisa. La temperatura se controló con una sonda de temperatura en la solución.

15 Etapa 3): se añadió una cantidad necesaria de aztreonam α o β para alcanzar la concentración de 75 mg/ml a la solución de lisina bajo agitación constante y mezclando. El mezclado se llevó a cabo mediante un agitador magnético en combinación con un Ultra Turrax (11.000 rpm, 30 segundos). Los experimentos preliminares habían demostrado que para el aztreonam β , el uso de solo un agitador magnético conduce a resultados insatisfactorios. Esto se debe al hecho de que la baja intensidad de mezclado del agitador magnético no puede evitar que las partículas de aztreonam β se adhieran a las paredes del matraz o formen aglomerados.

20 Etapa 4): tras la adición de aztreonam α o β , se continuó el mezclado hasta que se produjo la disolución total (solución amarillenta libre de materia particulada). Durante la conversión de la sal, se controlaron de manera constante la temperatura y el pH de la formulación.

b) Proceso de fabricación II

El proceso de fabricación II comprende tres etapas.

25 Etapa 1): se usa el 50 % de la cantidad calculada de agua purificada a 2-8 $^\circ\text{C}$ para formar una suspensión con aztreonam α o β usando un agitador magnético.

30 Etapa 2): se disuelve la cantidad necesaria de monohidrato de lisina en el agua restante que tiene la misma temperatura que la suspensión de aztreonam y se añadió lentamente a la suspensión con agitación constante. La velocidad de adición fue tal que el pH se mantuvo por debajo de pH 6 durante la conversión de la sal.

Etapa 3): se continuó la agitación hasta que se produjo una disolución total del aztreonam. La disolución total del aztreonam fue identificada por una solución amarilla libre de materia particulada.

c) Mediciones de pH y temperatura

35 Dado que los valores de pH del aztreonam α y β disueltos en agua son diferentes, se hizo un seguimiento del pH y de la temperatura durante la evaluación de ambos procesos.

40 Los valores de temperatura y pH de las soluciones de ensayo se evaluaron con un peachímetro electrónico dotado de un electrodo de vidrio. Antes de cada serie de mediciones, se calibró el peachímetro usando patrones apropiados con valores de pH de 4,0 y 10,0. Las mediciones se llevaron a cabo a la temperatura seleccionada para cada experimento dado. Durante la formación de la sal, se registraron automáticamente el pH y la temperatura de la masa cada 5 segundos.

45 Las soluciones a granel de lisinato de aztreonam α o β se fabricaron a diferentes temperaturas que varían de 2 $^\circ\text{C}$ a 20 $^\circ\text{C}$ con el fin de determinar la dependencia de la temperatura del pH de una solución de lisinato de aztreonam α de 75 mg/ml.

d) Liofilización

50 Se liofilizaron las soluciones a granel de aztreonam α y β preparadas de acuerdo con el proceso de fabricación I o II y se determinó un grado de impurezas en cada solución a granel y liofilizado. Con este fin, se dispensaron alícuotas un ml de las soluciones a granel en viales de liofilización de vidrio (1,0 ml de solución a granel por vial) y se liofilizaron de acuerdo con las siguientes condiciones.

55 Se preenfriaron los estantes del liofilizador hasta 0 $^\circ\text{C}$ antes de comenzar las operaciones para permitir una rápida congelación de la solución a granel en los viales. Se colocaron los viales de liofilización que contienen la solución a granel en los estantes del liofilizador previamente enfriados. A continuación, se enfrió el interior del liofilizador hasta -38 $^\circ\text{C}$, temperatura a la que se congelaron las muestras de las soluciones a granel en viales, se mantuvo la temperatura del liofilizador a -38 $^\circ\text{C}$ y se ajustó el vacío a 0,008 kPa (0,08 mbar) a velocidad constante en 3 horas. A continuación, se elevó la temperatura del liofilizador hasta -25 $^\circ\text{C}$ en 15 minutos y se mantuvo durante aproximadamente 11 horas. Luego se ajustó el vacío hasta 0,0047 kPa (0,047 mbar). Se aumentó la temperatura hasta +5 $^\circ\text{C}$ en 3 horas y se mantuvo durante 12 horas. Tras 12 horas a +5 $^\circ\text{C}$, se retiró al vacío, se cerraron los viales y se plisaron. Los parámetros del proceso se representan en la Figura 1, que muestra el progreso en el tiempo, la temperatura de los estantes y la presión de vacío usados para la liofilización.

65

e. Análisis de las impurezas

Los perfiles de impurezas de las soluciones a granel y los liofilizados fabricados se determinaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

5 La HPLC se llevó a cabo usando la fase móvil A y B. La fase móvil A comprendía tampón de formiato de amonio (pH 3,0) y metanol (94:6). La fase móvil B comprendía tampón de formiato de amonio (pH 3,0) y metanol en la proporción de 55:45. Las sustancias de referencia usadas como patrón para la detección de impurezas fueron aztreonam; aztreonam de anillo abierto; isómero *E* de aztreonam; ácido (*Z*)-2-(aminotiazol-4-il)-2-(*t*-butoxicarbonil)isopropacimin-acético (ATBA); 2-mercapto-benzotiazol (MBTA) y *t*-butil-aztreonam (*t*-butil-ATR). Los patrones se prepararon como soluciones madre de impurezas y se procesaron en paralelo con la muestra de lisinato de aztreonam.

15 Las condiciones de HPLC fueron: columna de 150 x 3 mm (4 µm); temperatura de la columna 30 °C; temperatura de la muestra 10 °C; caudal de 0,6 ml/min; volumen de inyección de 40 µl; longitud de onda de detección: 270 nm y tiempo de ejecución: 40 minutos.

20 Tanto las soluciones a granel como las muestras liofilizadas de aztreonam que contenían diferentes concentraciones de aztreonam o lisinato de aztreonam se examinaron en busca de la presencia de impurezas.

Las impurezas y los productos de degradación de aztreonam α y β se separaron mediante RP-HPLC y se detectaron mediante detección UV a 270 nm. La cuantificación se llevó a cabo y se expresó como % de superficie de todos los picos integrados superior al 0,1 %.

25 Los perfiles de impurezas de los lisinatos de aztreonam α y β en una forma gráfica se muestran en las Figuras 2-5.

4. 4. Evaluación de los dos procesos de fabricación

30 Se evaluaron las dos formas de aztreonam mediante los dos procesos de fabricación para su conversión en la sal de lisinato y el efecto del proceso seleccionado en los niveles de pureza y estabilidad.

a. Conversión en la sal

35 La conversión de aztreonam α y β en su sal de lisina, como se ha descrito anteriormente, depende de la forma de partida del aztreonam, así como del proceso de fabricación usado.

40 El aztreonam α se encontró compatible con ambos procesos de fabricación. Esto se debía al hecho de que el aztreonam α se puede suspender en agua sin que se solidifique, un problema observado con el aztreonam β . Debido a que el aztreonam β solidifica casi inmediatamente después de añadirlo a agua, la conversión en la sal tras la adición de solución de lisina llevó más tiempo y se observó un grado de degradación del aztreonam β relativamente alto. La Tabla 1 resume los hallazgos relativos a la etapa de conversión en la sal.

Tabla 1

Conversión en la sal		
	Proceso de fabricación I	Proceso de fabricación II
Lisinato de aztreonam α	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aparición poco habitual durante la conversión en la sal • Solución amarillenta ligeramente opalescente 	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aparición poco habitual durante la conversión en la sal • Solución amarillenta ligeramente opalescente

45

<u>Conversión en la sal</u>		
	Proceso de fabricación I	Proceso de fabricación II
Lisinato de aztreonam β	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aparición poco habitual durante la conversión en la sal • Solución amarillenta transparente 	<ul style="list-style-type: none"> • Suspensión de ATR parcialmente solidificada (en 30 s) antes de la adición de la lisina. Por lo tanto, conversión lenta en la sal tras la adición de la solución de lisina • Solución rosada transparente

ATR se usa como abreviatura de aztreonam.

- 5 Los resultados muestran que cuando se usa aztreonam α , se puede usar el proceso de fabricación II más sencillo para la producción de sal de lisina sin ningún tipo de consecuencias. Cuando el aztreonam de partida es aztreonam β , es necesario usar el proceso de fabricación I para la conversión en la sal. Cuando se usa para la preparación de lisinato de aztreonam β , el proceso II genera lisinato de aztreonam inestable e impuro. Por otro lado, el proceso I requiere un equipo más complejo y costoso y, debido a la presencia de impurezas, también requiere una labor de validación más extensa, especialmente cuando el lisinato de aztreonam se prepara en una producción a gran escala.

10 b. Contenido de aztreonam en las soluciones a granel

- 15 En la Tabla 2, se resumen el contenido de aztreonam encontrado en las soluciones a granel fabricadas mediante los procesos I y II con la concentración de partida de aztreonam de 75,0 mg/ml, inmediatamente después de su fabricación.

Tabla 2

<u>Contenido de aztreonam en las soluciones a granel</u>		
	Contenido de aztreonam (mg/ml)	
	Proceso de fabricación a granel I	Proceso de fabricación a granel II
Lisinato de aztreonam α	74,7	74,7
Lisinato de aztreonam β	74,0	62,9

- 20 El contenido de aztreonam es la media de 2 inyecciones por solución.

- 25 Como se ve en la Tabla 2, solo se observa una pequeña pérdida en ambas formas de aztreonam cuando se usa el proceso I. Cuando se usa el proceso II, hay la misma cantidad de aztreonam α presente en la solución a granel que en la solución a granel preparada mediante el proceso I. Sin embargo, los resultados observados en la Tabla 2 indican que hay una degradación significativa del aztreonam β cuando se sigue el proceso de fabricación II. Esto se debe al menos en parte a la solidificación del aztreonam β observada durante el proceso de fabricación II, donde tras la disolución en agua, la superficie total de aztreonam β se reduce y la conversión en la sal y la disolución es más lenta en comparación con el aztreonam α en las mismas condiciones. Se producen reacciones de degradación del aztreonam β que dependen del pH. Este fenómeno no se observa con el aztreonam α que, como se ha señalado anteriormente, se disuelve fácilmente en agua a pH inferior a pH 6,0. Como se ha descrito anteriormente, el aztreonam α disuelto en agua forma una suspensión homogénea que tiene una gran superficie.

35 c. Liofilización

- Las condiciones de liofilización usadas para la preparación de aztreonam α y aztreonam β liofilizados fueron adecuadas para ambas formas de aztreonam.

- 40 No se observaron diferencias significativas entre las dos formas de aztreonam durante las operaciones de criodesecación. Todos los residuos criodesecados parecían homogéneos sin observarse ninguna zona húmeda, encogida o sinterizada en la parte inferior de los viales de liofilización. Además, no se encontraron partículas de aztreonam en la pared del vial, lo que indica que se usaron la temperatura, la presión y las tasas de incremento adecuadas durante la criodesecación. La velocidad de disolución para ambos aztreonam liofilizados fueron muy buenas con una reconstitución de ambos residuos criodesecados producida en menos de 1 segundo tras la adición de disolvente (0,17 % de solución salina/1,0 ml).

45 El ciclo de criodesecación seleccionado conduce a liofilizados con contenidos de agua generalmente bajos de entre el 0,3-0,5 %. Como se pudo elevar el contenido de agua del lisinato de aztreonam criodesecado final hasta

aproximadamente el 2,0 % sin problemas de estabilidad, la duración del ciclo se pudo acortar aún más hasta aproximadamente 30 horas.

La Tabla 3 resume los contenidos de agua de los dos liofilizados.

5

Tabla 3

<u>Contenido de agua de los liofilizados</u>		
	Contenido de agua de los liofilizados (%)	
	Proceso de fabricación a granel I	Proceso de fabricación a granel II
Liofilizados de lisinato de aztreonam α	0,5 %	0,4 %
Liofilizados de lisinato de aztreonam β	0,3 %	0,3 %

El contenido de agua de los liofilizados es la media de 3 viales por lote.

10

El contenido de agua de ambos liofilizados de lisinato de aztreonam está muy por debajo del nivel aceptable de agua (2,0 %) que podría afectar a la estabilidad del lisinato de aztreonam.

El contenido de aztreonam de los viales de liofilización tras la liofilización de las dos formas de lisinatos de aztreonam preparadas mediante los procedimientos I y II se resume en la Tabla 4.

15

Tabla 4

<u>Contenido de aztreonam por vial tras la liofilización</u>		
	Contenido de aztreonam/vial (mg)	
	Proceso de fabricación a granel I	Proceso de fabricación a granel II
Liofilizados de lisinato de aztreonam α	73,8	74,0
Liofilizados de lisinato de aztreonam β	73,1	60,9

El contenido de aztreonam es la media de 3 viales.

20

Como era de esperar a partir de los resultados de la solución a granel observados en la Tabla 2, los liofilizados de aztreonam β tras el proceso de fabricación II contienen mucho menos de 75,0 mg de aztreonam. Hay una pérdida significativa del aproximadamente 12 % de aztreonam β durante el proceso de fabricación II. Los resultados obtenidos mediante el proceso de liofilización indican que no hay una pérdida significativa de ninguno de los aztreonam durante la operación de criodesecación. La pequeña disminución de la cantidad de los aztreonam observada en la Tabla 4 en comparación con las cantidades observadas en la Tabla 2 se atribuye a las operaciones de dispensación y a la reconstitución de las tortas antes del análisis. Por lo tanto, el ciclo de liofilización y sus tasas de incremento se pueden considerar válidos para la combinación de solución a granel/vial.

25

30

d. Análisis de impurezas totales de aztreonam α y β

Los análisis de impurezas totales de las dos formas de aztreonam se muestran en las Figuras 2-5 y en la Tabla 5.

35

La Figura 2 muestra el análisis de impurezas de las soluciones a granel y los liofilizados de lisinato de aztreonam α fabricados mediante el proceso de fabricación I en comparación con el ingrediente farmacéutico activo (IFA) aztreonam. Como se ve en la última columna de la figura 2, las impurezas totales observadas en el lisinato de aztreonam α del IFA fueron del 0,280 %, en la solución a granel fueron del 0,332 %, alcanzando las impurezas totales de los liofilizados el 0,436 % de la superficie.

40

La Figura 3 muestra el análisis de impurezas de la solución a granel y los liofilizados de lisinato de aztreonam β fabricados mediante el proceso de fabricación I en comparación con el IFA. Como se ve en la última columna de la figura 3, las impurezas totales del IFA fueron del 0,370 %, en la solución a granel de aztreonam β fueron del 0,295 %, y las impurezas encontradas los liofilizados fueron del 0,457 % de la superficie.

45

Los niveles de impurezas observados en el aztreonam α y β fueron aproximadamente iguales para ambas formas de aztreonam.

La Figura 4 muestra el análisis de impurezas de las soluciones a granel y los liofilizados de aztreonam α preparados mediante el proceso de fabricación II. Como se ve en la Figura 4, las impurezas totales presentes en el IFA fueron del 0,280 %, en la solución a granel fueron del 0,328 % de la superficie y las impurezas totales en los liofilizados fueron del 0,471 % de la superficie.

5 La Figura 5 muestra el análisis de la solución a granel y los liofilizados de aztreonam β en comparación con el IFA preparado mediante el proceso de fabricación II. Como se ve en la Figura 5, las impurezas detectadas en el IFA fueron del 0,370 %, que corresponde aproximadamente a los niveles detectados en las Figuras 2, 3 y 4.. Los niveles de impurezas detectados en las soluciones a granel y los liofilizados de aztreonam β fueron sumamente elevados.
10 Tanto la solución a granel como el liofilizado de aztreonam β producidos mediante el proceso de fabricación II contenían el 15,812 % de superficie en la solución a granel y el 15,867 % de la superficie en los liofilizados.

En comparación con las impurezas totales observadas en la solución a granel y el liofilizado de aztreonam α , los niveles de impurezas del aztreonam β fueron casi 34 veces mayores en los liofilizados y 48 veces mayores en las
15 soluciones a granel.

La Tabla 5 resume los datos obtenidos para los niveles de impurezas presentes en las soluciones a granel y los liofilizados para el lisinato de aztreonam α y β .

20 Tabla 5

<u>Impurezas totales</u>				
	Soluciones a granel		Liofilizados	
	Lisinato de aztreonam α	Lisinato de aztreonam β	Lisinato de aztreonam α	Lisinato de aztreonam β
Proceso de fabricación I	0,332 %	0,295 %	0,436 %	0,457 %
Proceso de fabricación II	0,328 %	15,912 %	0,471 %	15,867 %

Las impurezas se expresan como un porcentaje de la superficie.

25 Cuando se usa aztreonam α como ingrediente farmacéutico activo (IFA), no se pueden encontrar diferencias significativas entre los procesos de fabricación I y II. Las soluciones a granel tienen un nivel de impurezas del aproximadamente 0,33 % de la superficie, lo que representa un aumento del aproximadamente 0,04-0,05 % frente al IFA. Los liofilizados tienen impurezas totales del aproximadamente 0,45 % de la superficie, lo que representa un
30 aumento del aproximadamente 0,08-0,12 % frente al IFA. Es importante destacar que las impurezas más simples encontradas tras la fabricación de lisinato de aztreonam α usando los procesos de fabricación I y II descritos están por debajo del nivel del 0,1 % y, por tanto, ambos procesos se pueden usar convenientemente para la fabricación de lisinato de aztreonam α . Cuando se usa el límite del 0,1 % publicado por la FDA, las soluciones a granel y los liofilizados de aztreonam α tendrían niveles de impurezas de solo el 0,1 %. Esto es significativamente inferior a los
35 niveles de impurezas que se encuentran en AZACTAM® (arginina de aztreonam disponible en el mercado), que contiene el 1,6 % de impurezas totales.

El lisinato de aztreonam β se puede fabricar satisfactoriamente a partir de aztreonam β de acuerdo con el proceso de fabricación I, donde las impurezas totales de la solución a granel son del aproximadamente 0,3 % y del aproximadamente 0,45 % en los liofilizados. Esto representa un aumento del aproximadamente 0,1 % frente al IFA.
40 Sin embargo, cuando se usa el proceso de fabricación II para la preparación de aztreonam β , el nivel de impurezas en la solución a granel es del aproximadamente 15,8 %. Tras la liofilización, el nivel de impurezas se mantiene sin cambios. El análisis del perfil de impurezas muestra que el alto nivel de impurezas del aztreonam β se debe principalmente a la generación de la impureza B y una segunda impureza desconocida, ambas generadas durante el proceso de conversión en la sal de lisinato de aztreonam β . El resto de las demás impurezas que se encuentran
45 normalmente en las soluciones a granel y los liofilizados de aztreonam β también siguen siendo inferiores al 0,1 %.

Estos resultados indican que el proceso de fabricación II no es el proceso más adecuado para la preparación del lisinato de aztreonam β . Este no solo conduce al gran aumento de impurezas, sino que también requiere un procedimiento de fabricación dedicado y el costoso equipo para la producción de la solución a granel. Sin embargo,
50 cuando se desea el lisinato de aztreonam β , el proceso de fabricación I es muy adecuado para preparar el producto con un grado aceptable de impurezas.

Como se ve a partir de estos resultados, el aztreonam α ofrece una gran ventaja para la fabricación del lisinato de aztreonam α frente al lisinato de aztreonam β . El aztreonam α se puede suspender fácilmente en agua, formando una suspensión homogénea y sin necesidad de ningún equipo especial que permita la adición de una solución de lisina al aztreonam α .

5 Por lo tanto, se pueden fabricar soluciones a granel y liofilizadas para el lisinato de aztreonam α que contengan aproximadamente 75 mg/ml de una manera sencilla, práctica, rápida, fácil y barata.

10 D. Ventajas del lisinato de aztreonam α

Dado que el aztreonam que contiene arginina no es adecuado para la inhalación, se prepararon y analizaron otras sales de adición de ácido. Se encontró que el lisinato de aztreonam, particularmente el lisinato de aztreonam derivado de la forma de aztreonam α , era farmacológicamente más seguro, aceptable y eficaz para los propósitos de inhalación cuando se administra por nebulización en forma de un polvo seco o liofilizados en aerosol en cantidades de aproximadamente 75 mg/ml.

El proceso de la técnica anterior en el que se usaban aztreonam α y β implicaba la conversión del aztreonam α en aztreonam β . Con el fin de producir el lisinato de aztreonam como un producto final, tal etapa de conversión, si se usa para la producción de lisinato de aztreonam a granel o liofilizado, implica necesariamente la reacción de aztreonam β que es relativamente insoluble en agua y que tiene un pH de aproximadamente pH 2,3, con la sal de lisina que tiene un pH de aproximadamente pH 10. La adición del componente de sal de lisina a aztreonam β crea un intercambio iónico excesivo durante la valoración del ácido de aztreonam a un pH fisiológicamente aceptable. Además, esta reacción da como resultado una reacción secundaria no deseada con la formación de la cadena abierta del anillo de lactama β en aztreonam, conduciendo además a que el lisinato de aztreonam β tenga un mayor grado de impurezas, inestabilidad y una osmolalidad indeseablemente elevada.

La alta osmolalidad no es deseable para el aztreonam inhalable. La formulación de aztreonam inhalable requiere un grado y un intervalo de osmolalidad muy específicos debido a que la alta osmolalidad de la formulación inhalable puede hacer que un paciente reaccione a la inhalación con broncoespasmo o tos.

En la presente invención, la sal de lisinato de aztreonam farmacéuticamente aceptable preferida se obtiene de una reacción directa del aztreonam α con lisina sin necesidad de convertir primero el aztreonam α en aztreonam β .

La producción de lisinato de aztreonam α obtenido de la forma de aztreonam α sin convertir el aztreonam α en aztreonam β es un nuevo proceso no divulgado ni sugerido por ninguna técnica.

El proceso divulgado actualmente para la fabricación de lisinato de aztreonam α en solución a granel o liofilizado para la inhalación se basa en el hallazgo de que el aztreonam α , cuando se disuelve en agua y se agita, forma de inmediato una emulsión o suspensión suave. Cuando se valora una solución de sal de lisina en la suspensión, se produce la rápida formación de una sal de lisina de aztreonam α amorfa. Esta sal tiene características de estabilidad similares al lisinato de aztreonam β liofilizado, sin embargo, sin un aumento perjudicial de las impurezas observadas durante la producción de un lisinato de aztreonam β . La reacción con la lisina, la liofilización y el secado del lisinato de aztreonam α no causa la apertura del anillo nucleófilo y, por lo tanto, los niveles de impurezas iniciales generados a partir de la forma alfa son inferiores al 0,1 %, sustancialmente inferiores al límite establecido por la FDA para el nivel permitido de impurezas.

Por lo tanto, mediante el uso de aztreonam α directamente para la formación de lisinato de aztreonam α , el producto obtenido contiene niveles de impurezas iniciales mucho más bajos, tiene una estabilidad superior y, con el tiempo, muestra una menor degradación, lo que conduce a un producto con un período de caducidad más largo.

En el presente proceso para la preparación de lisinato de aztreonam α a partir de aztreonam α , los volúmenes básicos de conversión en sal, la proporción de los componentes individuales y el pH de la mezcla de reacción se valoran hasta un nivel fijo. El proceso de valoración confirma que quedan menos de 100 ppm de etanol residual en el lisinato de aztreonam α usando el proceso de fabricación II en comparación con la fabricación de lisinato de aztreonam β , donde, en el mismo volumen de reacción, se detectaron niveles de etanol residual de hasta 10.000 ppm. Estos niveles son aproximadamente 100 veces superiores a los observados durante la preparación de lisinato de aztreonam α . Por otra parte, con el uso de la aztreonam α , se elimina la formación de etiléster, otra impureza detectada en las formas de aztreonam β .

En cuanto a la estabilidad de las dos formulaciones, las condiciones de estabilidad acelerada muestran que el aztreonam β se degrada desde la cadena abierta inicial del 0,9 % hasta más del 2 % a los 30 días, mientras que el aztreonam α se degrada desde un 0,06 % inicial hasta solo el 1,2 % en 90 días en las mismas condiciones de ensayo.

Por consiguiente, el uso de aztreonam α y la preparación del lisinato de aztreonam α mediante el proceso de fabricación II genera un producto más estable con un mejor perfil de pH, un menor contenido de impurezas, una estabilidad más larga y una osmolalidad deseablemente reducida.

5 E. Proceso para la fabricación de lisinato de aztreonam α

Se desarrollaron posibles tres técnicas para proporcionar el lisinato de aztreonam α derivado del aztreonam α . La primera técnica implica la valoración de sal de lisina en el aztreonam α . La segunda técnica implica el secado al vacío de la materia prima de aztreonam α en el punto final de la síntesis cuando el aztreonam se combina con lisina en un liofilizador. En la tercera técnica, se produce lisinato de aztreonam α directamente. La tercera técnica implica el secado por pulverización del aztreonam α y la lisina en un sólido a granel, produciendo el lisinato de aztreonam como el producto final. Todas estas técnicas evitan la conversión del aztreonam α en el aztreonam β .

El proceso actual preferido para la preparación del lisinato de aztreonam derivado de aztreonam α comprende la disolución del aztreonam α en agua y la posterior valoración de una solución acuosa de lisina en el aztreonam α para formar la sal de lisina. A continuación, la mezcla se liofiliza o se seca por pulverización.

El proceso actual evita la escisión del anillo de lactama β empleando ventajosamente una valoración para lograr un perfil de pH deseable del lisinato de aztreonam α , lo cual es contrario a las técnicas usadas para la preparación de la sal de lisina de aztreonam β . En cualquiera de las técnicas divulgadas en la presente memoria para la preparación de lisinato de aztreonam α derivado del aztreonam α , se evita la conversión del aztreonam β , así como todos los problemas relacionados con la producción del lisinato de aztreonam β derivado del aztreonam β .

25 e. Proceso de fabricación de lisinato de aztreonam α

El proceso de fabricación para la preparación de soluciones a granel de lisinato de aztreonam α que comprenden aproximadamente 75 mg de aztreonam α por cada ml de agua o de otro disolvente acuoso se basa esencialmente en el proceso de fabricación II descrito anteriormente. El proceso implica la reacción de los componentes enumerados a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6

Componentes	mg por unidad de 1 ml
Aztreonam α	75 mg
Monohidrato de lisina	52,5 mg
Agua para inyección de hasta 1 ml	
Nitronen	cs

Para la preparación de un litro de lisinato de aztreonam α , se disuelven 75 gramos del aztreonam α y 52,5 gramos de monohidrato de lisina en un litro de agua para inyección. Para una preparación a gran escala de lisinato de aztreonam α , estas cantidades se multiplican adecuadamente.

En concreto, las etapas del proceso para la preparación de la solución a granel son las siguientes. Se añaden aproximadamente 400 ml de agua para inyección (API) a un recipiente de mezcla, se enfría el recipiente de mezcla hasta una temperatura entre 2 y 8 °C, y se añaden 52,5 gramos de monohidrato de lisina al agua. Se mantiene la temperatura a entre 2 y 8 °C. Luego se agita la mezcla hasta que se vuelve transparente. Se lleva la solución a un volumen de 500 ml con agua para inyección.

Por separado, se añaden 400 ml de agua para inyección al segundo recipiente de mezcla y se enfría hasta de 2 a 8 °C, y se suspenden 75 gramos de aztreonam α anhidro en el agua enfriada bajo una rápida agitación y enfriamiento para mantener la temperatura por debajo de 10 °C. La cantidad real de aztreonam α , que generalmente puede contener hasta 15 % de humedad, se ajusta de manera que corresponda a 75 gramos de aztreonam α anhidro. A continuación, se valora la cantidad calculada de la solución de lisina durante un período relativamente corto de tiempo de entre aproximadamente 1 y 15 minutos, preferentemente en aproximadamente 6 minutos, en la suspensión de aztreonam mientras se mantiene la temperatura constante por debajo de 10 °C y el pH igual o inferior a 6,0. Se mide y se ajusta el pH de la solución, si es necesario, con una solución de monohidrato de lisina hasta un pH final de $4,8 \pm 0,5$. Se lleva la solución hasta un volumen con agua para inyección y se mezcla hasta que se aclara. El volumen final de tanto la solución de lisina como de la solución de aztreonam α , combinadas, debe ser de un litro.

Tras verificar que los resultados de pH y del ensayo están dentro de lo especificado, se filtra la solución por medio de una bomba peristáltica a través de un prefiltro, preferentemente un prefiltro de 0,45 μm , y a través de dos filtros adicionales, preferentemente de tamaño del aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 μm , preferentemente un filtro de cartucho hidrófilo Millidisk 40 de 0,22 μm , en el recipiente receptor que se mantiene bajo un flujo de

nitrógeno filtrado (0,22 µm). Tras la filtración, se prueba la integridad del filtro final (0,22 µm). El recipiente receptor se mantiene a una temperatura inferior a 10 °C. Se analiza la cantidad de lisinato de aztreonam α, la contaminación, la densidad y el aspecto de las muestras tras la filtración.

5 El aspecto visual de la solución a granel de lisinato de aztreonam α resultó ser el de una solución amarillenta libre de materia particulada. El pH de la solución a granel fue de 4,82. La viscosidad, la tensión superficial y la osmolalidad fueron 1,55 mPas, 67,11 mN/m y 410 mOsmol/kg, respectivamente. Las impurezas totales fueron del 0,328 %.

10 Se carga la solución filtrada en viales de vidrio ámbar con un volumen de llenado 1 ml ± 10 %. Se comprueba el volumen de llenado cada 15 minutos. Los viales están dotados de tapones que quedan abiertos y se colocan en el liofilizador.

La liofilización se realiza de acuerdo con las condiciones de liofilización ilustrativas en tres etapas resumidas en la Tabla 7.

15

Tabla 7

<u>Condiciones de liofilización</u>		
Etapa	Procedimiento	Proceso de liofilización
1	Congelación del producto	Condiciones de congelación: Estantes enfriados: < -46 °C El producto se congela a -10 °C ± 3 °C sin vacío y se mantiene durante dos horas
2	Secado primario	Condiciones de secado: 1 hora: -40 °C ± 3 °C y a ≤ 80 microbar (0,008 kPa) Al menos 15 horas: -25 °C ± 3 °C y a ≤ 80 microbar (0,008 kPa) Temperatura en ascenso hasta 25 °C ± 3 °C con un gradiente de 10 °C/hora
3	Secado secundario	Condiciones de secado: Al menos 10 horas: 25 °C ± 3 °C y ≤ 80 microbar (0,008 kPa) y hasta que el producto alcanza 25 °C ± 3 °C. El vacío se rompe con nitrógeno estéril.

20 Como alternativa, el ciclo de liofilización se puede realizar en condiciones diferentes tales como, por ejemplo, las condiciones enumeradas en la Tabla 8.

Tabla 8

<u>Condiciones de liofilización</u>		
Etapa	Procedimiento	Proceso de liofilización
1	Congelación del producto	Condiciones de congelación: Estantes enfriados: -38 °C El producto se congela a -35 °C ± 3 °C sin vacío y se mantiene durante cuatro horas
2	Secado primario	Condiciones de secado: El vacío comenzó a ≤ 80 microbar (0,008 kPa) La temperatura descendió hasta -25 °C ± 3 °C y se mantuvo durante 8 horas a ≤ 80 microbar (0,008 kPa)
3	Secado secundario	Condiciones de secado: Se ajusta el vacío hasta ≤ 47 microbar (0,0047 kPa) La temperatura ascendió hasta +25 °C ± 3 °C y se mantuvo durante 16 horas. El ciclo finalizó, se cerraron los viales y se rompió el vacío

25 En el segundo ciclo de liofilización, los viales se cierran dentro del liofilizador al vacío, al final del secado secundario.

Se entiende que cualquier variación en el proceso de liofilización pretende incluirse en el alcance de la presente invención.

30 A lo largo de todo el proceso de fabricación, se realizan análisis del contenido de agua y pruebas de examen visual. Después de la liofilización, se cierran completamente los viales con tapones y se dotan de tapas de encapsulado de

aluminio. Se comprueba visualmente que los viales están bien cerrados cada 15 minutos durante el proceso de taponado y sellado.

5 Los viales liofilizados se mantienen y se almacenan a una temperatura de entre aproximadamente -20 a 8 °C, que resultó ser la temperatura óptima para la estabilidad del producto liofilizado. Además, esta temperatura resultó ser la temperatura más óptima para el mantenimiento de la estabilidad del producto durante la fabricación.

10 El proceso de fabricación II usado para la fabricación de lisinato de aztreonam α se ha descrito anteriormente y el perfil de impurezas se ilustra en la Figura 4. Las impurezas totales observadas durante una fabricación a gran escala de lisinato de aztreonam α de acuerdo con el proceso II solo son ligeramente más elevadas que las impurezas observadas en el IFA. Específicamente, solo se pueden detectar trazas (0,014 %) de impureza B en un producto de lisinato de aztreonam α y representan una reducción de 5 veces en esa impureza en concreto en comparación con las soluciones a granel y los liofilizados de aztreonam β .

15 El aspecto visual de los liofilizados de aztreonam α resultó ser el de una solución amarillenta libre de materia particulada. El pH del liofilizado fue de 4,78. La viscosidad, la tensión superficial y la osmolalidad fueron de 1,5 mPas, 70,34 mN/m y 430 mOsmol/kg, respectivamente. Las impurezas totales fueron del 0,471 %. Estos resultados fueron reproducibles en tres series independientes de lotes de fabricación de lisinato de aztreonam α .

20 Para confirmar que el proceso de fabricación II representa las condiciones óptimas para la fabricación de lisinato de aztreonam α para los propósitos de inhalación, se realizaron investigaciones sobre el efecto del pH, la temperatura y las concentraciones de la solución a granel. Además, también se evaluó la estabilidad del producto liofilizado, así como el producto diluido.

25 b. Evaluación del efecto del pH y de la temperatura

Dado que los valores de pH desempeñaron un papel tan importante en la distinción entre aztreonam α y β , se evaluó el efecto del pH y de la temperatura para la optimización del proceso de fabricación para la fabricación de lisinato de aztreonam α .

30 En pocas palabras, se enfrió el lisinato de aztreonam α (75 mg/ml) a pH 4,8 y a 20 °C hasta 10 °C y 2 °C, y se midió el pH cada 5 segundos. No hubo un impacto significativo de la refrigeración a una temperatura de 10 o 2 °C en el pH de la solución a granel de lisinato de aztreonam α . Por consiguiente, el proceso de fabricación se puede realizar convenientemente a temperaturas de entre 2 y 20 °C, sin embargo, como se ha indicado anteriormente, el proceso se lleva a cabo de manera óptima a 2-8 °C.

40 Además, como ya se ha descrito anteriormente, el aztreonam α es fácilmente soluble en agua sin polimerización, decoloración, solidificación ni gelificación, lo que permite la adición de una solución de lisina a la solución de aztreonam α sin encontrar valores altos de pH durante el proceso.

La estabilidad del aztreonam depende del pH. La máxima estabilidad del aztreonam está en un intervalo de pH de entre pH 4,2 y 7, con el intervalo de pH óptimo entre 4,6 y 4,8. Como se ha descrito anteriormente, el pH del aztreonam α pertenece al intervalo óptimo de pH.

45 c. Influencia de las soluciones a granel en el perfil de impurezas

50 La concentración óptima para la cantidad de aztreonam en el aerosol es de aproximadamente 75 mg/ml, sin embargo, tal concentración puede diferir para el tratamiento de diferentes afecciones. Para optimizar los cambios del proceso de fabricación en la concentración del aztreonam en las soluciones a granel, se estudiaron las limitaciones establecidas por el proceso de criodesecación, la cantidad de agua que se elimina durante la criodesecación y por la forma y el tamaño del vial liofilización donde se almacena el producto.

55 Generalmente, una concentración baja conduce a un producto físicamente inestable y las altas concentraciones del compuesto de ingrediente activo en la solución a granel pueden ser perjudiciales para el proceso de secado global. La forma y el tamaño de los viales tienen un impacto en el volumen de la solución a granel y la concentración del ingrediente activo de las mismas.

60 Cuando se examinó el nivel de impurezas de las soluciones a granel de 25, 37,5 y 75 mg/ml de lisinato de aztreonam α , la solución a granel más pura se obtuvo a una concentración de 37,5 mg/ml. Sin embargo, se encontró que el aztreonam α a la concentración de 75 mg/ml solo tenía un nivel ligeramente superior de impurezas y este nivel de impurezas se encontraba a niveles aceptables por debajo o alrededor del 0,1 % de impurezas y, lo más importante, la concentración de fármaco cumplía la cantidad requerida del compuesto activo necesaria para el producto inhalación.

65

d. Estabilidad del aztreonam α

El aztreonam alfa, en comparación con el aztreonam β , permite la producción de lisinato de aztreonam con una mayor pureza, una mejor estabilidad y un período de caducidad más largo.

El aztreonam α tiene ventajas de una mejor dispersión en agua y un menor contenido de etanol residual (100 ppm) que el aztreonam β (10.000 ppm). Esta propiedad genera menores impurezas totales durante la conversión en la sal. El uso de aztreonam α o β en el comienzo del proceso de fabricación da lugar al mismo producto farmacológico comparable final, una sal de aztreonam amorfa, teniendo, sin embargo, cada uno un nivel diferente de impurezas y estabilidad.

Se produjeron dos lotes de producto farmacológico usando aztreonam β y un lote de producto farmacológico usando el aztreonam α . Se evaluaron los tres lotes de producto farmacológico en cuanto a la estabilidad en el momento de la fabricación del producto (impurezas iniciales totales) y a los 6 meses de la fabricación (impurezas totales a los 6 meses) en el producto almacenado bajo refrigeración a 5 °C. Los resultados de impurezas totales para los lotes se enumeran en la Tabla 8.

Tabla 8

<u>Impurezas totales</u>			
	Forma de aztreonam	Impurezas iniciales totales	Impurezas totales a los 6 meses
Producto farmacológico 1	Lisinato de aztreonam β	1,23 %	1,47 %
Producto farmacológico 2	Lisinato de aztreonam β	1,27 %	1,35 %
Producto farmacológico 3	Lisinato de aztreonam α	0,65 %	0,84 %

Las impurezas totales iniciales para el producto farmacológico (lisinato de aztreonam) producido a partir de aztreonam β fueron del 1,23 % y 1,27 %, respectivamente, medidas mediante HPLC, mientras que las impurezas totales iniciales para el producto farmacológico producido a partir de aztreonam α fueron del 0,65 %. Tras 6 meses de almacenamiento a 5 °C, las impurezas totales para el lisinato de aztreonam β fueron del 1,47 % y 1,35 %, respectivamente, mientras que las impurezas totales para el lisinato de aztreonam α fueron del 0,84 %.

Dado que el límite probable de las impurezas para el producto final en un momento de administración es del 2 %, el lisinato de aztreonam α es un mejor candidato como producto estable y, por lo tanto, una forma preferida de aztreonam que conduce a un producto con un período de caducidad más largo que el lisinato de aztreonam β , aunque el lisinato de aztreonam β también tiene un nivel aceptable de impurezas.

e. Estabilidad del aztreonam α diluido

Dado que el lisinato de aztreonam α inhalable se administra, en un modo, como una solución en aerosol, se determinó su estabilidad en la solución.

A tal efecto, se diluyeron muestras de lisinato de aztreonam α tomadas de las soluciones a granel con un tampón en una proporción de 1:250. Entonces se examinaron las muestras en un tiempo cero (recién preparadas), y después de 1, 3, 6 y 12 horas, y se determinaron los perfiles de impurezas.

Las muestras diluidas de lisinato de aztreonam α resultaron ser estables durante el total de las 12 horas, con sólo aumentos insignificantes de las impurezas hacia el límite de las 12 horas.

Estos hallazgos muestran que hay una buena estabilidad del lisinato de aztreonam α en un estado diluido y que no existe una degradación rápida del lisinato de aztreonam α cuando se diluye el producto liofilizado antes de su uso como un producto de inhalación.

a. Reconstitución del lisinato de aztreonam α liofilizado

Se determinó el perfil de impurezas de las muestras reconstituidas del lisinato de aztreonam α liofilizado.

Para este propósito, se reconstituyeron los liofilizados con 1 ml de solución salina al 0,17 %, y se determinaron el aspecto visual, el pH, la viscosidad, la tensión superficial, la osmolalidad y las impurezas totales.

El aspecto visual del liofilizado de lisinato de aztreonam α resultó ser el de una solución amarillenta libre de materia particulada. El pH del liofilizado fue de 4,78. La viscosidad, la tensión superficial y la osmolalidad fueron de $1,5 \pm 0,60$ mPas, $70,34 \pm 0,2$ mN/m y 430 mOsmol/kg, respectivamente. Las impurezas totales fueron del 0,601 %.

- 5 La osmolalidad del producto inhalable es sumamente importante. La alta osmolalidad no es deseable para el aztreonam inhalable, pues no es tolerada por pacientes con infecciones respiratorias. La formulación de aztreonam inhalable requiere un grado y un intervalo de osmolalidad muy específicos debido a que la alta osmolalidad de la formulación inhalable puede hacer que un paciente reaccione a la inhalación con broncoespasmo o tos.
- 10 Por lo tanto, es de gran importancia que el lisinato de aztreonam α tanto liofilizado como liofilizado reconstituido tenga una osmolalidad aceptable en el intervalo de aproximadamente 400-550 mOsm/kg.

La Figura 6 ilustra gráficamente los perfiles de impurezas de la solución a granel, del liofilizado y del liofilizado reconstituido de lisinato de aztreonam α en comparación con el IFA.

- 15 Como se ve en la Figura 6, el perfil de impurezas del IFA, la solución a granel y el liofilizado fue comparable a los perfiles observados en la Figura 4. Los liofilizados reconstituidos han mostrado un nivel de impurezas global ligeramente mayor, pero no relevante en los liofilizados reconstituidos del aproximadamente 0,471 % al aproximadamente 0,601 %.

20 F. Actividad farmacológica del lisinato de aztreonam

- El lisinato de aztreonam muestra una actividad potente y específica *in vitro* contra un amplio espectro de patógenos aeróbicos gram negativos incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*. La acción bactericida del lisinato de aztreonam se debe a la inhibición de la síntesis de pared celular bacteriana debido a una alta afinidad del lisinato de aztreonam por la proteína de unión a penicilina 3 (PBP3).

- El lisinato de aztreonam, a diferencia de la mayoría de los antibióticos de lactama β , no induce actividad β -lactamasa y su estructura molecular confiere un alto grado de resistencia a la hidrólisis por β -lactamasas tales como penicilinasas y cefalosporinas, producidas por la mayoría de los patógenos gram negativos y gram positivos. El lisinato de aztreonam es por lo tanto especialmente activo contra organismos aerobios gram negativos que son resistentes a antibióticos hidrolizados por β -lactamasas.

- El lisinato de aztreonam mantiene su actividad antimicrobiana a un pH que varía de 6 a 8 *in vitro*, así como en presencia de suero humano y en condiciones anaerobias. El lisinato de aztreonam es activo *in vitro* y es eficaz en modelos de animales de laboratorio e infecciones clínicas contra la mayoría de las cepas de los siguientes organismos, *Escherichia coli*, especies de enterobacterias, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae* y especies de nitrobacterias, incluyendo muchas que son multi-resistentes a otros antibióticos tales como ciertas cefalosporinas, penicilinas y aminoglucósidos.

- En la actualidad, las únicas infecciones para las que la sal de arginina de aztreonam está aprobada por la FDA son las causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, especies de enterobacterias y *Serratia marcescens*.

- Se ha descubierto ahora que todas las cepas bacterianas anteriormente nombradas, así como las cepas muy resistentes y poco habituales tales como *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos se erradican con éxito mediante el tratamiento diario con dosis bajas de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 250 mg, preferentemente aproximadamente 75 mg/ml, de lisinato de aztreonam, preferentemente administrados una vez o dos veces al día, no excediendo la dosis diaria total de 750 mg/día.

II. Composición inhalable de lisinato de aztreonam

- 55 Se describe una composición de lisinato de aztreonam α o β inhalable concentrado, preferentemente de lisinato de aztreonam α , adecuada para la administración eficaz de lisinato de aztreonam en el espacio endobronquial de las vías respiratorias en forma de aerosol o de un polvo seco.

- Es más preferentemente adecuada para la formulación de lisinato de aztreonam concentrado para administrar en aerosol por nebulizadores de atomización, inyección, ultrasónicos, presurizados, de placa porosa vibrante o equivalentes o por inhaladores de polvo seco que producen predominantemente aerosol de lisinato de aztreonam o partículas de polvo seco entre 1 y 5 μm . Tales tamaños de partícula son necesarios para administrar de manera eficaz de lisinato de aztreonam en el espacio endobronquial para tratar infecciones bacterianas.

65 A. Composición de lisinato de aztreonam en aerosol

La composición de lisinato de aztreonam para su administración en aerosol se formula para el suministro eficaz de lisinato de aztreonam en aerosol en el espacio endobronquial de las vías respiratorias del pulmón.

5 La formulación en aerosol se administra en un volumen total de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 ml de solución acuosa fisiológicamente aceptable para una dosis de inhalación. Cuando se formula y se administra como se ha descrito, proporciona una dosis terapéuticamente eficaz de lisinato de aztreonam al sitio de la infección en cantidad suficiente de lisinato de aztreonam para tratar infecciones pulmonares bacterianas.

10 Una combinación de la nueva formulación acuosa con el nebulizador de atomización, inyección, presurizado, de placa porosa vibrante o ultrasónico permite, dependiendo del nebulizador, una administración del al menos aproximadamente 20 al aproximadamente 90 %, en general, del aproximadamente 70 % de la dosis administrada de lisinato de aztreonam en las vías respiratorias.

15 La formulación contiene una cantidad mínima pero eficaz de lisinato de aztreonam de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 mg, más preferentemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 90 mg/ml, y lo más preferentemente de aproximadamente 75 mg/ml, formulados en el volumen más pequeño posible de diluyente fisiológicamente aceptable que tiene un cierto grado de salinidad y cierto pH, ajustados para permitir la generación de un aerosol de lisinato de aztreonam bien tolerado por pacientes pero que minimice el desarrollo de efectos secundarios no deseables tales como broncoespasmos, inflamación y tos.

20 Los principales requisitos para la formulación del lisinato de aztreonam en aerosol son su seguridad y eficacia. Las ventajas adicionales son un menor coste, comodidad de fabricación, pureza del producto, aspectos prácticos de uso, largo período de caducidad, almacenamiento y manipulación del dispositivo de aerosol. Se ha descubierto ahora que estos requisitos para el lisinato de aztreonam en aerosol se cumplen con la formulación que contiene cierto grado de salinidad y cierto intervalo de pH.

1. Dosificación del lisinato de aztreonam

30 El lisinato de aztreonam tiene un período de caducidad relativamente corto. Su semivida es de aproximadamente 1-2 horas, y en diez a doce horas, toda la dosis de aztreonam se ha eliminado. Por consiguiente, el tratamiento eficaz de infecciones pulmonares bacterianas requiere un régimen de tratamiento que proporcione suficiente cantidad de fármaco para mantener el nivel antibacteriano de lisinato de aztreonam en el pulmón. Por lo tanto, tal régimen requiere la administración de un lisinato de aztreonam inhalable de una a varias, preferentemente de dos a cuatro, veces al día. La pauta de dosificación más preferida para la comodidad del paciente es de una o dos veces al día, sin embargo, debido a un efecto específico que el lisinato de aztreonam ejerce sobre las bacterias y debido a su período de caducidad relativamente corto, de aproximadamente 12 horas, con frecuencia se requiere una dosificación mayor de dos veces al día para la total erradicación de las bacterias del espacio endobronquial.

40 Así pues, es preferible administrar lisinato de aztreonam en forma de aerosol o polvo seco en la cantidad terapéuticamente eficaz más pequeña al menos dos veces al día, en algunos casos, de tres a cuatro veces y excepcionalmente más de cuatro veces al día. Se fija por tanto una dosis de lisinato de aztreonam entre 1 y 250 mg por una dosis formulada, lo más preferentemente, en aproximadamente 75 mg de aztreonam/ml.

45 Normalmente, una dosis terapéuticamente eficaz contiene entre 1 y 250 mg, preferentemente de 25 a 90 mg de lisinato de aztreonam, en equivalente, administrada mediante un medio que proporcione al menos aproximadamente 50 %-70 % de eficacia de la administración de lisinato de aztreonam en el espacio endobronquial. Por lo tanto, con una dosis de aproximadamente 250 mg, se administran 125 mg de lisinato de aztreonam durante cada administración. Se ha descubierto que 100-250 mg de lisinato de aztreonam administrados en el pulmón son eficaces en la erradicación de bacterias. En ningún caso, una dosis debería exceder los 250 mg. Por encima de esta cantidad, la administración en aerosol es difícil, el fármaco tiende a precipitar y se necesitan volúmenes mayores para la administración por aerosol, lo que contrarresta el propósito de la invención de suministrar la cantidad terapéutica de fármaco con la mayor eficacia.

55 La determinación de la dosis eficaz del lisinato de aztreonam administrado y la pauta de dosificación usada para el tratamiento de cada paciente depende de la sensibilidad del paciente en concreto al tratamiento. El factor decisivo final es el nivel esperado de lisinato de aztreonam en el esputo tras la administración por aerosol. El intervalo óptimo de lisinato de aztreonam en 1 ml de esputo en cualquier momento dado debería estar en el intervalo de 500 a 2.000 µg/ml. Por lo tanto, la frecuencia de la administración se correlaciona con la eficacia del lisinato de aztreonam administrado.

60 La eficacia de lisinato de aztreonam en aerosol es sorprendentemente alta cuando se compara con la eficacia del lisinato de aztreonam administrado por vía intravenosa, donde los niveles máximos en suero después de la dosis máxima permitida de 2.000 mg resultaron ser solo de 242 µg/ml de esputo. Después de tal administración intravenosa, se descubrió que los niveles a las 6 horas estaban en el intervalo de 16 µg/ml, lo que es la CIM para *Pseudomonas aeruginosa* no resistente.

65

El nuevo modo de administración que permite una administración no invasiva de cantidades pequeñas pero eficaces de lisinato de aztreonam directamente en los pulmones es una gran mejora en comparación con todos los métodos previamente conocidos usados para la administración de lisinato de aztreonam.

5 2. Efecto del pH sobre la formulación de lisinato de aztreonam

La solución o diluyente usados para la preparación de aerosol de lisinato de aztreonam tiene un intervalo de pH limitado de 4,2 a 7,5, preferentemente entre 5,5 y 7,0.

10 El pH de la formulación es una característica importante para la administración de lisinato de aztreonam en aerosol. Cuando el aerosol es ácido o básico, puede causar broncoespasmos y tos. Aunque el intervalo seguro de pH es relativo y algunos pacientes pueden tolerar un aerosol suavemente ácido, otros, particularmente los que tienen fibrosis quística u otra enfermedad subyacente, experimentarán broncoespasmos. Cualquier aerosol con un pH inferior a 4,5 normalmente provoca broncoespasmos. Los aerosoles con un pH de entre 4,5 y 5,5 causarán broncoespasmos ocasionalmente. Los ensayos con aerosol de lisinato de aztreonam descubrieron que una formulación de lisinato de aztreonam administrable en aerosol que tiene un pH entre 5,5 y 7,0 se tolera bien y es segura. Cualquier aerosol que tenga un pH superior a 7,5 debe evitarse, puesto que los tejidos corporales son incapaces de tamponar aerosoles alcalinos. Un aerosol con pH controlado por debajo de 4,5 y por encima de 7,5 provoca irritación pulmonar acompañada de broncoespasmos graves, tos y reacciones inflamatorias.

20 Por estas razones, así como para evitar los broncoespasmos, la tos o la inflamación en pacientes, se determinó que el pH óptimo para la formulación en aerosol, estaba entre pH 5,5 y pH 7,0.

25 Por consiguiente, la formulación en aerosol de lisinato de aztreonam se ajusta a pH de entre 4,5 y 7,5 siendo el intervalo de pH preferido de aproximadamente 5,5 a 7,0. El intervalo de pH más preferido es de 5,5 a 6,5.

3. Efecto de la salinidad sobre la formulación de lisinato de aztreonam

30 Los pacientes que padecen infecciones endobronquiales agudas o crónicas y, particularmente, los que tienen fibrosis quística o bronquiectasia tienen una mayor sensibilidad a diversos agentes químicos y tienen una alta incidencia de incidentes broncoespásticos, asmáticos o de tos. Sus vías respiratorias son particularmente sensibles a condiciones hipotónicas o hipertónicas y ácidas o alcalinas, y a la presencia de cualquier ión permeable tal como cloruro. Cualquier desequilibrio en estas condiciones o la ausencia de cloruro por debajo de ciertos valores conduce a eventos broncoespásticos o inflamatorios y/o tos que dificultan en gran medida el tratamiento con formulaciones inhalables. Estas dos condiciones evitan una administración eficaz del lisinato de aztreonam en aerosol en el espacio endobronquial. Las manifestaciones clínicas de las vías respiratorias irritadas son extremadamente indeseables.

40 Claramente, para el lisinato de aztreonam, no es posible usar solamente un disolvente acuoso sin proporcionar cierto grado de osmolalidad para alcanzar y emular las condiciones fisiológicas encontradas en pulmones sanos. Por consiguiente, se necesita cierta cantidad del anión cloruro u otro anión para administrar de manera satisfactoria y eficaz el lisinato de aztreonam en aerosol, pero tal cantidad es mucho menor que las cantidades proporcionadas y normalmente usadas para los aerosoles de otros compuestos.

45 El broncoespasmo o los reflejos de tos no responden a la misma osmolalidad del diluyente para la administración por aerosol, sin embargo, se pueden controlar y/o suprimir lo suficiente cuando la osmolalidad del diluyente está en un cierto intervalo. La solución preferida para la nebulización del lisinato de aztreonam que es segura y tiene tolerancia de las vías respiratorias tiene una osmolalidad total de entre 50 y 550 mOsm/kg con un intervalo de concentración de cloruro entre 31 mM y 300 mM. La osmolalidad dada controla los broncoespasmos, la concentración de cloruro, como un anión permeable, controla la tos. A este respecto, el anión cloruro se puede sustituir con aniones de bromo o yoduro, puesto que ambos son aniones permeables. Además, el bicarbonato puede sustituir completa o parcialmente al ión cloruro. La solución salina normal (SN) contiene cloruro 154 Mm, mientras que el cloruro 31 mM corresponde a solución salina aproximadamente 0,2 normal.

55 Por consiguiente, la formulación para aerosol de lisinato de aztreonam comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 90 mg, preferentemente aproximadamente 75 mg, de lisinato de aztreonam disuelto en 1 ml de una solución salina normal o preferentemente una diluida de aproximadamente solución salina 1/10 normal (SN) a aproximadamente y como máximo una solución 1 SN, preferentemente de aproximadamente 1/10 a aproximadamente 1/4 SN, es decir, una solución salina normal diluida de un décimo a un cuarto. Se ha descubierto ahora que el lisinato de aztreonam se administra de forma eficaz en los pulmones cuando se disuelve en solución salina menor que la normal, es decir, solución salina que contiene 0,9% de cloruro sódico y que la concentración de un ión cloruro igual o inferior a solución salina 1/4 N permite y asegura una administración de lisinato de aztreonam en el espacio endobronquial.

65 La formulación de lisinato de aztreonam que contiene aproximadamente 50 mg de lisinato de aztreonam por 1 ml de 0,2 SN tiene una osmolalidad de aproximadamente 290 mOsm/l. Tal osmolalidad está dentro de un intervalo seguro

de aerosoles adecuados para la administración a pacientes que padecen infecciones pulmonares bacterianas y también los pacientes con fibrosis quística o bronquiectasia.

Una característica y ventaja adicional de usar una solución de 1/10 a 1/4 SN que comprende 50 mg/ml de lisinato de aztreonam es que la formulación de aerosol resultante se nebuliza de forma muy eficaz con un nebulizador atómico, de inyección o ultrasónico en comparación con el lisinato de aztreonam disuelto en una solución salina normal. Puesto que la administración del lisinato de aztreonam formulado como se ha descrito en la presente memoria es mucho más eficaz, se necesita una cantidad de lisinato de aztreonam mucho menor para conseguir la erradicación completa de las bacterias gram negativas en los pulmones. En lugar de los 1.000 a 4.000 mg de aztreonam que han demostrado ser eficaces en cierta medida en el único intento previo de administrar aztreonam por aerosol, la formulación de lisinato de aztreonam descrita en la presente memoria permite tratamientos con tan poco como 1 mg/ml y con un máximo de 50 mg/ml de lisinato de aztreonam en una cantidad máxima de 5 ml de volumen, administrado preferentemente con un nebulizador de atomización, inyección, electrónico o ultrasónico.

5. Polvo seco, aerosol y suspensiones en aerosol

La formulación de acuerdo con la invención contiene lisinato de aztreonam formulado como un polvo seco, solución en aerosol o suspensión en aerosol de liposomas u otras partículas microscópicas en un disolvente acuoso. La formulación está diseñada para ser bien tolerada y poderse nebulizar de manera fiable y completa en partículas de aerosol dentro del intervalo de tamaños respirables de 1 a 5 μm .

Las dosis están diseñadas para que contengan tanto como, pero no más de, la cantidad necesaria de una forma más activa de lisinato de aztreonam para prevenir la colonización y/o para tratar las infecciones pulmonares graves causadas por una amplia selección de organismos gram negativos susceptibles.

Los pacientes pueden ser sensibles al pH, la osmolalidad y el contenido iónico de una solución nebulizada. Por lo tanto, estos parámetros se ajustan para que sean compatibles con la química del lisinato de aztreonam y sigan siendo tolerados por los pacientes.

La formulación se nebuliza predominantemente en tamaños de partícula que permiten una administración del fármaco en el bronquiolos terminales y respiratorios, donde residen las bacterias durante la infección, y en las vías respiratorias de mayor tamaño durante la colonización.

Para la administración eficaz del lisinato de aztreonam en el espacio endobronquial pulmonar de las vías respiratorias en una partícula de aerosol, es necesario formar un aerosol que tenga un DAMM predominantemente de entre 1 a 5 μm . La cantidad formulada y administrada de lisinato de aztreonam para el tratamiento y la profilaxis de las infecciones endobronquiales bacterianas se debe dirigir eficazmente a la superficie del pulmón. La formulación debe tener el volumen administrable por aerosol más pequeño posible que permita administrar una dosis eficaz de lisinato de aztreonam en el sitio de la infección. La formulación también debe proporcionar condiciones que no afecten negativamente a la funcionalidad de las vías respiratorias. Por consiguiente, la formulación debe contener suficiente fármaco formulado en las condiciones que permitan su administración eficaz evitando al mismo tiempo reacciones no deseadas. La nueva formulación cumple todos estos requisitos.

Una manera de administrar lisinato de aztreonam inhalable es a modo de polvo seco inhalable.

El lisinato de aztreonam preparado de acuerdo con la invención se puede administrar endobronquialmente en una formulación de polvo seco para la administración eficaz del polvo de aztreonam finamente molido en el espacio endobronquial usando inhaladores de polvo seco o de dosis medida como una alternativa a la administración en aerosol.

Una formulación de polvo seco tiene una potencia, en base a la masa, que permite tal administración alternativa de lisinato de aztreonam en forma de un polvo seco con el uso de un inhalador de polvo seco. Una formulación suficientemente potente de lisinato de aztreonam proporciona un polvo seco que se puede administrar ventajosamente con el inhalador de polvo seco o con el inhalador de dosis medida. Para la administración de polvo seco inhalable, se muele el lisinato de aztreonam, se hace precipitar, se seca por pulverización o se procesa de otro modo a tamaños de partícula de entre aproximadamente 1 y 5 μm .

La formulación de polvo seco comprende de aproximadamente 20 a 200 mg, preferentemente de 10 a 100 mg de lisinato de aztreonam.

Para la formulación de polvo seco preparada de acuerdo con la invención, se muele el lisinato de aztreonam, obteniéndose un polvo que tiene un diámetro promedio de la mediana de masa, que varían de 1-5 micrómetros mediante técnicas de molienda con medios, molienda por inyección, secado por pulverización o precipitación de partículas como se describen en el Ejemplo 6.

En síntesis, para el secado por pulverización, se suspende la forma alfa de aztreonam en agua, se agita y se enfría.

Se añade L-lisina disuelta en agua lentamente durante aproximadamente 3 a aproximadamente 10 minutos, preferentemente aproximadamente 6 minutos, hasta que ambos componentes se han disuelto casi completamente. Se purifica la solución usando un carbón vegetal y se filtra. Posteriormente, se seca por pulverización la solución usando cualquier equipo de secado por pulverización adecuado tal como, por ejemplo, Büchi Mini Spray Dryer B-191.

Las determinaciones del tamaño de partícula se realizan usando un impactador en cascada Anderson multietapa u otro método adecuado. El Impactador en cascada no viable de ocho etapas Thermo Andersen se cita específicamente en el Capítulo 601 de la Farmacopea estadounidense como un dispositivo de caracterización para aerosoles dentro de los inhaladores de polvo seco y de dosis medida. El impactador en cascada de ocho etapas utiliza ocho etapas de inyección que permiten la clasificación de aerosoles de 9,0 micrómetros a 0,4 micrómetros (a 28,3 l/min) y permite que las partículas transportadas en el aire impacten sobre superficies de impacto de acero inoxidable o una variedad de sustratos de medios de filtración. Un filtro final recoge todas las partículas menores de 0,4.

La molienda con medios se realiza colocando una sustancia farmacológica en un molino que contenga, por ejemplo, bolas de acero inoxidable o cerámica y rotando o volteando el material hasta que se consiguen los intervalos de tamaños de partícula de fármaco deseados. Las ventajas de la molienda con medios incluyen un buen control del tamaño, intervalos limitados de tamaño de producto, altas eficacias de recuperación y procesos fácilmente escalables. Las desventajas incluyen los largos tiempos de los procesos de fabricación que duran de varias horas a varios días, el requisito de que los medios de molienda se separen del producto tras la compleción y la posibilidad de contaminación del producto con el medio.

La molienda de inyección usa corrientes de aire a muy alta presión para hacer colisionar partículas entre sí, recuperándose partículas finas del tamaño deseado del molino. Las ventajas incluyen la rapidez del proceso de fabricación y la menor transferencia de energía durante la molienda, dando como resultado un menor aumento de la temperatura durante la producción del fármaco. El proceso de molienda por inyección se contempla en de segundos a minutos. Las desventajas de la molienda por inyección incluyen un menor rendimiento y menores eficacias de recogida, siendo un rendimiento típico solamente del 50 al 80 % de recuperación.

El secado por pulverización es otra técnica útil para la preparación de polvos secos inhalables. El secado por pulverización implica pulverizar una bruma fina de solución de lisinato de aztreonam en un soporte y secar las partículas. Después se recogen las partículas. El secado por pulverización tiene la ventaja de ser el menos propenso a degradar las entidades químicas. La adición de un codisolvente que disminuya la solubilidad de un fármaco a una solución farmacológica uniforme produce la precipitación de la solución. Cuando se añade suficiente codisolvente, la solubilidad del fármaco disminuye al punto donde se forman partículas de fármaco sólidas que se pueden recoger por filtración o centrifugación. La precipitación tiene la ventaja de ser altamente reproducible, tener un alto rendimiento de recuperación y poderse realizar en condiciones de baja temperatura, que reducen la degradación.

La inhalación de polvo seco y las inhalaciones de dosis medidas son más prácticas cuando las dosis administradas producen la administración de al menos aproximadamente 10 mg, y más preferentemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 100 mg, de lisinato de aztreonam en el pulmón del paciente que recibe el tratamiento. Dependiendo de la eficacia del dispositivo de administración de polvo seco, que normalmente es del aproximadamente 70 %, los niveles de dosis de polvo seco eficaces típicos están en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 mg de lisinato de aztreonam. Por lo tanto, en general, se requiere más de una aspiración del fármaco.

En este aspecto, se proporciona una formulación suficientemente potente de lisinato de aztreonam puro en polvo seco o forma de dosis medida de partículas farmacológicas molidas o preparadas de otro modo hasta tamaños de partícula predominantemente con un intervalo de 1 a 5 micrómetros. Tal formulación es práctica y conveniente debido a que no requiere ningún procesamiento adicional tal como diluir el polvo seco o rellenar un envase de aerosol. Además, utiliza dispositivos que son suficientemente pequeños, completamente transportables y no requieren, por ejemplo, el compresor de aire necesario para un nebulizador de inyección. Además, la formulación en polvo seco tiene un período de caducidad más largo que las formulaciones de lisinato de aztreonam líquidas para administrarse en aerosol. El lisinato de aztreonam, cuando se reconstituye en una solución administrable en aerosol, solo tiene un período de caducidad limitado a temperatura ambiente debido a la hidrólisis del anillo monobactámico. El polvo seco de lisinato de aztreonam no tiene este problema.

Por lo tanto, la formulación de polvo seco es práctica y conveniente para un uso ambulatorio debido a que no requiere dilución ni otro procesamiento, tiene un período de caducidad prolongado y estabilidad de almacenamiento, y los dispositivos de administración de inhalación de polvo seco son transportables y no requieren el compresor de aire requerido por los nebulizadores de aerosol.

Se pretende que todas las técnicas adecuadas para la preparación de polvos inhalables secos, y todas y cada una de las mejoras de las mismas así como cualquier inhalador de polvo seco estén dentro del alcance de la invención.

B. Estabilidad, período de caducidad y almacenamiento

La estabilidad de la formulación es otra cuestión muy importante para la formulación eficaz. Si el fármaco se degrada antes de la administración en aerosol, se suministra una cantidad menor del fármaco al pulmón alterando de este modo la eficacia del tratamiento. Además, la degradación del lisinato de aztreonam almacenado puede generar materiales que se toleran mal por los pacientes.

La forma seca del lisinato de aztreonam tiene al menos 2 años de período de caducidad. Una estabilidad a largo plazo de la base libre de aztreonam o del lisinato de aztreonam en soluciones acuosas puede no proporcionar un período de caducidad lo suficientemente largo que sea aceptable a nivel comercial. Una formulación líquida, por lo tanto, puede requerir una separación del lisinato de aztreonam del diluyente apropiado. Por esta razón, la formulación se proporciona preferentemente en una forma seca y se puede reconstituir antes de la administración como se describe más adelante.

Por lo tanto, una formulación para su administración en aerosol se proporciona preferentemente como dos componentes separados, uno que contiene un lisinato de aztreonam seco que contiene un diluyente apropiado tal como solución salina 0,1 a 0,9 N, bicarbonato, agua para inyección o cualquier solución acuosa equivalente, como se ha descrito anteriormente. La formulación se reconstituye inmediatamente antes de la administración. Esta disposición evita problemas relacionados con la estabilidad a largo plazo del lisinato de aztreonam en los disolventes acuosos.

De acuerdo con la invención, el lisinato de aztreonam para una administración en aerosol se formula preferentemente en una forma de dosificación liofilizada pretendida para su uso como un polvo seco para reconstitución antes de la terapia de inhalación. La formulación de lisinato de aztreonam se puede preparar asépticamente como un polvo liofilizado bien para la administración del polvo seco o para la reconstitución y la administración, o como una solución congelada, una suspensión liposomal o como partículas microscópicas. La adecuación para el almacenamiento de la formulación permite una reconstitución fiable del lisinato de aztreonam formulado adecuado para la administración en aerosol.

c. Formulación para el envasado de inhalación

La formulación de la invención se envasa para su administración a un paciente en un envase que comprende varios componentes.

El envase de formulación ilustrativo consiste en dos componentes envasados por separado: el polvo de lisinato de aztreonam liofilizado y el diluyente de solución salina estéril para reconstituir el polvo antes de su administración por nebulización.

Cada vial contiene 90-110 % de la cantidad etiquetada de aztreonam (75 mg) y lisina (47 mg) como lisinato de aztreonam. El aztreonam y la lisina forman una sal iónica que se disuelve fácilmente en solución salina. El diluyente es un vial de 1 ml estéril de solución para inhalación de cloruro sódico al 0,17 % (0,17 mg/ml de NaCl). Tras la reconstitución con NaCl al 0,17 %, el pH de la solución es de 4,2-7,0 y la osmolalidad es de 350 a 500 mOsmol/kg. Las impurezas relacionadas con el aztreonam son las siguientes: aztreonam de cadena abierta, aztreonam desulfonado, isómero *E* de aztreonam y *t*-butil-aztreonam. Las impurezas totales son inferiores al 1 %. Cada contaminante conocido es inferior a < 0,2 %. Las impurezas desconocidas son inferiores a < 0,1 %. Todos los ingredientes cumplen los requisitos USP a excepción del monohidrato de lisina, que actualmente no tiene monografía en el USP. La formulación no contiene conservantes.

c. Administración de lisinato de aztreonam por inhalación

El lisinato de aztreonam actualmente no se encuentra disponible.

A. Dos modelos de administración inhalable

La administración de lisinato de aztreonam inhalable se realiza bien con aerosol de lisinato de aztreonam o con polvo de lisinato de aztreonam seco inhalable.

Se ha demostrado que una formulación sin arginina administrada por inhalación trata de forma segura infecciones respiratorias causadas por todas las bacterias gram negativas sensibles incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, especies de enterobacterias y *Serratia marcescens*, así como, y de forma más importante, cepas resistentes a antibióticos de *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos.

B. Frecuencia de dosificación

El tratamiento de infecciones pulmonares causadas por las bacterias anteriormente nombradas se realiza mediante

un régimen de tratamiento que proporciona de una a varias, preferentemente de una a dos, veces al día un lisinato de aztreonam inhalable. El régimen de dosificación más preferido para conveniencia del paciente es de una vez o dos veces al día, sin embargo, debido a un efecto específico que el lisinato de aztreonam ejerce sobre las bacterias y debido a su período de caducidad relativamente corto de aproximadamente 12 horas, con frecuencia se requiere una dosificación más frecuente para la completa erradicación de las bacterias del espacio endobronquial.

En pacientes con la función pulmonar gravemente afectada, se puede aumentar la frecuencia de dosificación hasta aproximadamente doce veces al día cada vez, proporcionando solo la cantidad de lisinato de aztreonam necesaria para mantener el nivel terapéutico en el pulmón.

El lisinato de aztreonam mata a las bacterias mediante la lisis de las paredes celulares siempre que la concentración local del antibiótico supere la concentración inhibitoria mínima bacteriana (*Med. Clinics N. Am.*, 79:4, 733-743 (1995)). Debido a la eliminación relativamente rápida de los antibióticos del tracto respiratorio debido a acción mucociliar, se obtiene mayor eficacia a una dosis menor del lisinato de aztreonam administrado mediante el tratamiento de un paciente tres, cuatro o más veces al día en lugar de administrar el fármaco solamente una vez o dos veces. Para conseguir esto, la dosis administrada por inhalación de lisinato de aztreonam es de al menos cuatro veces y puede ser mil veces inferior a la dosis de arginina de aztreonam administrada por vía intravenosa o utilizada en el intento descrito anteriormente para suministrar arginina de aztreonam en aerosol, donde se administran 500-1.000 mg dos veces al día hasta una cantidad total de 1.000 mg para niños menores de 5 años de edad y 2.000 mg para aquellos mayores de 5 años.

La dosis diaria actual de lisinato de aztreonam puede ser tan pequeña como de 2 mg. El límite superior típico es de 500 mg de lisinato de aztreonam por día suministrados en de dos a cuatro administraciones. En casos extremos, la dosis puede alcanzar los 750 mg al día suministrados en tres, cuatro o más administraciones en aerosol. El intervalo típico y preferido para una dosificación de aerosol está entre 20 y 200 mg administrados dos veces al día o entre 10 y 100 mg administrados tres o cuatro veces al día. La dosis más preferida es de 75 mg/ml administrada dos veces o más al día.

La administración en aerosol de lisinato de aztreonam utiliza el suministro de lisinato de aztreonam en aerosol usando nebulizadores de atomización, inyección, ultrasónicos, electrónicos o equivalentes de otro tipo. Los que son portátiles, tales como los nebulizadores de atomización, ultrasónicos y electrónicos se prefieren para el tratamiento ambulatorio. Los nebulizadores de inyección con un compresor nebulizan la formulación de lisinato de aztreonam de forma muy eficaz, pero son más adecuados para su uso en el hospital y en la consulta del médico.

Una inhalación de polvo seco, como segundo modo de administración del lisinato de aztreonam inhalable, utiliza la formulación de polvo seco de lisinato de aztreonam. Tal formulación comprende una administración del lisinato de aztreonam finamente molido directamente en el espacio endobronquial. En este caso, el lisinato de aztreonam se administra en el espacio endobronquial usando inhaladores de polvo seco o dosis medida. La potencia del lisinato de aztreonam, determinada según la masa, permite la inhalación del polvo de lisinato de aztreonam, como un modo alternativo de administración al aerosol. La inhalación de polvo seco es la más eficaz, práctica y económica cuando las dosis administradas contienen menos de 100 mg. La frecuencia de dosificación, por lo tanto, es generalmente de tres o cuatro veces al día, pero también incluye una pauta de dosificación de una o dos o más de cuatro veces, puesto que este régimen depende de la necesidad y el estado del paciente.

Se describe una formulación suficientemente potente de lisinato de aztreonam en una forma de polvo seco administrada como inhalación de dosis medida de partículas de lisinato de aztreonam molidas o secadas por pulverización hasta tamaños de partícula predominantemente dentro de un intervalo de 1 a 5 μm . Tal administración de polvo seco es posible y preferible particularmente para la inhalación ambulatoria puesto que simplifica el proceso de administración. Tal administración es conveniente debido a que no requiere ninguna manipulación adicional tal como diluir el polvo seco o mezclar el polvo con un disolvente, etc. Además, la inhalación de polvo seco utiliza los dispositivos que son suficientemente pequeños, completamente portátiles y no requieren, por ejemplo, un compresor de aire que se requiere para un nebulizador de inyección. Además, la formulación de polvo seco tiene un período de caducidad incluso más largo que la formulación de lisinato de aztreonam líquida para administración en aerosol.

La pauta de dosificación para el lisinato de aztreonam tanto en aerosol como en polvo seco comprende la administración diaria de dos a cuatro, normalmente, o más de cuatro veces en casos poco habituales, del aerosol o polvo seco.

Los pacientes con fibrosis quística gravemente afectados, por ejemplo, pueden ser capaces de soportar solamente una inhalación cada vez, pero podrían repetir esta inhalación de cantidad pequeña de lisinato de aztreonam cada dos, tres o cuatro horas para tener suficiente nivel de lisinato de aztreonam en los pulmones.

IV. Dispositivos para la administración de lisinato de aztreonam en aerosol

Un requisito principal es administrar lisinato de aztreonam de forma eficaz en el espacio endobronquial de las vías respiratorias de un modo económico. Así pues, al menos el 30-50 %, preferentemente el 70-90 % del fármaco activo,

es decir, del lisinato de aztreonam sometido a nebulización se administra de hecho en un sitio donde ejerza su efecto terapéutico.

A. Nebulizadores

5 La composición descrita anteriormente proporciona el fármaco formulado en una solución que permite la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco, siempre que el aerosol generado por la nebulización cumpla los criterios requeridos tal dicha administración eficaz. El aparato (nebulizador) que administra en aerosol la formulación de lisinato de aztreonam se convierte, por lo tanto, en una parte muy importante.

10 Existen bastantes tipos de nebulizadores actualmente disponibles en el mercado. No todos ellos son adecuados para la práctica del método descrito en la presente memoria.

15 Un nebulizador se selecciona principalmente basándose en permitir la formación de aerosol de lisinato de aztreonam que tenga un DAMM predominantemente de entre 1 y 5 μm . La cantidad administrada de lisinato de aztreonam debe ser eficaz para el tratamiento y la profilaxis de infecciones endobronquiales, particularmente las causadas por bacterias sensibles. Así pues, el nebulizador seleccionado debe poder administrar de forma eficaz la formulación que tiene salinidad, fuerza osmótica y pH ajustados para permitir la generación de aerosol de lisinato de aztreonam que sea terapéuticamente eficaz y se tolere bien por los pacientes. El nebulizador debe poder manipular la formulación que tiene un volumen administrable en aerosol lo más pequeño posible aún capaz de administrar una dosis eficaz de lisinato de aztreonam en el sitio de la infección. Además, la formulación en aerosol no debe afectar a la funcionalidad de las vías respiratorias y debe minimizar los efectos secundarios no deseados.

25 La incapacidad de ciertos nebulizadores para nebulizar cantidades terapéuticas de fármacos en aerosoles de tamaños de partícula pequeños y uniformes se conoce bien. Para la administración eficaz de lisinato de aztreonam, un intervalo de partículas administrables en aerosol con DAMM necesario para administrar el fármaco en el espacio endobronquial, el sitio de la infección, está entre 1 y 5 μm . Muchos nebulizadores disponibles en el mercado son capaces de administrar grandes volúmenes de la solución con el objetivo de administrar al menos el 10 % en el espacio endobronquial produciendo aproximadamente el 90 % de partículas de aerosol grandes por encima de 5 μm con una gran variedad de partículas en el intervalo de 50-100 μm . Estos nebulizadores son ineficaces y no son adecuados para la administración de lisinato de aztreonam.

30 Para ser terapéuticamente eficaz, la mayoría de las partículas de lisinato de aztreonam administradas en aerosol no deberían tener diámetros aerodinámicos de la mediana de masa (DAMM) superiores a entre 1 y 5 μm . Cuando el aerosol contiene una gran variedad de partículas con un DAMM mayor de 5 μm , éstas se depositan en las vías respiratorias superiores reduciendo la cantidad de antibiótico administrado en el sitio de infección del tracto respiratorio inferior.

35 Previamente, se ha demostrado que dos tipos de nebulizadores, de inyección y ultrasónicos, son capaces de producir y administrar partículas de aerosol que tienen tamaños entre 1 y 5 μm . Estos tamaños de partícula son óptimos para el tratamiento de la infección pulmonar bacteriana causada por bacterias gram negativas tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, especies de enterobacterias, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenza*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos. Sin embargo, a no ser que se use una solución formulada especialmente, estos nebulizadores normalmente necesitan grandes volúmenes para administrar suficiente cantidad de fármaco para obtenerse un efecto terapéutico. Por lo tanto, sin un lisinato de aztreonam especialmente formulado, no se consigue la administración eficaz de lisinato de aztreonam.

40 Los nebulizadores adecuados deben poder nebulizar un pequeño volumen de la formulación de forma eficaz, es decir, en el tamaño de partícula de aerosol predominantemente en el intervalo de 1-5 μm . Predominantemente, en la presente solicitud, significa que al menos el 70 %, pero preferentemente más del 90 % de todas las partículas de aerosol generadas están dentro del intervalo de 1-5 μm .

45 Los nebulizadores de inyección y ultrasónicos pueden producir y administrar partículas entre el tamaño de partículas de 1 y 5 μm . Un nebulizador de inyección utiliza rotura por presión de aire de una solución de lisinato de aztreonam acuosa en gotas de aerosol. Un nebulizador ultrasónico utiliza cizallamiento de la solución del lisinato de aztreonam acuoso mediante un cristal piezoeléctrico.

50 Sin embargo, en general, los nebulizadores de inyección solamente son eficaces al 10 % en condiciones clínicas, mientras que el nebulizador ultrasónico sólo es aproximadamente eficaz al 5 %. La cantidad depositada y absorbida en los pulmones es, por lo tanto, una fracción del 10 % a pesar de las grandes cantidades de fármaco colocadas en el nebulizador.

55 Un tipo de nebulizador que es adecuado y preferido para la administración de lisinato de aztreonam es un nebulizador de atomización que consiste en un recipiente de almacenamiento de líquidos en contacto fluido con el

diafragma, y válvulas de inhalación y exhalación. Para la administración de la formulación de lisinato de aztreonam, se colocan de 1 a 5 ml de la formulación en el recipiente de almacenamiento, y se conecta el generador de aerosol que produce aerosol atomizado de tamaños de partículas selectivamente entre 1 y 5 μm .

- 5 Los dispositivos de nebulización típicos adecuados para la práctica del método incluyen nebulizadores de atomización o nebulizadores de inyección modificados, nebulizadores ultrasónicos, nebulizadores electrónicos, nebulizadores de placa porosa vibrante e inhaladores de polvo seco activados modificados para manipular un volumen pequeño de fármaco altamente concentrado en una formulación específica que tiene un pH, una osmolalidad y una salinidad específicos. El más preferido es el nebulizador de inhalación PARI descrito en el documento PCT/US00/29541 modificado para cumplir los requisitos del método.

B. Inhaladores de polvo seco

15 El polvo seco se administra como tal usando dispositivos que administran el polvo seco directamente en los pulmones.

Existen dos diseños principales de inhaladores de polvo seco. Un diseño es el dispositivo de medida en el que se coloca un recipiente para el fármaco dentro del dispositivo y el paciente añade una dosis del fármaco en la cámara de inhalación. El segundo es un dispositivo de dosis medida en fábrica en el que cada dosis individual se ha fabricado en un recipiente separado. Ambos sistemas dependen de la formulación del fármaco en partículas pequeñas de diámetros de mediana de masa de 1 a 5 micrómetros, y habitualmente implican la coformulación con partículas excipientes mayores (en general, partículas de lactosa de un diámetro de 100 micrómetros). El polvo del fármaco se coloca en la cámara de inhalación (bien mediante la medida del dispositivo o la rotura de una dosis medida en fábrica) y el flujo de inspiración del paciente acelera el polvo fuera del dispositivo y hacia la cavidad oral. Las características de flujo no laminar de la trayectoria del polvo hacen que los agregados de excipiente y fármaco se descompongan y la masa de las partículas de excipiente grandes provoca su impacto en la parte posterior de la garganta, mientras que las partículas de fármaco más pequeñas se depositan en profundidad en los pulmones.

La tecnología actual para los inhaladores de polvo seco es tal que los límites de carga útil son de aproximadamente 100 mg de polvo. La falta de estabilidad a largo plazo de lisinato de aztreonam en una solución acuosa debido a hidrólisis permite que la tecnología del inhalador de polvo seco se convierta en un vehículo de administración preferido para el polvo seco de lisinato de aztreonam.

C. Tamaño de partícula del polvo seco o aerosol

El tamaño de partícula de la formulación en aerosol de lisinato de aztreonam es uno de los aspectos más importantes de la invención. Si el tamaño de partícula es superior a 5 μm , entonces las partículas se depositan en las vías respiratorias superiores. Si el tamaño de partícula del aerosol es inferior a 1 μm , entonces no se deposita en el espacio endobronquial, sino que continúa administrándose en los alvéolos y se puede transferir a la circulación sanguínea sistémica.

Un nebulizador de inyección utiliza presión de aire para romper una solución líquida en gotas de aerosol. Un nebulizador ultrasónico funciona mediante un cristal piezoeléctrico que corta un líquido en pequeñas gotas de aerosol. Un sistema de nebulización presurizado empuja la solución bajo presión a través de pequeños poros para generar gotas de aerosol. Un dispositivo de placa porosa vibrante utiliza la vibración rápida para cortar una corriente de líquido en tamaños de gota apropiados. Sin embargo, solamente algunas formulaciones de lisinato de aztreonam se pueden nebulizar de forma eficaz, puesto que los dispositivos son sensibles al pH y a la salinidad.

En inhaladores de polvo seco, el polvo seco de lisinato de aztreonam preparado como se ha descrito anteriormente en dosis de 1-100 mg, preferentemente de 10-50 mg de polvo seco como partículas que tienen tamaños de entre 1 y 5 μm , se usa directamente.

D. Eficacia de nebulización del lisinato de aztreonam

La selección y elección del nebulizador afecta de forma importante a la eficacia de la administración del lisinato de aztreonam inhalable.

Una combinación de una formulación en aerosol de lisinato de aztreonam y un dispositivo de nebulización potencia de forma significativa la eficacia y velocidad de la administración del fármaco. En la actualidad, por ejemplo, el tiempo medio para la administración de otros fármacos en aerosol tales como, por ejemplo, la tobramicina, es de 15-20 minutos por dosis. El tiempo requerido para este tratamiento representa una carga significativa para el paciente y contribuye a la reducción de la conformidad con el régimen por debajo del límite de detección.

Además, el sistema del nebulizador usado para la administración de tobramicina es menos eficaz que los nuevos dispositivos de atomización. La dosis total depositada de tobramicina en el pulmón está en el intervalo del 12 al 15 %. Aproximadamente el 30 % del fármaco dispensado permanece en el nebulizador al final del tratamiento y de la

parte que se administra, aproximadamente el 30 % se emite como partículas demasiado grandes o pequeñas para alcanzar las vías respiratorias inferiores.

5 El nuevo nebulizador de atomización, con una producción de 8 a 10 microlitros/segundo o 0,48 a 0,60 ml/minuto, es capaz de administrar material farmacológico de 2 a 4 veces más rápido que los nebulizadores anteriores ilustrados por nebulizador PARI LC plus. Además, el nuevo nebulizador es capaz de administrar aproximadamente el 90 % de la dosis dispensada, con el 8 5% o más de las partículas de aerosol dentro del intervalo de tamaño requerido para la deposición en las vías respiratorias inferiores. Como resultado de ello, la administración de una formulación diseñada específicamente de lisinato de aztreonam usando el nebulizador de atomización conduce a una mejora sustancial en la administración local a las vías respiratorias, a la necesidad de un tiempo más corto para la administración y, dependiendo de la concentración final de la solución de lisinato de aztreonam, reduce el tiempo de tratamiento hasta tan poco como tres o cuatro minutos.

15 V. Estudios experimentales complementarios

15 *Pseudomonas aeruginosa* es la causa más común de infección endobronquial crónica en pacientes con fibrosis quística (FQ). Esta infección es una causa importante de morbilidad y mortalidad en estos pacientes. La aplicación tópica de agentes antibióticos inhalados como brumas en aerosol ha demostrado ser un beneficio significativo para los pacientes con FQ. La terapia con antibióticos en aerosol con agentes que incluyen carbenicilina, gentamicina, ticarcilina, tobramicina y colistina, pero no aztreonam se ha practicado durante muchos años.

25 El antibiótico en aerosol más ampliamente usado para el tratamiento de los pacientes con FQ es la tobramicina, que produce mejoras sustanciales en la función pulmonar y otros parámetros clínicos. *In vitro*, la tobramicina es activa contra la mayoría de los organismos de *P. aeruginosa* en ausencia de esputo, sin embargo, en presencia de esputo, la bioactividad de la tobramicina se reduce significativamente.

30 El aztreonam es un antibiótico monobactámico con excelente actividad contra muchas bacterias gram negativas aerobias, incluyendo *P. aeruginosa*. Actualmente, está aprobado como terapia parenteral para una variedad de infecciones graves y ha sido ampliamente usado en el control de los agravamientos pulmonares en pacientes con FQ. El aztreonam tiene un espectro antibacteriano similar a la antibióticos aminoglucósidos tobramicina y gentamicina. Su excelente actividad contra muchas bacterias gram negativas aerobias, incluyendo *P. aeruginosa*, ha llevado a un uso generalizado entre los pacientes con FQ, incluyendo la administración intravenosa como tratamiento de un solo agente y en combinación con otros antibióticos para el tratamiento de los agravamientos pulmonares. Estos estudios han demostrado una mejora en la función pulmonar y los índices clínicos, así como reducciones en la carga bacteriana y los recuentos de glóbulos blancos. Además, se ha demostrado que el aztreonam tiene un potencial para el control de *Burkholderia cepacia*, un patógeno intrínsecamente resistente a los antibióticos aminoglucósidos comúnmente usados.

40 Para determinar si el aztreonam tendría éxito para el tratamiento de *P. aeruginosa* y otras infecciones bacterianas, en presencia de esputo o mucina, se estudió la bioactividad antagonizada del aztreonam *in vitro*.

Las condiciones experimentales se describen en el Ejemplo 8.

45 Los resultados de estos estudios se describen en las Figuras 7 a 9, que representan las curvas de destrucción de antibiótico obtenidas con diferentes concentraciones de los antibióticos aztreonam (Fig. 7 y 8) y tobramicina (Fig. 9), en presencia o ausencia de mucina o esputo con FQ. La mucina es un modelo para el componente de unión a proteínas del esputo.

50 La Figura 7 ilustra la actividad del aztreonam contra *P. aeruginosa* en ausencia (Figura 7A) o presencia (Figura 7B) de mucina gástrica de cerdo. Se añadió aztreonam hasta proporcionar una concentración final en los siguientes múltiplos de la CIM: 0,0 (◆); 0,1 (□); 1,0 (■) y 10 (◇).

55 Como se ve en la Figura 7, las curvas sin mucina gástrica de cerdo (Figura 7A) y con mucina gástrica de cerdo (Figura 7B) son casi idénticas, lo que indica que no hay una inhibición medible del antibiótico por parte de la mucina.

La Figura 8 ilustra la actividad del aztreonam contra *P. aeruginosa* en presencia o ausencia de esputo con fibrosis quística (FQ). Se añadió aztreonam hasta proporcionar una concentración final en los siguientes múltiplos de la CIM: 0,0 (◆); 0,1 (□); 1,0 (■) y 10 (◇).

60 Como se ve en la Figura 8, las curvas sin esputo con FQ (Figura 8A) y con esputo (Figura 8B) son casi idénticas, lo que indica que no hay una inhibición medible del antibiótico por parte del esputo con FQ.

65 Se probó la tobramicina, que se sabe que se une a las mucinas y que es inhibida por el esputo y la mucina, con o sin mucina en el mismo ensayo a efectos comparativos.

La Figura 9 muestra la actividad de la tobramicina contra *P. aeruginosa* en ausencia (Figura 9A) o presencia (Figura

9B) de mucina añadida. Se añadió tobramicina hasta proporcionar una concentración final en los siguientes múltiplos de la CIM: 0,0 (◆); 1,0 % (□) y 10 % (■).

La Figura 9 demuestra la capacidad de la mucina de cerdo para inhibir la actividad de la tobramicina. En ausencia de mucina, la tobramicina destruyó a *P. aeruginosa* eficazmente, reduciendo los recuentos de colonias en siete registros en una hora al aplicarla a 10 x CIM. Por el contrario, la misma concentración de tobramicina en presencia de mucina causó una destrucción mucho menor: cantidades insignificantes en una hora y solo tres a cuatro registros en cuatro horas. A 1 x CIM, la tobramicina destruyó siete registros de *P. aeruginosa* en cuatro horas en ausencia de mucina, pero destruyó menos de un registro en cuatro horas en presencia de mucina.

Ni el esputo con FQ ni la mucina gástrica de cerdo mostraron una inhibición significativa de la actividad del aztreonam en las condiciones de este ensayo. Las curvas de destrucción de *P. aeruginosa* obtenidas fueron casi idénticas a los controles que carecen de esputo o mucina. El crecimiento de *P. aeruginosa* se produjo, como era de esperar, cuando se añadió aztreonam en cantidades inferiores a la CIM (curvas superiores de las Figuras 7-9), mientras que la destrucción eficaz se produjo cuando aztreonam estaba presente en o por encima de la CIM (curvas inferiores).

Esto contrasta con el resultado obtenido para la tobramicina, un antibiótico conocido por ser inhibido por el esputo con FQ y la mucina gástrica de cerdo. La adición de mucina a la tobramicina produjo una disminución de la destrucción de hasta cuatro registros, dependiendo del momento y de la concentración de antibiótico usado. Estos resultados confirman la validez del ensayo de inhibición de mucina como modelo para la interpretación de los resultados esperados en los pulmones de pacientes con fibrosis quística.

Estos resultados muestran que el aztreonam no es inhibido por el esputo de pacientes con fibrosis quística y que no se inhibirá como un tratamiento complementario primario o secundario cuando se administre por inhalación, al menos no en la medida de la tobramicina. Esto implica que el aztreonam se puede preferir a la tobramicina en el tratamiento de infecciones respiratorias en pacientes con fibrosis quística u otros pacientes, al haber más antibiótico disponible para la erradicación de *Pseudomonas aeruginosa*.

VI. Tratamiento de infecciones pulmonares bacterianas

En la presente invención, se describe un tratamiento eficaz y la prevención de infecciones pulmonares bacterianas agudas y crónicas causadas por *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Proteus mirabilis*, especies de enterobacterias y *Serratia marcescens*, así como la infección causada por cepas resistentes a antibióticos de *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos.

A. Dos modos de tratamiento inhalable

Un método para el tratamiento de infecciones pulmonares comprende la administración de lisinato de aztreonam en forma inhalable mediante aerosol o como un polvo seco, varias veces al día. La dosis diaria de lisinato de aztreonam está entre 1 y 500 mg/día, con dosis excepcionales hasta 750 mg/día administradas en 1-50 mg/ml para aerosol y de 2 a 200 mg de dosis diaria de polvo seco administrada en una dosis de 1-100 mg/un tratamiento. La dosificación del lisinato de aztreonam y la frecuencia de dosificación dependen del tipo de infección bacteriana, la gravedad de la misma, la edad del paciente, el estado del paciente, etc. En caso de pacientes con fibrosis quística en los que la capacidad aérea pulmonar está disminuida, la dosificación es más frecuente con dosis más bajas.

La formulación de polvo seco adecuada para el tratamiento de infecciones pulmonares comprende de 1 a 200 mg, preferentemente aproximadamente de 10 a 100 mg, de polvo en un estado amorfo o cristalino en tamaños de partícula entre 1 y 5 micrómetros de diámetro aerodinámico de la mediana de masa necesarios para la administración eficaz de lisinato de aztreonam en el espacio endobronquial. La formulación de polvo seco se administra de una a cuatro veces al día, preferentemente dos veces al día. La formulación de polvo seco es estable a la temperatura y tiene un pH fisiológicamente aceptable de 4,2-7,5, preferentemente 5,5 a 7,0 y un período de caducidad de más de cinco años.

B. Tratamiento de infecciones en pacientes con enfermedades pulmonares purulentas

La terapia de aerosol es particularmente útil para el tratamiento de pacientes que padecen enfermedades pulmonares purulentas y es especialmente adecuada para el tratamiento de pacientes con fibrosis quística, bronquiectasia y los pacientes sometidos a ventilación mecánica.

Previamente, los antibióticos inhalados de terapia de aerosol para la fibrosis quística (TAFQ) han demostrado un beneficio significativo de tal tratamiento para pacientes de fibrosis quística (FQ) que padecen infecciones pulmonares crónicas.

En Estados Unidos, el agente más exitoso y ampliamente usado a este respecto ha sido la tobramicina, que ha demostrado producir mejoras sustanciales en la función pulmonar y otros parámetros clínicos.

Ahora se ha descubierto que el lisinato de aztreonam inhalable proporciona un tratamiento exitoso de la fibrosis quística, bronquiectasia u otras enfermedades pulmonares purulentas para infecciones pulmonares causadas por bacterias gram negativas y particularmente las causadas por *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos resistentes a múltiples fármacos.

El tratamiento de esas infecciones bacterianas multi-resistentes con lisinato de aztreonam en aerosol ha sido exitoso en la erradicación de las bacterias como se describe en el Ejemplo 2.

Tal tratamiento es autónomo o puede ser un tratamiento complementario a otros antibióticos tales como la tobramicina, que, tras un uso prolongado, produce el desarrollo de resistencia a la tobramicina. Cuando el tratamiento con tobramicina se intercala con períodos de tratamiento con lisinato de aztreonam, dicha resistencia no se desarrolla o se reduce.

C. Limitaciones de los antibióticos en aerosol actuales en el tratamiento de la fibrosis quística

Hasta la fecha, un aminoglucósido tobramicina es el único antibiótico con aprobación de la FDA para su administración como un aerosol. Sin embargo, a pesar de los beneficios obtenidos en pacientes con fibrosis quística con la administración de tobramicina en aerosol, su utilidad está limitada en cierto grado.

En primer lugar, el uso frecuente de aminoglucósidos para controlar los agravamientos pulmonares conduce al desarrollo selectivo de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes. La aparición generalizada de tales organismos se reconoce como una crisis creciente en la comunidad de la FQ. Por ejemplo el 21 % de los pacientes examinados de 69 centros diferentes de FQ para los ensayos clínicos de tobramicina en fase III tienen aislados resistentes a la tobramicina (CIM > 16 µg/ml). Por consiguiente, muchos especialistas clínicos son reticentes a prescribir este aminoglucósido en aerosol como terapia supresora crónica, temiendo que pueda promover además la resistencia y, por lo tanto, disminuir la eficacia de terapia IV. Para reducir el riesgo de tal resistencia surgida por tratamiento, la terapia con tobramicina se restringe a ciclos de 28 días con y 28 días sin el fármaco.

Una segunda limitación de la tobramicina en aerosol es su falta de actividad contra varias bacterias intrínsecamente resistentes a la tobramicina que incluyen *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Burkholderia cepacia*, la última de las cuales se reconoce ampliamente como una amenaza significativa para los pacientes con fibrosis quística. Los pacientes con fibrosis quística infectados con *Burkholderia cepacia* tienen una mayor tasa de mortalidad y muchos experimentan un rápido curso letal como se describe en *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160: 1572-1577, (1999). Además, *Burkholderia cepacia* es una infección transmisible que puede causar la propagación epidémica entre pacientes con fibrosis quística. Por lo tanto, un paciente infectado con *Burkholderia cepacia* debe aislarse de otros pacientes.

El lisinato de aztreonam en aerosol no provoca la resistencia a aminoglucósidos y tiene una buena actividad contra patógenos resistentes observados en pacientes con fibrosis quística.

Un lisinato de aztreonam en aerosol bien puede reemplazar a la tobramicina o usarse como una alternativa y tratamiento intermitente para la tobramicina durante los períodos de 28 días sin tobramicina, que se requieren para evitar el desarrollo de la resistencia permanente a la tobramicina.

El lisinato de aztreonam es un antibiótico con excelente actividad contra muchas bacterias gram negativas aerobias, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* multi resistente. El espectro de actividad del lisinato de aztreonam es similar al de los antibióticos de aminoglucósido tobramicina y gentamicina, y su actividad contra pseudomonas es comparable a la ceftazidina, y en varios aspectos, es mejor que la tobramicina. Por ejemplo, el lisinato de aztreonam no es inhibido por el esputo de pacientes con FQ, lo que le convierte en un fármaco mucho más potente que la tobramicina, que sí es inhibida.

El lisinato de aztreonam resiste la destrucción por la mayoría de las β-lactamasas bacterianas, que son el origen de mucha de la resistencia que surge en el tratamiento a antibióticos de lactama β que aparece frecuentemente entre pacientes hospitalizados.

La actividad del lisinato de aztreonam contra bacterias gram negativas, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*, combinada con su excelente perfil de seguridad la convierte en una buena alternativa a los aminoglucósidos para el tratamiento de infecciones pulmonares crónicas entre pacientes con fibrosis quística. Hasta el momento, el uso clínico del lisinato de aztreonam en pacientes con FQ ha incluido la administración IV de lisinato de aztreonam como terapia de un solo agente o en combinación con otros antibióticos para el tratamiento de los agravamientos pulmonares.

D. Ventajas del lisinato de aztreonam como antibiótico en aerosol

El lisinato de aztreonam posee varias características que lo hacen muy atractivo para la administración en aerosol a pacientes con FQ.

5 La primera de estas características surge de su mecanismo de acción, que, a diferencia de los antibióticos aminoglucósidos, implica la unión preferente a la proteína de unión a la penicilina 3 (PBP3) y la interferencia posterior con la síntesis de la pared celular bacteriana. Debido a que el mecanismo de acción del lisinato de aztreonam difiere del de la tobramicina, su uso no contribuye a la aparición de cepas resistentes a aminoglucósidos de *Pseudomonas aeruginosa*.

10 La segunda ventaja de una formulación en aerosol del lisinato de aztreonam es su actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* resistente a la tobramicina y resistente a múltiples fármacos. Cuando se examinaron aislados de pacientes admitidos en la Fase II de los ensayos de tobramicina, casi el 75 % de los aislados con una CIM de tobramicina >16 µg/ml resultaron ser sensibles al lisinato de aztreonam.

15 La tercera característica es la capacidad del lisinato de aztreonam en aerosol para controlar los organismos intrínsecamente resistentes a la tobramicina, especialmente *Burkholderia cepacia*, que se considera resistente a los niveles de lisinato de aztreonam conseguidos por administración parenteral.

20 VII. Actividad antibacteriana del aztreonam

Para probar la actividad bacteriana del lisinato de aztreonam en aerosol contra cepas multi-resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Alcaligenes xylosoxidans*, se ensayaron las actividades *in vitro* del lisinato de aztreonam a concentraciones correspondientes a las que se pueden conseguir con el aztreonam inhalable frente a aislados clínicos de pacientes con fibrosis quística.

25 La administración en aerosol de lisinato de aztreonam de acuerdo con la invención consigue concentraciones de aztreonam hasta alcanzar niveles de 500 a tanto como 8.000 µg/ml con un nivel medio de aproximadamente 2.000 µg/ml de aztreonam en el esputo. Estos niveles dependen de la formulación, así como del nebulizador usado para la administración en aerosol. Con ciertos nebulizadores, la concentración de aztreonam puede conseguir un nivel medio de 5.000 µg/ml.

Las sensibilidades determinadas *in vitro* de las bacterias ensayadas predicen la eficacia clínica del aerosol o polvo seco de aztreonam inhalado.

35 El aztreonam mata mediante la lisis de las paredes celulares siempre que la concentración local de antibiótico supere la concentración inhibitoria mínima de las bacterias (*Med. Clinics N. Am.*, 79: 4, 733-743 (1995)).

40 Se ensayó la actividad *in vitro* de altas concentraciones de aztreonam contra aislados clínicos de *B. cepacia*, *S. maltophilia* y *A. xylosoxidans* en el Hospital Infantil y Centro Médico Regional de Seattle, WA. Los ensayos se realizaron en bandejas de microdilución de caldo de cultivo preparadas con concentraciones del doble de lisinato de aztreonam de 2 a 2.048 µg/ml. *Staphylococcus aureus*, un organismo gram positivo, se usó como control negativo.

El procedimiento detallado usado para los ensayos se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se ven en la Tabla 9.

45 Tabla 9

Organismo (Nº de aislados)	Intervalo de CIM	CIM50	CIM90
<i>P. aeruginosa</i> (54)	2-1.024	16	512
<i>B. cepacia</i> (38)	2-2.048	32	512
<i>S. maltophilia</i> (20)	8 →2.048	256	>2.048
<i>A. xylosoxidans</i> (20)	2>2.048	256	2.048
<i>S. aureus</i> (20)	512-2.048	1.024	2.048

50 Para los ensayos, cada placa de micropocillos contenía una dilución del doble, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1.024 y 2.048 µg/ml de lisinato de aztreonam. Cada placa que contenía los micropocillos se usó para analizar un aislado de un organismo.

55 La Tabla muestra las diferentes especies de bacterias analizadas con respecto a la sensibilidad, es decir, la capacidad del antibiótico para inhibir su crecimiento, a aztreonam, con el número de aislados para cada especie proporcionado entre paréntesis. La columna designada "intervalo de CIM" muestra el intervalo de los límites superior e inferior de las sensibilidades vistas en los aislados analizados. La columna designada MIC50 muestra la mediana del nivel de sensibilidad para el 50 % más sensible de los aislados. La columna final, designada MIC90 muestra el valor de la mediana para el nivel de sensibilidad para el 90 % más sensible de los aislados.

La Tabla 9 muestra los resultados de actividad *in vitro* comparativa de aztreonam frente a aislados clínicos obtenidos

de pacientes con fibrosis quística.

Para la interpretación de estos datos, se comparan estos valores que representan qué concentración de aztreonam se requiere para inhibir el crecimiento de bacterias con las concentraciones de aztreonam obtenibles por las diferentes vías de administración. Por lo tanto, para la administración intravenosa de aztreonam, el nivel en suero después de la administración de 2 g de aztreonam, la dosis intravenosa máxima permitida, el nivel en suero máximo es de 256 µg/ml y después disminuye rápidamente. A las seis horas de la administración, el nivel de aztreonam en el suero está en el intervalo de 16 µg/ml. Por razones de seguridad, la arginina de aztreonam intravenosa solo se puede administrar cada seis horas. Con la posible excepción de *Pseudomonas aeruginosa*, que tiene una CIM50 de 16 µg/ml todos los otros organismos serían predominantemente resistentes al aztreonam intravenoso, puesto que su nivel de resistencia supera incluso la concentración máxima (256 µg/ml) de concentración en suero de esputo de aztreonam tras la administración intravenosa. Sin embargo, como la resistencia de las bacterias es relativa a la concentración del fármaco, para la administración en aerosol, la concentración máxima debería estar al menos en el intervalo de 500 a 2.000 µg/ml. Dicho intervalo se consigue con las dosis de aztreonam y la formulación combinadas con el nebulizador eficaz. En la concentración de 500-2.000 µg/ml en el esputo, la terapia de aerosol es capaz de tratar la mayoría de las infecciones endobronquiales causadas por las bacterias gram negativas, específicamente las bacterias enumeradas en la Tabla 9, a excepción de *Staphylococcus aureus*.

Las CIM50 y CIM90 han mostrado que el tratamiento de *P. aeruginosa* con aztreonam inhalable erradica la mayoría de los aislados de *P. aeruginosa* con las concentraciones altas de aztreonam en esputo de pacientes con fibrosis quística obtenibles después del administración del aerosol. Los datos obtenidos para el aislado de *Burkholderia cepacia* indicaron que cabría esperar que al menos la mitad de los pacientes respondieran a dicho tratamiento con erradicación de las bacterias. Si se administra una concentración suficientemente alta de aztreonam en el pulmón, se espera que el porcentaje sea mayor. Puesto que la infección de *Burkholderia cepacia* actualmente se considera una afección principalmente no tratable, el tratamiento con aztreonam inhalable por aerosol es la primera terapia eficaz documentada.

Los resultados obtenidos en estos estudios son sorprendentes e inesperados puesto que no existe indicio en la bibliografía de que *Burkholderia cepacia* sea susceptible a tratamiento con aztreonam. Los datos también muestran que algunos aislados de *S. maltophilia* y *A. xylosoxidans* responden a la alta concentración de aztreonam.

La inhalación de aztreonam como se ha descrito permite alcanzar concentraciones de aztreonam en el esputo tan altas como 2.000-5.000 µg/ml. Los niveles de aztreonam en el esputo conseguidos mediante la administración por aerosol superan los requeridos para inhibir organismos responsables de infecciones no tratables de otro modo en pacientes con FQ.

Además, el aztreonam administrado por inhalación a todos los pacientes con *Burkholderia cepacia* y/o *S. maltophilia* y/o *A. xylosoxidans* junto con otros antibióticos administrados de forma sistémica por vía parenteral o por inhalación contribuye a la sinergia de tal tratamiento. Una combinación de aztreonam inhalable con otros antibióticos proporciona otro enfoque terapéutico para tratar cepas bacterianas multi-resistentes.

Los estudios descritos en la presente memoria demostraron que las concentraciones de aztreonam alcanzadas tras la administración del aerosol tenían actividad contra *Burkholderia cepacia* aisladas de esputo de pacientes con FQ, así como frente a otras bacterias que son ampliamente resistentes al tratamiento con otros antibióticos.

La CIM50 y CIM90 observadas para una bacteria gram positiva, *Staphylococcus aureus*, demuestran que las concentraciones altas de aztreonam tenían algo de actividad contra esta bacteria gram positiva. Estos hallazgos, sin embargo, no tienen gran significación, pues existen muchos otros fármacos con una eficacia razonable contra *Staphylococcus aureus*.

VIII. Seguridad y ensayos clínicos

Las infecciones que requieren una atención particular son las infecciones causadas por y que incluyen *B. cepacia*, *S. maltophilia* y *A. xylosoxidans*, así como cepas multi-resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, la infección más clínicamente significativa es la primera.

Para determinar si un lisinato de aztreonam formulado de forma apropiada para administrarse por aerosol podría volverse eficaz para el tratamiento de estas cepas bacterianas poco comunes pero muy resistentes, se inició y ensayó el tratamiento con lisinato de aztreonam en aerosol en un paciente con fibrosis quística que tenía una infección de *Burkholderia cepacia* grave que no respondía a ningún tratamiento. El tratamiento clínico y los resultados obtenidos con un lisinato de aztreonam en aerosol se describen en el Ejemplo 2.

También se estudió la seguridad de la formulación lisinato de aztreonam en el ser humano y en el perro Beagle. Las condiciones de estos estudios se describen en las Muestras 11 y 12.

Los resultados de ambos estudios confirman la seguridad de la formulación de lisinato de aztreonam para inhalación. En comparación con una formulación que contiene arginina, la nueva formulación es segura en el ser humano (Ejemplo 10) y en el perro en hasta 200 veces la dosis humana mostrada en un estudio con perros de 28 días (Ejemplo 11). El aumento de la seguridad establece la utilidad del lisinato de aztreonam en ambos casos.

5 Los resultados de seguridad de ambos estudios demuestran que no se registraron hechos adversos graves durante el ensayo y ningún sujeto se retiró del estudio debido a un hecho adverso. En total, se publicaron 7 hechos adversos posteriores a la dosis en 7 sujetos. Ni un solo hecho adverso fue experimentado por más de un sujeto. Un solo hecho adverso relacionado con el fármaco se produjo en cada uno de los grupos de 95 mg y 190 mg de dosis de
10 aztreonam inhalada (dolor de cabeza y mareos, respectivamente) y se produjeron 2 hechos adversos relacionados con el fármaco en el grupo de dosis de 285 mg de aztreonam inhalado (disgeusia, es decir, sabor desagradable y tos). Un hecho adverso fue de gravedad de grado 2 (dolor de cabeza) y el resto de los hechos adversos fueron de gravedad de grado 1. Todos los hechos adversos se resolvieron antes de finalizarse el ensayo. El hecho adverso de la tos condujo a la interrupción de la medicación del ensayo, aunque el sujeto continuó en el ensayo y completó
15 todas las evaluaciones del mismo.

No hubo cambios medios notables con respecto al valor de referencia en ningún parámetro de la función pulmonar después de la dosis. Uno de los sujetos, que recibió placebo, tuvo una disminución del VEF₁ con respecto al valor de referencia de más del 15 % (30 min). Esto se registró como un hecho adverso, pero no se considera que esté
20 relacionado con la medicación del ensayo.

No hubo cambios medios notables con respecto al valor de referencia en ninguno de los parámetros hematológicos o de coagulación evaluados.

25 No hubo cambios medios notables con respecto al valor de referencia en la presión sistólica y diastólica, la frecuencia del pulso, la temperatura oral, la velocidad de la respiración o la oximetría de pulso en los sujetos tratados con placebo o 90 mg, 190 mg o 285 mg de aztreonam inhalado. No se informó como hecho adverso ningún valor de ningún sujeto individual en ninguno de estos parámetros.

30 No hubo ningún cambio medio notable con respecto al valor de referencia en ningún parámetro de ECG evaluado ni se publicó ningún valor de ECG de ningún sujeto individual como hecho adverso. No se advirtieron cambios con respecto al valor de referencia en ninguna exploración física posterior a la dosis.

En conclusión, el aztreonam inhalado fue en general seguro y bien tolerado cuando se administró a dosis de 95 mg, 190 mg y 285 mg en este ensayo.
35

No se observaron cambios clínicamente significativos en el VEF₁ (definidos como una disminución con respecto al valor de referencia del 15 % o mayor) en ningún sujeto tratado con aztreonam. Un sujeto que fue tratado con placebo experimentó una disminución con respecto al valor de referencia del VEF₁ del 15,58 %. Esto fue publicado como un hecho adverso no relacionado con el tratamiento. No se observaron cambios clínicamente significativos en
40 ninguna otra medida de la seguridad (bien en los valores medios o individuales) considerados como relacionados con el tratamiento.

45 El objetivo del segundo estudio fue evaluar la tolerabilidad y la toxicidad de la formulación de lisinato de aztreonam en aerosol en el perro Beagle 28 días después de la administración repetida por inhalación y evaluar la reversibilidad de los efectos después de un período de recuperación de 14 días. La exposición a la inhalación se llevó a cabo usando un sistema de mascarilla cerrada con los perros respirando pasivamente de un nebulizador ultrasónico.

Las condiciones en las que se realizó el estudio se describen en el Ejemplo 11.

50 Los resultados globales de este estudio demuestran que la inhalación de lisinato de aztreonam nebulizado es segura y no se observaron signos clínicos adversos ni efectos relacionados con el tratamiento sobre el peso corporal, el consumo de alimentos, los resultados oftalmoscópicos, las lecturas de ECG, las investigaciones de laboratorio o el peso de los órganos.

55 No hubo hallazgos de necropsia o histológicos que pudieran atribuirse al tratamiento con aztreonam. Dado que la dosis humana prevista es de 75 mg, y el peso medio es de 75 kg, el margen de seguridad puede ser tan alto como de 200 veces más que la dosis humana.

Utilidad

60 El método de tratamiento y las composiciones de lisinato de aztreonam inhalables divulgadas en la presente memoria son adecuados para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio causadas por *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos, así como para el tratamiento de otras infecciones pulmonares causadas por bacterias gram negativas.
65

Ejemplo de referencia 1

Ensayos *in vitro* de aislados de pacientes con fibrosis quística

5 El presente ejemplo describe el procedimiento usado para estudios *in vitro* de aislados bacterianos obtenidos de pacientes con fibrosis quística.

Se cultivaron aislados bacterianos del tracto respiratorio (144) de pacientes con FQ que se habían almacenado a -70 °C mediante dos pases consecutivos durante una noche a 37 °C en agar de sangre al 5 % (Remel, Lenexa, KS).

10 Se determinaron las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) mediante las siguientes etapas:

Ensayos antimicrobianos de CIM en organismos aerobios

- 15 1. Se llevaron las bandejas de CIM hasta la temperatura ambiente.
2. Se inocularon 3,0 ml de solución salina fisiológica con un cultivo de 18-24 h del organismo por ensayar hasta una turbidez igual a un patrón de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Esto corresponde a una DO600 de 80-88 % de la transmisión.
3. A los 15 minutos de la preparación, se diluyó la suspensión de inóculo ajustada transfiriendo 100 ml a 2,9 ml de diluyente de agua estéril.
- 20 4. Se mezcló suavemente la suspensión por inversión y se dispensaron 10 ml en cada pocillo de CIM que tenían un volumen inicial de 100 μ l. La concentración final en cada pocillo fue igual a 5×10^5 UFC/ml o 5×10^4 UCF/pocillo.
5. Se incubaron las bandejas de forma aerobia a 37 °C durante 16-20 horas. Se mantuvo la misma temperatura de incubación para todos los cultivos. Las bandejas de microdilución no se apilaron a una altura de más de cuatro.
- 25 6. Se leyó el punto final antimicrobiano y se registró como el primer pocillo que no mostraba crecimiento fácilmente visible o turbidez según se detecta a simple vista.
7. Las bandejas de microdilución se pusieron en contacto con concentraciones del doble de lisinato de aztreonam de 2 a 2.048 mg/ml. Cada placa de micropocillos se trató con una dilución del doble de lisinato de aztreonam en las siguientes cantidades: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1.024 y 2.048 μ g/ml. Cada placa que contenía los micropocillos se usó para ensayar un aislado de un organismo.
- 30 8. Los resultados se leyeron y se registraron.

Ejemplo de referencia 2

35

Tratamiento clínico de paciente con *Burkholderia cepacia*

El presente ejemplo describe un primer hallazgo de eficacia del tratamiento de lisinato de aztreonam en aerosol de un paciente con fibrosis quística que padece *Burkholderia cepacia* resistente.

40

El paciente fue una mujer de 20 años de edad con fibrosis quística y enfermedad pulmonar en fase terminal. Se le habían diagnosticado infecciones pulmonares de *Burkholderia cepacia* que se habían vuelto resistentes a todos los antibióticos conocidos intravenosos, orales e inhalados. Tenía dos cepas documentadas genéticamente diferentes de *Burkholderia cepacia*. Por esta razón, se rechazó al paciente como candidato para un trasplante de pulmón.

45

Se administró al paciente una formulación de la invención que comprendía 200 mg/ml de lisinato de aztreonam y se le indicó que usara esta formulación en de 3 a 5 ml de diluyente y la usara en un nebulizador de inyección mejorado para la respiración impulsado por compresor de aire y tomara la terapia dos veces al día. Este tipo de nebulizador solamente administra aproximadamente del 10 al 20 % de la dosis situada en los nebulizadores a los pulmones, sin embargo, era el único nebulizador disponible para que el paciente recibiera el tratamiento en casa.

50

Después de tres meses de terapia continua de dos veces al día, se consiguió tratar satisfactoriamente la infección pulmonar y no se pudieron detectar pruebas de *Burkholderia cepacia*. Se consideró a la paciente tratada de la infección y con el tiempo se sometió a un procedimiento de trasplante de pulmón exitoso.

55

No hubo reaparición ni recaída postoperatoria de la infección de *Burkholderia cepacia* a pesar de la terapia de inmunosupresión intensiva después del trasplante.

60

Estos hallazgos fueron sorprendentes, puesto que el uso previo del lisinato de aztreonam disponible en el mercado en una generación de mayor edad administrado en nebulizadores aún menos eficaces no condujo a la erradicación de *P. aeruginosa* como se describe en *Clinics Chest Med.*, 19: 473-86 (sep. 1998). En ese ensayo, los autores detuvieron la terapia en el desarrollo de cualquier resistencia al lisinato de aztreonam en lugar de continuar tratando a estos pacientes. El trabajo anterior no ensayó ni especuló que esta terapia pudiera ser eficaz en el tratamiento de otras bacterias gram negativas incluyendo *Burkholderia cepacia*, *S. maltophilia*, *X. xylosoxidans* u otras infecciones de *pseudomonas* resistentes a múltiples fármacos.

65

Los resultados obtenidos con el tratamiento del paciente anterior son incluso más sorprendentes en tanto que la erradicación de *Burkholderia cepacia* es una situación extremadamente rara, particularmente cuando la infección está bien establecida como era el caso de esta paciente.

5 Ejemplo 3

Preparación de polvo seco de lisinato de aztreonam

10 El presente ejemplo proporciona métodos y procedimientos usados para la preparación de polvo seco inhalable que contiene lisinato de aztreonam.

Para la formulación en polvo seco, se muele un lisinato de aztreonam purificado hasta obtenerse un polvo que tenga diámetros aerodinámicos de la mediana de masa que varían de 1 a 5 μm por técnicas de molienda con medios, molienda de inyección, secado por pulverización o de precipitación de partículas.

15 Las determinaciones del tamaño de partícula se realizan usando impactador de cascada de Anderson multietapa.

La molienda con medios se puede realizar situando el fármaco en un molino que contenga, por ejemplo, bolas de acero inoxidable o cerámica y rotando o volteando el material hasta que se consiguen los intervalos de tamaño de partícula deseados del fármaco.

La molienda de inyección usa corrientes de aire de muy alta presión para hacer chocar las partículas entre sí, recuperándose partículas finas del tamaño deseado del molino.

25 El secado por pulverización se realiza pulverizando una bruma fina de solución farmacológica en un soporte y secando las partículas. Luego se recogen las partículas.

La precipitación de partículas se realiza añadiendo un codisolvente a las partículas secadas por pulverización. La solubilidad del fármaco se reduce hasta el punto donde se forman partículas del fármaco sólidas. Las partículas se recogen por filtración o centrifugación. La precipitación tiene la ventaja de ser altamente reproducible y puede realizarse en condiciones de baja temperatura, lo que reduce la degradación.

30 Ejemplo 4

35 Inhaladores de polvo seco

Las formulaciones de polvo seco y de dosis medida preparadas de acuerdo con la invención se pueden usar directamente en o inhaladores de polvo seco y de dosis medida.

40 Un inhalador de dosis medida consiste en tres componentes: un recipiente que contiene la suspensión de fármaco propulsora, una válvula de medición diseñada para administrar volúmenes medidos de forma precisa de la suspensión propulsora y un adaptador oral que contiene un orificio de pulverización desde el que se administra la dosis medida. En la posición de reposo, la cámara de medición de la válvula se conecta al depósito de suspensión del fármaco mediante una ranura u orificio de relleno. En la depresión de la válvula, esta ranura de relleno se sella y la cámara de medición se expone a la presión atmosférica mediante el orificio de pulverización en el adaptador oral y el orificio del vástago de la válvula. Esta reducción rápida de la presión conduce a la ebullición ultra rápida del propulsor y a la expulsión de la mezcla en expansión rápida de la cámara de medición. La mezcla de líquido/vapor entra después en la cámara de expansión que está constituida por el volumen interno del vástago de la válvula y el adaptador oral. La mezcla experimenta una expansión adicional antes de expulsarse, bajo su propia presión, desde la boquilla de pulverizador. Al salir del orificio de pulverización, los ligamentos líquidos que están incluidos en el vapor propulsor se rompen por fuerzas aerodinámicas. En general, en esta etapa, las gotas son de 20 a 30 μm de diámetro y se mueven a la velocidad del sonido de la mezcla líquida de vapor de dos fases (aproximadamente 30 metros por segundo). A medida que la nube de gotas se aleja de la boquilla de pulverización, arrastra aire del entorno y desacelera, mientras que el propulsor se evapora a través de evaporación y las gotas arrastradas alcanzan con el tiempo su diámetro residual.

En este momento, las partículas/gotas consisten en un núcleo de fármaco en polvo recubierto de tensioactivo. Dependiendo de la concentración y del tamaño del material en suspensión, el núcleo de fármaco en polvo consiste en partículas de fármaco individuales o agregados. En la actualidad, la tecnología del inhalador de dosis medidas está optimizada para administrar masas de 80 a 100 microgramos de fármaco, con una limitación superior de 1 mg de fármaco administrable.

Una vía alternativa de administración de polvo seco es por inhaladores de polvo seco. Existen dos diseños principales de inhaladores de polvo seco, diseños de medición de dispositivo, en los que un recipiente de fármaco se almacena dentro del dispositivo y el paciente "carga" una dosis del dispositivo en la cámara de inhalación, y los dispositivos de dosis medida en fábrica en los que cada dosis individual se ha fabricado en un recipiente separado.

5 Ambos sistemas dependen de la formulación del fármaco en partículas pequeñas de diámetros de la mediana de masa de 1 a 5 micrómetros, y habitualmente implican la coformulación con partículas excipientes grandes (normalmente, partículas de lactosa de 100 micrómetros de diámetro). El polvo seco se proporciona en la cámara de inhalación (bien por medición de dispositivo o por rotura de una dosificación de dosis medida en fábrica) y el flujo de inspiración del paciente acelera el polvo fuera del dispositivo y hacia la cavidad oral. Las características de flujo no laminar de la trayectoria del polvo provocan que el agregado de fármaco-excipiente se descomponga y la masa de las partículas grandes de excipiente causen su impacto en la parte posterior de la garganta, mientras que las partículas de fármaco del inhalador se depositan en profundidad en los pulmones. La tecnología actual para inhaladores de polvo seco es tal que los límites de carga útil son de aproximadamente 50 mg de polvo (de los que el fármaco es habitualmente un componente parcial en masa). Los excipientes habitualmente usados son lactosa, sin embargo, en el presente caso, el aztreonam se hace reaccionar con el aminoácido lisina y tal reacción conduce a una mejor formación de polvo y a una formulación en polvo más estable.

15 Los niveles de dosificación eficaces de antibiótico de lisinato de aztreonam para inhalación de polvo seco e inhalación de dosis medida dan como resultado la administración de al menos aproximadamente 25 mg y más preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mg de lisinato de aztreonam en el pulmón del paciente que recibe el tratamiento. Dependiendo de la eficacia del dispositivo de administración de polvo seco, las formulaciones en polvo seco adecuadas para su uso en la invención comprenden de aproximadamente 1,0 a 20 aproximadamente 250 mg, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg de polvo en un estado amorfo o cristalino en tamaños de partícula de entre 1 y 5 micrómetros de diámetro aerodinámico de la mediana de masa necesarios para la administración eficaz del antibiótico en el espacio endobronquial.

Ejemplo 5

25 Preparación de polvo de lisinato de aztreonam

El presente ejemplo describe el procedimiento usado para la preparación de polvo de lisinato de aztreonam. A una solución de 10 g (23 mmol) de lisinato de aztreonam en 100 ml de MeOH enfriada en un baño de hielo, se añadieron 23 ml (23 mmol, 1,0 equiv.) en gotas de solución de hidróxido sódico 1 N. Se calentó la solución resultante hasta la temperatura ambiente durante un período de 30 min y después se retiró el disolvente a presión reducida. Se añadió dietiléter (50 ml) y se concentró la suspensión. Se repitió esta etapa cuatro veces para proporcionar un rendimiento de 10,1 g (96 %) de sal de lisinato de aztreonam en forma de un polvo blanco.

35 Ejemplo 6

Formulación y secado por pulverización de lisinato de aztreonam

35 Se suspendió aztreonam (aztreonam α , 29,4 g con 15 % de humedad, equivalente a 25,0 g de anhidro), y agitó rápidamente en agua (190 ml) y se enfrió con un baño de hielo triturado. Se valoró L-lisina (anhidra, 17,7 g, disuelta en 40 ml de agua a temperatura ambiente) durante 6 minutos a la suspensión blanca lechosa, obteniéndose un pH de 4,34. El volumen total de la solución de lisinato de aztreonam fue de aproximadamente 270 ml y tenía un color amarillo a marrón claro. Se añadió aproximadamente 1 g de carbón vegetal a la solución en agitación y luego se filtró. Se mantuvo la solución de lisinato de aztreonam a 2 a 10 °C. Se realizó el secado por pulverización, dando un rendimiento de 22,2 g (56 %) de lisinato de aztreonam. A continuación, se ilustra un método no optimizado para el secado por pulverización:

Configuración de entrada: 135 °C.

Aspirador: 90 % (un valor del 100 % = 35 metros cúbicos/h)

Bomba: 34 % (un valor del 100 % = 1.500 ml/h).

50 Flujo de Ar en la boquilla: 400 l/h inicial; a mitad de la serie aumentó hasta 600 l/h.

Temperatura del matraz receptor: 35 a 40 °C.

Ejemplo de referencia 7

55 Nebulizadores de ensayo

El presente ejemplo describe la prueba de los nebulizadores en condiciones clínicas para determinar la dosis que se va a usar en cada uno.

60 Se realiza un estudio clínico para determinar la concentración de lisinato de aztreonam en la formulación de aerosol requerida para conseguir una concentración en el esputo e entre 500 $\mu\text{g/g}$ y 2.000 $\mu\text{g/g}$ de esputo a los 10 min de finalizar la administración en aerosol usando un nebulizador de atomización, ultrasónico o de inyección.

65 En este estudio, los pacientes con fibrosis quística reciben dosis seriadas de múltiplos de 75 mg de aztreonam (1 ml de una solución de 75 mg/ml en 1/4 SN) de cada uno de los nebulizadores. Las dosis se separan en al menos 2 días y no más de 5 días. Se evalúan las concentraciones máximas en esputo y suero.

Ejemplo de referencia 8Prueba de la actividad inhibidora en esputo

5 El presente ejemplo describe las condiciones usadas para analizar la actividad inhibidora del lisinato de aztreonam y la tobramicina en esputo o mucina gástrica de cerdo.

Reactivos

10 A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos fueron adquiridos en Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), y todas las soluciones se prepararon en agua desionizada estéril. El aztreonam (Azactam®) se obtuvo en Elan Biopharmaceuticals. El lisinato de aztreonam se preparó en Corus Pharma, Seattle, WA. Las soluciones madre de trabajo de aztreonam y lisinato de aztreonam se prepararon en agua desionizada estéril y se usaron de inmediato.

Medio de cultivo

20 El caldo Mueller Hinton con ajuste de cationes divalentes (CAMHB) se adquirió en PML y se usó como el medio de crecimiento del estudio para *P. aeruginosa* y como el medio de crecimiento ensayo.

Espuito

25 El esputo se obtuvo de niños y adultos con FQ que no estuvieron recibiendo ningún otro fármaco antimicrobiano durante al menos 48 horas antes de la recogida de la muestra. El esputo se esterilizó mediante agitación con un agitador magnético bajo luz UV durante 4 horas. La esterilidad se analizó mediante la inoculación de 100 μ l de esputo en 10 ml de CAMHB un medio de fila y la incubación durante toda la noche. Se examinó la turbidez del cultivo resultante y se sembraron 100 ml en placas de agar Luria para asegurar la esterilidad. Las muestras de esputo se mantuvieron congelados a -20 °C hasta su uso.

Organismos

35 Se usaron subcultivos recién preparados de la cepa de *P. aeruginosa* PA27853 para cada experimento. Se cultivó patrón de congelador en placas de agar Luria (Sigma L-3522) durante una noche a 37 °C. Se recogió una sola colonia y se inoculó en 5 ml de CAMHB, y se dejó crecer durante 16 horas a 37 °C con agitación a 250 rpm. Se diluyó este cultivo de una noche 1:10.000 en CAMHB recién preparado o en CAMHB recién preparado suplementado con mucina gástrica porcina al 10 % (p/v) (Sigma M-1778), a continuación, esputo con FQ esterilizado al 1 % o de autoclave.

Curvas de destrucción

45 Se cultivó *P. aeruginosa* (densidad inicial $\sim 10^6$ UFC/ml) en cultivo durante una noche y se diluyó 1:10.000 en caldo. Se dividió cada dilución en 4 tubos (10 ml por tubo) y se añadió antibiótico a cada tubo hasta una concentración final de 0; 0,1; 1 y 10 veces la CIM para la cepa PA27853 (4 μ g/ml para el aztreonam, 1,56 μ g/ml para la tobramicina, determinada mediante métodos convencionales). Se incubó cada tubo a 37 °C con agitación a 250 rpm. Cada hora, se retiraron las muestras del tubo, se diluyeron y se sembraron en agar Luria para la cuantificación. Las placas se incubaron durante una noche a 37 °C y se contaron las colonias a mano.

Ejemplo de referencia 9Protocolo de ensayo clínico

50 El presente ejemplo describe un protocolo usado para el ensayo clínico y para comparar la farmacocinética de la dosificación creciente de una formulación de lisinato de aztreonam administrada por el nebulizador electrónico PARI a pacientes con fibrosis quística.

60 El objetivo principal del presente estudio es determinar cuál de los niveles de dosis ensayados administrados por aerosol puede administrar suficiente cantidad de lisinato de aztreonam para conseguir una concentración de lisinato de aztreonam en esputo máxima media de 1.000 μ g/g o mayor medida 10 minutos después de finalizar la nebulización en pacientes con FQ.

El objetivo secundario es determinar si la concentración de lisinato de aztreonam requerida para conseguir una concentración de esputo máxima media de 1.000 μ g/g o mayor es segura y se tolera bien por el paciente.

Diseño del estudio

65

Éste fue un estudio abierto, de escalado de la dosis multicentro, aleatorio.

Cada rama contenía una dosis diferente. Dos ramas administraron la misma formulación de lisinato de aztreonam.

- 5
1. 1,0 ml de solución de lisinato de aztreonam de 75 mg/ml.
 2. 2,0 ml de solución de lisinato de aztreonam de 75 mg/ml.
 3. 3,0 ml de solución de lisinato de aztreonam de 75 mg/ml.

Evaluación de la eficacia y la seguridad

10

En el presente estudio, se evaluaron los siguientes parámetros de eficacia y seguridad:

La eficacia se determinó para cada nebulizador midiendo la concentración de lisinato de aztreonam en el esputo 10 minutos después completarse la nebulización. La concentración media de 1.000 µg/g de esputo se consideró adecuada.

15

Los parámetros de seguridad evaluaron:

- 20
1. La incidencia de reacciones adversas relacionadas con el tratamiento que se produjeron durante la administración del lisinato de aztreonam en aerosol a los diferentes niveles de dosis.
 2. Broncoespasmos agudos en el momento de la administración del fármaco.
 3. Absorción de lisinato de aztreonam en la circulación sistémica.

25

Cada paciente recibió en orden aleatorio al menos una administración. Cada administración de aerosol se separó un mínimo de 48 h. Se recogieron las muestras de esputo en el momento inicial, 1, 2, 4 y 6 horas después de completarse la administración del fármaco en aerosol para medir la concentración de lisinato de aztreonam. Las muestras de suero se recogieron en el momento inicial, 1, 2, 4 y 6 horas después de completarse la administración de aerosol para medir los niveles de lisinato de aztreonam.

30

Se evaluaron la irritación de las vías respiratorias y el broncoespasmo agudo midiendo la espirometría inmediatamente antes y 30 min después de completarse la administración del aerosol. Una reducción en el volumen espirado forzado en un segundo (VEF1) >15 % en el ensayo de espirometría de 30 min se considera prueba de broncoespasmos.

35

El objetivo principal del presente estudio era determinar si y en qué dosis el nebulizador electrónico PARI ensayado puede administrar en aerosol suficiente sulfato de lisinato de aztreonam para conseguir una concentración máxima media de lisinato de aztreonam en esputo de 1.000 µg/g o mayor en al menos el 85 % de los pacientes con FQ medida a los 10 minutos de finalizar la nebulización para determinar si la concentración de lisinato de aztreonam requerida para alcanzar la concentración máxima media en esputo de 1.000 µg/g o superior es segura y bien tolerada por el paciente. La seguridad se define como una falta de broncoespasmo agudo y absorción sistémica mínima.

40

Tratamiento del paciente

45

Todos los pacientes con enfermedad subyacente de fibrosis quística (FQ), confirmados en la entrada por los criterios de inclusión/exclusión especificados en el presente protocolo, eran idóneos para su admisión en el estudio. Los investigadores de los centros de FQ participantes seleccionaron pacientes que cumplieran todos los criterios de inclusión y uno de los criterios de exclusión.

50

Los pacientes idóneos fueron admitidos en el centro de estudio el día del estudio y recibieron terapia de aerosol si cumplían los criterios de entrada.

Se realiza un examen físico por un médico o enfermero RC antes del tratamiento con aerosol inicial solamente.

55

Se usaron signos vitales, altura, peso, oximetría, evaluación de estado respiratorio actual y breve historial médico. Se recogieron muestras de esputo y suero para medir las concentraciones de lisinato de aztreonam en el momento inicial.

60

Los pacientes se sentaron erguidos y usaron pinzas nasales durante la administración del aerosol.

Se registraron la duración total del tiempo y el número de inhalaciones requerido para completar el tratamiento de aerosol.

65

Se registra cualquier prueba de distrés respiratorio o sibilancia, así como el número de períodos de descanso requeridos por el sujeto debido a disnea o tos excesiva durante el período de administración.

Inmediatamente después de completarse la terapia de aerosol, el sujeto se enjuagó la boca con 30 ml de solución salina normal, realizó gargarismos durante 5-10 segundos y expectoró el enjuague. Esto se repitió para un total de tres enjuagues.

- 5 Las muestras de ensayo de esputo se recogieron a los 10 minutos de enjuagarse la cavidad oral y 2 horas después de completarse la administración del fármaco en aerosol.

Se recogió el suero 1 y 2 horas después de completarse la administración de fármaco en aerosol para la determinación de los niveles de lisinato de aztreonam.

10

Se obtuvo espirometría 30 minutos después de completarse la administración del fármaco en aerosol.

Después del último tratamiento de aerosol del estudio, los pacientes fueron sometidos a un breve examen físico después de haberse medido la post-espirometría.

15

Ejemplo de referencia 10

Ensayos clínicos de seguridad

- 20 El presente ejemplo describe el protocolo clínico usado para el ensayo clínico de seguridad con lisinato de aztreonam.

Nombre del producto acabado: Aztreonam para inhalación

Nombre del principio activo: Lisinato de aztreonam

25

El presente ensayo fue un ensayo controlado aleatorio, doble ciego, con placebo para evaluar la seguridad y tolerabilidad del lisinato de aztreonam inhalado en voluntarios sanos de ambos sexos.

El objetivo principal fue determinar la seguridad y tolerabilidad de 3 dosis crecientes de aztreonam para inhalación en voluntarios de ambos sexos.

30

Metodología

Los sujetos se seleccionaron para su inclusión en el ensayo hasta 21 días antes de la dosificación y su idoneidad se confirmó en la visita 1 días. Los sujetos fueron ingresados en la clínica en la mañana del día previo a la dosificación (Día -1). En cada uno de los 3 grupos de tratamientos que recibieron 95 mg, 190 mg y 285 mg de aztreonam inhalado, los sujetos fueron asignados al azar bien al tratamiento activo (6 sujetos) o al placebo (2 sujetos). La progresión a la dosis de 190 mg y 285 mg se produjo solo cuando se hubieron evaluado los datos ciegos de seguridad de los grupos de 95 mg y 190 mg, respectivamente. En la mañana del día 1, los sujetos se administraron su medicación del ensayo asignado por inhalación usando un nebulizador eFlow™IMP (PARI). Los sujetos permanecieron en la clínica durante 24 horas después de la dosis y volvieron 3 días después de la administración para una visita de seguimiento. La seguridad se controló durante todo el ensayo.

35

40

Número de sujetos

- 45 Se reclutaron 24 sujetos (3 grupos de 8 sujetos) y los 24 fueron incluidos en el análisis de la seguridad.

Diagnóstico y principales criterios para la inclusión

Los sujetos eran hombres o mujeres no fumadores, de entre 18 y 55 años de edad, con un peso de entre 50 y 100 kg, con un índice de masa corporal de 18 a 28 kg.m⁻², con un resultado negativo en el test de Coombs y un volumen espiratorio forzado en un segundo (VEF₁) de al menos el 80 % del normal predicho.

50

Producto de ensayo, dosis y modo de administración

- 55 El sujeto se administró el placebo (1, 2 o 3 ml de solución salina estéril al 0,9 %; fabricada por Phoenix Pharma) en las vías respiratorias usando un nebulizador eFlow™IMP (PARI).

Seguridad

- 60 Los eventos adversos, los datos de laboratorio (hematología, química clínica, test de Coombs, coagulación y prueba de embarazo para las mujeres en edad fértil), análisis de orina, signos vitales, ECG, examen físico (incluyendo la auscultación del pecho) y las pruebas de función pulmonar.

Resultados de seguridad

65

No se registraron hechos adversos graves durante el ensayo y ningún sujeto se retiró del estudio debido a un hecho

adverso.

Ejemplo de referencia 11

5 Estudio de seguridad con perros Beagle

El presente ejemplo describe las condiciones usadas para los estudios de seguridad con perros Beagle.

Se asignaron dieciséis perros Beagle de ambos sexos a 4 grupos de dosis y se trataron de la siguiente manera:

10

Grupo de dosis/Tratamiento	Niveles de dosis diana (mg.kg ⁻¹ .día ⁻¹)		Número de animales/asignación		
	Total	Pulmonar		Machos	Hembras
1 – Control de vehículo	0	0	Estudio principal Recuperación	1-3 4-5	17-19 20-21
2- Dosis baja	40	8	Estudio principal	6-8	22-24
3 – Dosis intermedia	80	16	Estudio principal	9-11	25-27
4- Dosis alta	200	40	Estudio principal	12-14 15-16	28-30 31-32

15

Durante las fases previas al ensayo y de recuperación del estudio, los animales fueron controlados al menos una vez al día en busca de signos clínicos adversos. Durante el período de tratamiento, todos los animales fueron examinados en busca de signos clínicos adversos antes de la exposición, de forma continua durante la exposición y 1-2 horas después de la exposición. Se registraron los pesos corporales semanalmente, mientras que el consumo de alimentos se controló diariamente hasta el final del período de estudio.

20

Los exámenes oftalmoscópicos se llevaron a cabo una vez antes del ensayo, durante la semana 4 de tratamiento y hacia el final del período de recuperación de 14 días para los animales designados. Se registraron electrocardiogramas una vez antes del ensayo, en los Días 2 y 28 del tratamiento y, en los animales de recuperación designados, hacia el final del período de recuperación de 14 días.

25

Las muestras de sangre y orina para las investigaciones sobre la hematología rutinaria, la química clínica y el análisis de orina se obtuvieron de todos los animales una vez antes del ensayo, durante la Semana 4 del tratamiento, y de los animales de recuperación designados, hacia el final del período de recuperación de 14 días. Las muestras de sangre para el análisis toxicocinético se obtuvieron de todos los animales de los Grupos 2, 3 y 4 en los días 1 y 27 de la exposición en los siguientes puntos de tiempo específicos: antes de la dosis, inmediatamente después de la dosis (IPD) y a las 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 y 24 h después de la dosis. Se recogieron muestras de animales del Grupo 1 antes de la dosis e inmediatamente después de la dosis. Las muestras de orina para el análisis toxicocinético se obtuvieron de todos los animales en los días 1 y 27 de la exposición durante un período de 24 h.

30

Al finalizar el período de tratamiento de 28/29 días o el período de recuperación de 14 días, todos los animales fueron sometidos a una necropsia detallada con el registro del peso de los órganos. La evaluación microscópica se realizó en una lista completa de tejidos.

35

Las dosis alcanzadas medias estimadas de 0; 53,0; 94,3 y 194,7 mg.kg⁻¹.día⁻¹ (dosis pulmonares medias estimadas de 0; 10,6; 18,9 y 38,9 mg.kg⁻¹.día⁻¹) se lograron para los Grupos de 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Las mediciones de la distribución del tamaño de partícula indicaron que el aztreonam en aerosol era respirable para los perros.

40

El tratamiento descrito en la presente memoria fue un método seguro para cualquier signo de reacción adversa.

Ejemplo 12

45 Preparación de sal de lisinato de aztreonam α

El presente ejemplo describe el procedimiento usado para la preparación de sal de lisinato de aztreonam α .

50

Se suspendió aztreonam α (29,4 g con 15 % de humedad, equivalente a 25,0 g de anhídrido), y agitó rápidamente en agua (190 ml) y se enfrió con un baño de hielo triturado. Se valoró L-lisina (anhídrido, 17,7 g, disuelta en 40 ml de agua a temperatura ambiente) durante 6 minutos a la suspensión blanca lechosa, obteniéndose un pH de 4,34. El volumen total de la solución de lisinato de aztreonam fue de aproximadamente 270 ml y tenía un color amarillento

sin materia particulada. Se añadió aproximadamente 1 g de carbón vegetal a la solución en agitación y luego se filtró. Se almacenó la solución de lisinato de aztreonam α a la temperatura de 2 °C.

Ejemplo 13

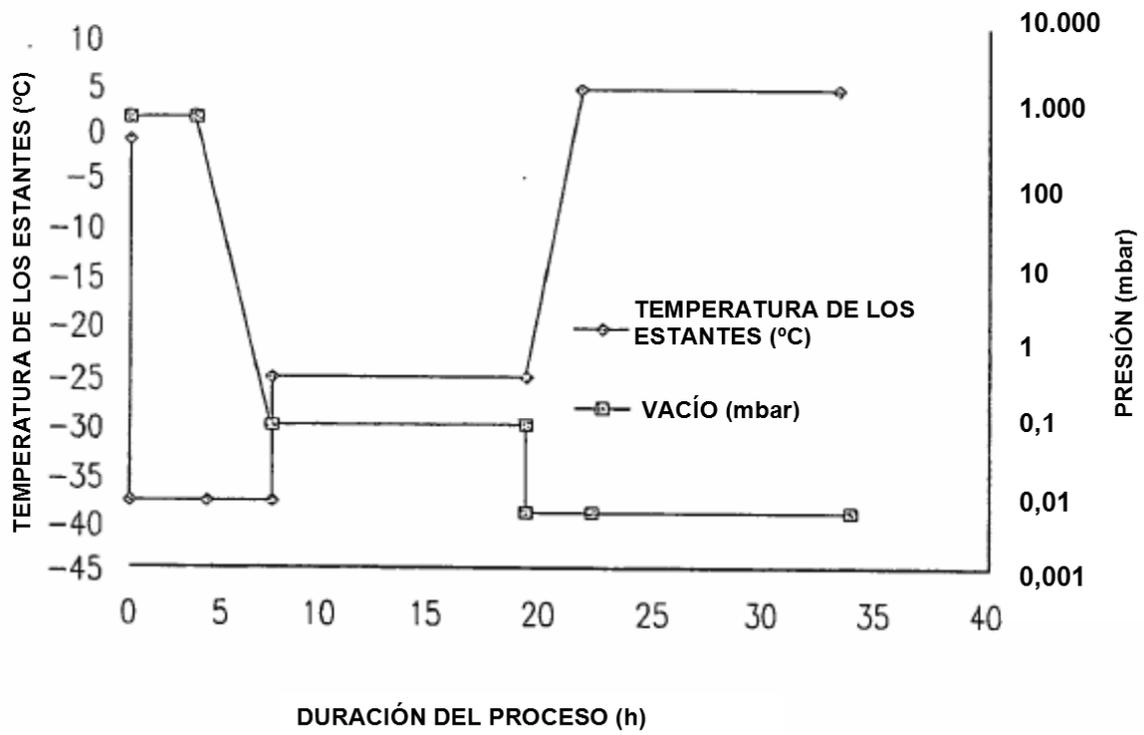
- 5 Secado por pulverización del lisinato de aztreonam α
- El presente ejemplo describe las condiciones usadas para el secado por pulverización de lisinato de aztreonam α .
- 10 El secado por pulverización del lisinato de aztreonam α se realizó pulverizando una niebla fina de solución de lisinato de aztreonam α sobre un soporte y secando al vacío. Se recogen las partículas secas, dando un rendimiento de 22,2 g (56 %) de lisinato de aztreonam α .
Método optimizado para el secado por pulverización:
Configuración de entrada: 135 °C.
- 15 Aspirador: 90 % (un valor del 100 % = 35 metros cúbicos/h)
Bomba: 34 % (un valor del 100 % = 1.500 ml/h).
Flujo de Ar en la boquilla: 400 l/h inicial; a mitad de la serie aumentó hasta 600 l/h.
Temperatura del matraz receptor: 35 a 40 °C.

20

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de una formulación de polvo seco inhalable de lisinato de aztreonam que consiste en lisinato de aztreonam, proceso que comprende las etapas de:
- 5 a) disolver la forma alfa de aztreonam en agua para formar una suspensión;
b) valorar una solución acuosa de lisina para formar lisinato de aztreonam en solución; y
c) secar el lisinato de aztreonam de la solución por liofilización o secado por pulverización; y donde el lisinato de aztreonam es molido, precipitado, secado por pulverización o procesado de otro modo hasta obtenerse un
- 10 tamaño de partícula de 1 a 5 micrómetros.
2. El proceso de la reivindicación 1, donde la molienda es realizada mediante molienda con medios hasta obtenerse un polvo que tiene un diámetro promedio de la mediana de masa de entre 1 y 5 micrómetros,
- 15 3. El proceso de la reivindicación 1, donde la molienda es realizada mediante molienda de inyección hasta obtenerse un polvo que tiene un diámetro promedio de la mediana de masa de 1 a 5 micrómetros.
4. El proceso de la reivindicación 1, donde el secado del lisinato de aztreonam es realizado mediante secado por pulverización.
- 20 5. El proceso de la reivindicación 1, donde el tamaño de partícula es alcanzado mediante técnicas de precipitación de partículas hasta un polvo que tiene un diámetro promedio de la mediana de masa de 1 a 5 micrómetros.
6. El proceso de la reivindicación 1, donde el secado del lisinato de aztreonam es realizado mediante liofilización.
- 25 7. El proceso de la reivindicación 1, donde la composición de aztreonam disuelta es mantenida a un pH inferior a 6.
8. El proceso de la reivindicación 1 llevado a cabo a una temperatura de 2 a 20 °C.
- 30 9. El proceso de la reivindicación 8 llevado a cabo a una temperatura de 2 a 8 °C.
10. El proceso de la reivindicación 7, donde la composición de aztreonam disuelta es mantenida a un pH de entre 4,6 y 4,8.
- 35 11. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que un depósito de la formulación de polvo seco de lisinato de aztreonam es colocado en un dispositivo adecuado para administrar el polvo seco directamente en los pulmones.
- 40 12. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que una dosis individual de la formulación de polvo seco inhalable de lisinato de aztreonam es fabricada en un recipiente.

FIG. 1



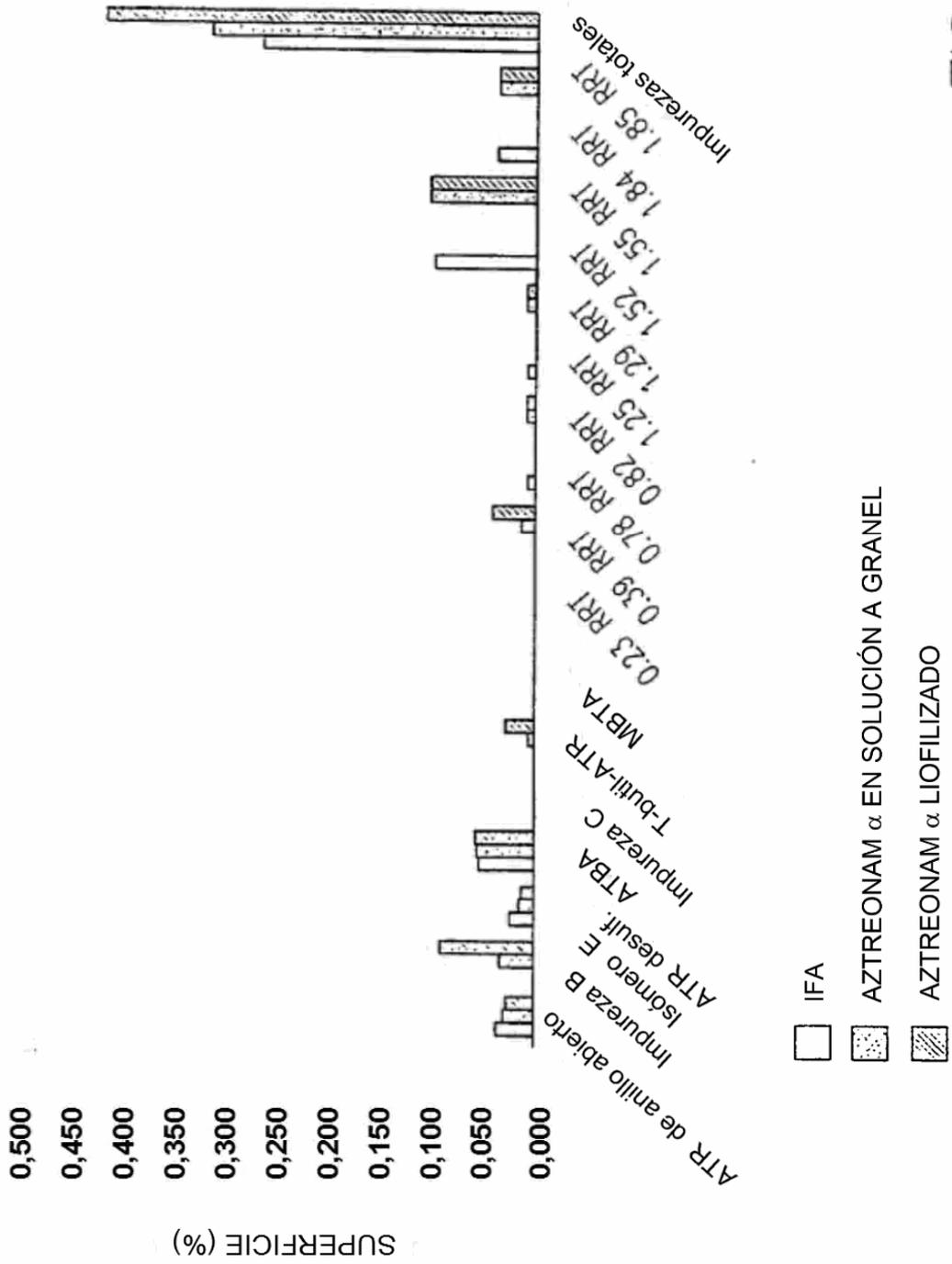


FIG. 2

PROCESO DE FABRICACIÓN I

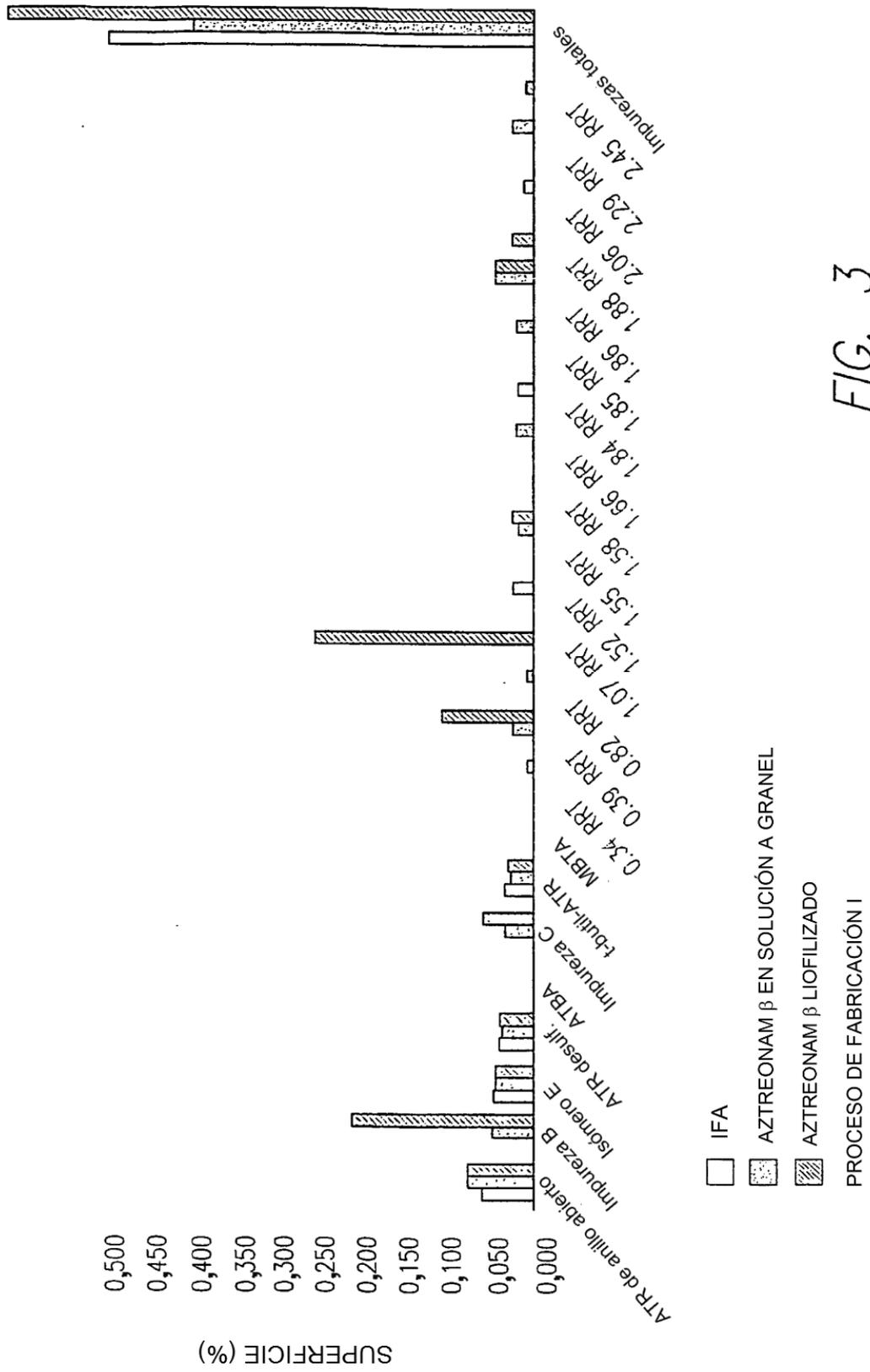


FIG. 3

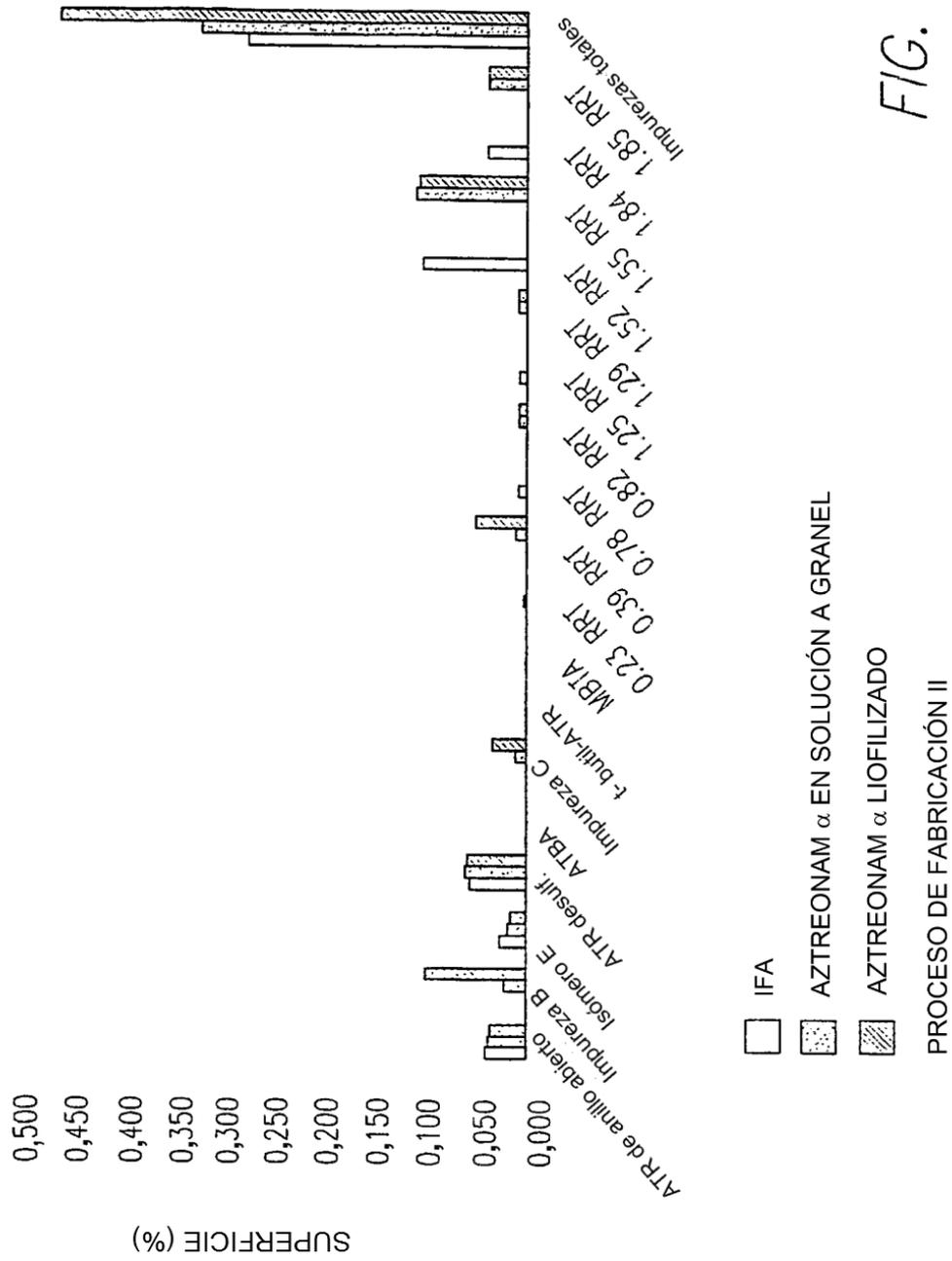


FIG. 4

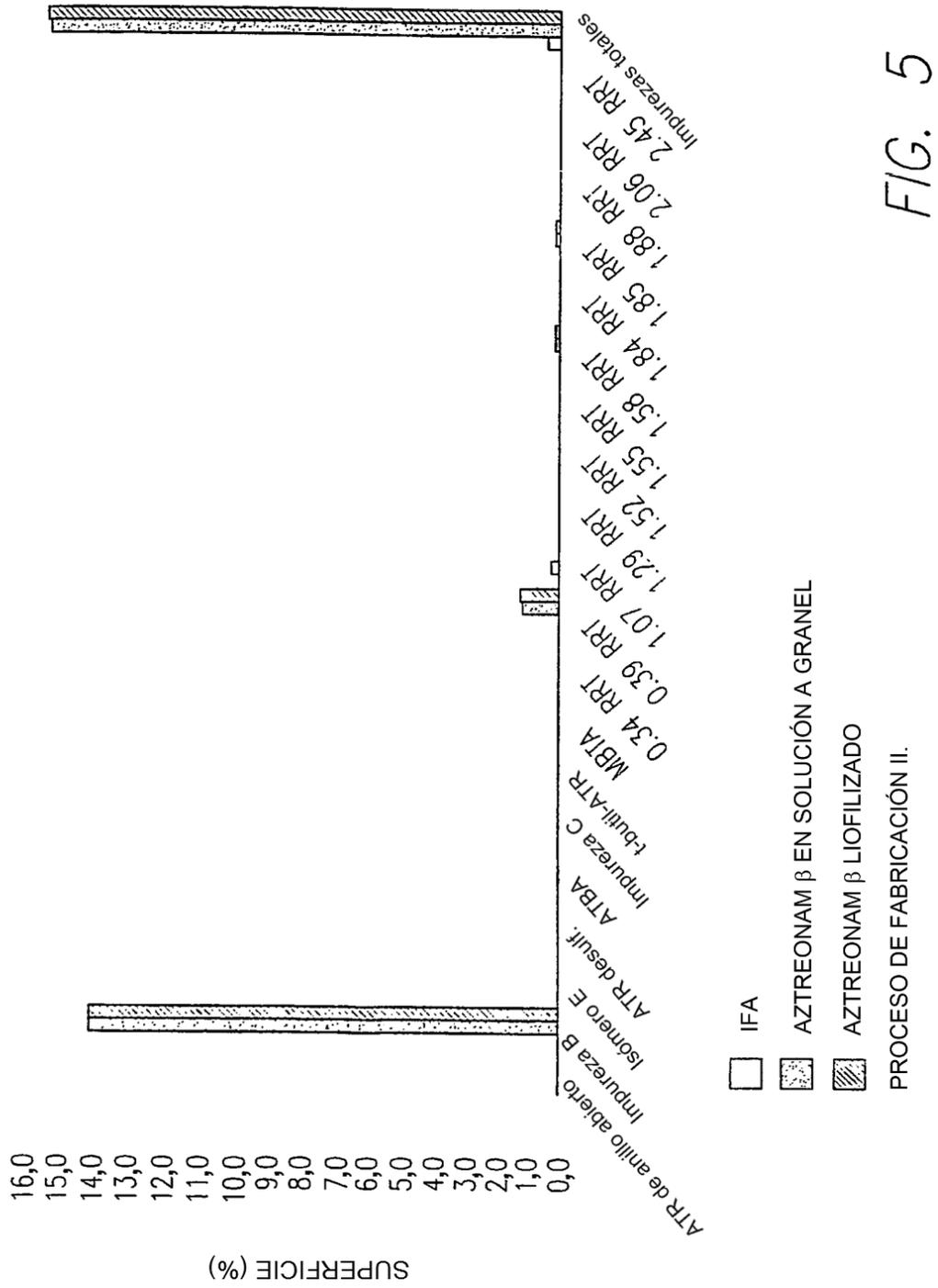


FIG. 5

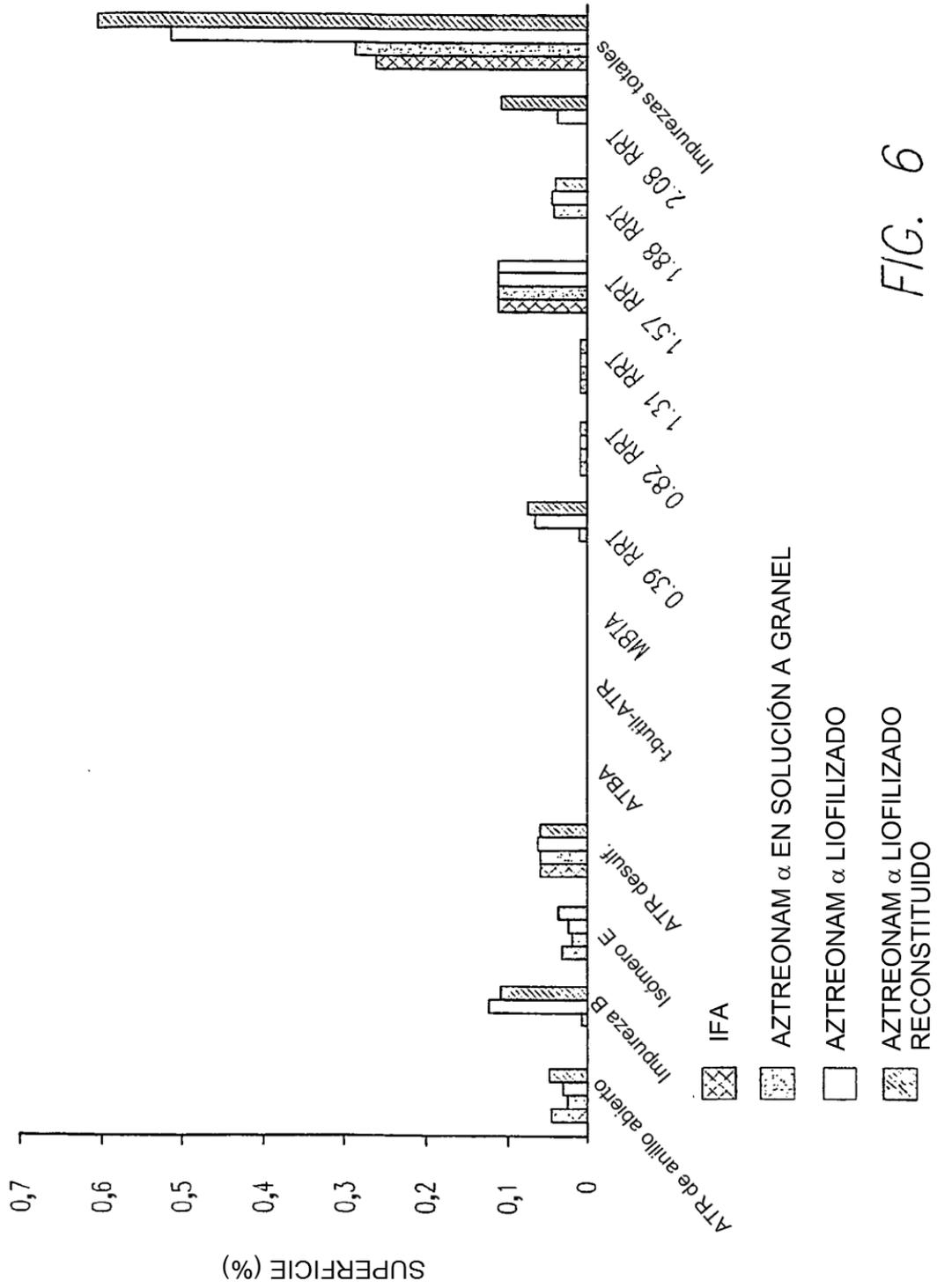


FIG. 6

PROCESO DE FABRICACIÓN II

FIG. 7A

FIG. 7B

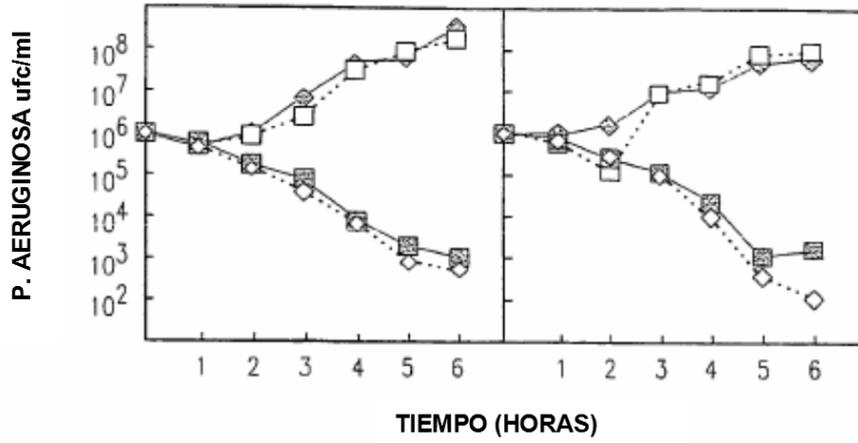


FIG. 8A

FIG. 8B

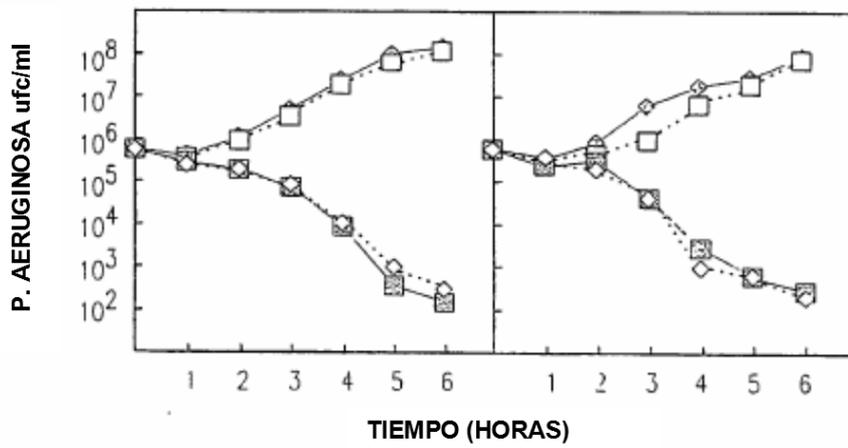


FIG. 9A FIG. 9B

