

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo farmacéutico de formulaciones pulmonares y
orales de anfotericina con acción antifúngica y antiparasitaria**

**Pharmaceutical development of pulmonary and oral
amphotericin B formulations with antifungal and
antiparasitic efficacy**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Esther de Pablo Tomero

Directora

**Dolores Remedios Serrano López
Juan José Torrado Durán
M^a Paloma Ballesteros Papantonakis**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO FARMACÉUTICO DE FORMULACIONES PULMONARES Y
ORALES DE ANFOTERICINA B CON ACCIÓN ANTIFÚNGICA Y
ANTIPARASITARIA**

**PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF PULMONARY AND ORAL
AMPHOTERICIN B FORMULATIONS WITH ANTIFUNGAL AND
ANTIPARASITIC EFFICACY**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR:

Esther de Pablo Tomero

Directores:

Dra. Dolores Remedios Serrano López

Dr. Juan José Torrado Durán

Dra. M^a Paloma Ballesteros Papantonakis

DESARROLLO FARMACÉUTICO DE FORMULACIONES PULMONARES Y ORALES DE ANFOTERICINA B CON ACCIÓN ANTIFÚNGICA Y ANTIPARASITARIA

PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF PULMONARY AND ORAL AMPHOTERICIN B FORMULATIONS WITH ANTIFUNGAL AND ANTIPARASITIC EFFICACY

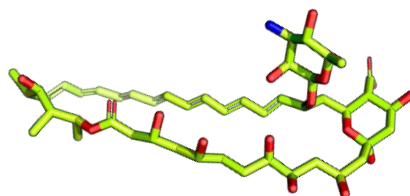
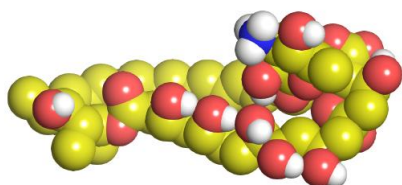
Esther de Pablo Tomero

Directores:

Dra. Dolores Remedios Serrano López

Dr. Juan José Torrado Durán

Dra. M^a Paloma Ballesteros Papantonakis



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**

Doctorado en Farmacia- Mención Internacional

Madrid, 2022

Agradecimientos

Quisiera dedicar la finalización de esta Tesis Doctoral a todas aquellas personas que de una manera o de otra se han ido cruzando en mi camino a lo largo de este proceso, sin los cuales no hubiera sido posible alcanzar esta meta.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte inestimable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora. Les agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Gracias siempre a mi familia, por estar a mi lado, por su cariño y por creer en mí. A mis padres y mi hermano por su apoyo incondicional a lo largo de este camino, por transmitirme motivación y esperanza día a día, a quienes jamás encontraré la forma de agradecer el cariño, comprensión y apoyo brindado en todo momento.

En especial, a mis abuelos, al igual que todos mis logros, se lo dedico a ellos.

Índice:

Abreviaturas	11
Resumen/Summary	13
Introducción	18
1. Anfotericina B	18
1.1. Historia	18
1.2. Estructura	18
1.3. Propiedades fisicoquímicas	19
1.4. Características farmacocinéticas y farmacodinamia	20
1.5. Medicamentos comercializados y usos	21
1.6. Mecanismo de acción	23
1.7. Indicaciones	24
1.8. Resistencias	25
1.9. Efectos adversos	26
1.10. Contraindicaciones y precauciones de uso	29
1.11. Interacciones farmacológicas	29
1.12. Posología	31
2. Alternativas a la administración IV de AmB	32
2.1. Administración de AmB por vía oral	33
2.2. Administración de AmB por vía pulmonar	37
3. Referencias- Introducción	61
4. Review Article Nebulised Antibiotherapy	67
Planteamiento/ Objetivos	85
Capítulo 1	89
1. Abstract	91
2. Introduction	92
3. Material and methods	93
3.1. Material	93
3.2. Methods	94
4. Results	99
5. Discussion	109
6. Conclusions	112
7. Supplementary Material	113
8. References	118
9. Discusión del capítulo	120

Capítulo 2	127
1. Abstract	129
2. Introduction	131
3. Material and methods	133
3.1. Material	134
3.2. Methods	127
4. Results	147
5. Discussion	163
6. Conclusions	168
7. Supplementary Material	169
8. References	178
9. Discusión del capítulo	183
Discusión General	195
Referencias de la Discusión	206
Conclusiones	221
Patente	225
Borrador solicitud patente	225
Justificante de presentación, autores e instituciones	250

Abreviaturas:

AmB	Anfotericina B
API	Active pharmaceutical ingredient
APS	Accelerated Predictive Stability
CD	Ciclodextrina
Doc	Desoxicolato
DoE	Design of experiments
DPI	Dry powder inhaler
DPPC	Dipalmitol fofatidilcolina
Ea	Energía de activación
ELF	Fluido de revestimiento epitelial
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FDA	Food and Drug Administration
Fig	Figura
FPF	Fracción de partículas finas
GI	Gastrointestinal
GRAS	Generally recognized as safe
HPMC AS	Hidroxi propil metil celulosa acetato succinato
IV	Intravenoso
IFI	Infecciones fúngicas invasivas
IPA	Aspergilosis pulmonar invasiva
QbD	Quality by design
MCC	Celulosa microcristalina
MMAD	Medium mass aerodynamic diameter
MedDRA	Medical dictionary for regulatory activities
Na Doc	Desoxicolato sódico
PLGA	poly lactic-co-glycolic acid

PVP K90	Polivinil pirrolidona K90
MDI	Mettler dose inhaler
Ref	Referencia
RH	Humedad relativa
SS	Salbutamol sulfato
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Tg	Temperatura de transición vítrea
TR	Tracto respiratorio
USP	Farmacopea de Estados Unidos
Vd	Volumen de distribución
VL	Leishmaniasis visceral
VO	Vía oral

RESUMEN

La anfotericina B (AmB) es un fármaco caracterizado por presentar un amplio espectro antifúngico y antiparasitario. Se administra por vía parenteral debido a su escasa absorción oral. A pesar de su eficacia, su uso clínico se ve limitado por la aparición de eventos adversos, principalmente nefrotoxicidad y hemólisis. La Fungizona® fue el primer medicamento comercializado, pero, en la mayoría de los países, ha sido desplazada por formulaciones lipídicas de AmB (Abelcet® Amphocil® y Ambisome®) que presentan un balance beneficio/riesgo más favorable, sin embargo, tienen un coste muy elevado y requieren de condiciones ambulatorias/ hospitalarias para administrarlos al paciente. Por este motivo, existe una necesidad clínica de desarrollar formulaciones de AmB que presenten una buena relación coste-eficacia y que sean seguras para tratar infecciones fúngicas y parasitarias.

Con este objetivo se desarrollaron nuevas formulaciones orales de AmB combinando diferentes excipientes mediante el recubrimiento de pellets con formulaciones líquidas micelares de AmB. Con estas nuevas formulaciones se consigue mejorar el índice terapéutico en comparación con la AmB convencional, mejorando la actividad *in vitro* frente a candida y disminuyendo su toxicidad hemolítica, lo que se debe, principalmente a los excipientes utilizados en la formulación líquida que recubre los pellets, así como de la proporción de los mismos.

Por otro lado, se desarrollan modelos predictivos de la estabilidad de estas formulaciones mediante APS (Accelerated Predictive Stability), que han sido posteriormente corroborados por estudios de estabilidad a largo plazo.

Por consiguiente, los pellets de AmB de administración oral suponen una alternativa coste-efectiva y segura que no conlleva una ruta de administración invasiva del fármaco a la AmB convencional.

Aunque existen importantes avances en el desarrollo de formulaciones de AmB por vía parenteral, el progreso hacia otras vías de administración como es la vía pulmonar es muy limitado. En la actualidad, las infecciones fúngicas pulmonares se suelen tratar administrando aerosoles preparados a partir de las formulaciones lipídicas

comercializadas y reconstituidas, con el inconveniente de que es necesario su preparación extemporánea y además pueden provocar irritación en el tracto respiratorio (TR) ya que los excipientes no están adaptados a esta vía. Debido a la existencia de este vacío terapéutico en el tratamiento de infecciones fúngicas pulmonares se considera necesario desarrollar una formulación de polvo seco para inhalación (DPI) de AmB.

Las formulaciones DPI de AmB desarrolladas tienen como excipientes: γ -ciclodextrinas (CD), leucina y manosa que están considerados excipientes seguros para su administración pulmonar y además favorecen la actividad del fármaco, mejorando las propiedades de flujo, el tamaño aerodinámico de las partículas, la liberación de la AmB de la formulación y la captación por macrófagos pulmonares. La administración pulmonar de estas formulaciones constituye un tratamiento eficaz en infecciones pulmonares y sistémicas, así para el tratamiento de la leishmaniasis, ya que el fármaco es vectorizado a los macrófagos donde se encuentran acumulados estos parásitos.

En conclusión, es necesario desarrollar estrategias que permitan mejorar tanto la solubilidad, biodisponibilidad y acumulación de AmB en los órganos diana en función del tipo de enfermedad a tratar, el perfil farmacocinético deseado y la vía de administración. Las formulaciones orales y pulmonares de AmB han demostrado ser formulaciones con un balance beneficio/riesgo favorable y una mejor relación coste-eficacia para el tratamiento de infecciones fúngicas y/o parasitarias. Además, estas formulaciones evitan los inconvenientes asociados a la administración invasiva de fármacos.

SUMMARY

Amphotericin B (AmB) is a broad antifungal and antiparasitic drug, usually administered by intravenous infusion due to its low aqueous solubility and low oral absorption. AmB clinical use is limited by its acute toxicity presenting, mainly fever and gastrointestinal symptoms as well as chronic toxicity related to haemolysis and nephrotoxicity. Fungizone's low therapeutic index is responsible for its replacement by novel lipid AmB formulations (Abelcet®, Amphocil® y Ambisome®) with more favourable risk-benefit ratio, but with a very high cost, which limits their use in developing countries. Thus, there is an increased need to engineer cost-effective and safe AmB formulations for the treatment of fungal and parasitic diseases.

Novel oral AmB formulations were developed combining different excipients by spray coated beads with AmB micellar formulations. These new formulations improve the therapeutic index compared to conventional AmB as well as their *in vitro* activity against candida. The AmB pellets formulations showed a reduction in AmB haemolytic toxicity. These advantages are mainly due to the excipients used in the liquid formulation to the coated layer and the ratio between beads and coating excipients.

Additionally, predictive stability models of these formulations are developed using APS (Accelerated Predictive Stability), which have been also verified by long-term stability studies.

Therefore, oral AmB pellets are a cost-effective and safe alternative from conventional AmB and they offer a non-invasive drug administration route.

Although there are significant advances in the development of parenteral formulations of AmB, limited research is available on another administration routes such as the pulmonary. Pulmonary fungal infections are usually treated with aerosols from the reconstituted marketed lipid formulations, with the disadvantages that they must be extemporaneously prepared and they may cause irritation along the respiratory tract (TR) as the excipients are not selected for this administration route.

Due to therapeutic gap in the treatment of fungal lung infections, the development of an AmB dry powder inhaler (DPI) is ideal.

The AmB DPI formulations contain γ -cyclodextrins (CD), leucine and mannose as excipients, which are considered safe excipients for pulmonary administration and improve the formulation flow properties, the aerodynamic particle size, the drug released and the pulmonary macrophage uptake. The pulmonary administration of these formulations is clinically relevant to the fungal lung and systemic infections as well as the leishmaniasis treatment.

In conclusion, strategies to enhance the solubility, bioavailability and tissue accumulation of AmB need to be optimised depending on the disease state, desired pharmacokinetics and route of administration. In this thesis, we have demonstrated that the developed oral and pulmonary formulations overcome challenges related to the treatment of fungal infections and leishmaniasis diseases providing better risk- benefit ratio and cost-effective treatment.

Anfotericina características fisicoquímica
formulaciones orales de AmB AmBisome F
fungizona anfotericina B pellet estabilidad
acelerada **INTRODUCCIÓN** formulac
iones administración pulmonar tamaño a
erodinámico de las partículas CD manos al
eucina distribución RT retículo endotelial
toxicidad hemolítica macrófagos Leishma
nia AmB Beagle shipotensión ciclodextrin
aschitosán modificado anfotericina polia
gregada tamaño de partícula absorción oral
toxicidad hemolítica biodistribución prol
ongada circulación plasmática combinaci
ón con SS distinta capacidad respiratori
as AmB DPI nebulización estabilidad deficaz

INTRODUCCIÓN

1 Anfotericina B

La AmB es un antifúngico macrólido poliénico de amplio espectro de acción que según el Catálogo de Medicamentos del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos está clasificado en los grupos farmacoterapéuticos J02A (antimicóticos sistémicos) y A01A2 (antifúngicos bucales y gastrointestinales) [1].

1.1 Historia

La AmB se descubrió en 1955 en el delta del río Orinoco en Tembladora (Venezuela) por W. Gold et al., quienes evaluaron por primera vez las propiedades biológicas de este antifúngico macrólido [1]. La AmB es obtenida a nivel industrial a partir de determinadas cepas del actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Los antibióticos naturales son productos del metabolismo secundario de ciertos microorganismos. El metabolismo secundario comienza cuando el microorganismo detiene su crecimiento por alguna razón (por ejemplo, por agotamiento de nutrientes) y los intermediarios metabólicos o productos finales comienzan a acumularse dentro de la célula. Estos intermediarios y productos finales pueden resultar tóxicos y por eso la célula los convierte en productos menos tóxicos, como los antibióticos, que le ofrecen una ventaja desde el punto de vista de la supervivencia ya que le permiten colonizar ambientes, con más eficacia que sus competidores [2, 3].

1.2 Estructura

Su estructura química se caracteriza por presentar un anillo macrocíclico con un grupo lactónico interno y un grupo cromóforo constituido por siete dobles enlaces conjugados que da lugar a su espectro característico en la zona del ultravioleta/visible. El peso molecular de la AmB es 924.08 g/mol. Su fórmula empírica es $C_{47}H_{73}NO_{17}$ (Fig.1) [2, 3].

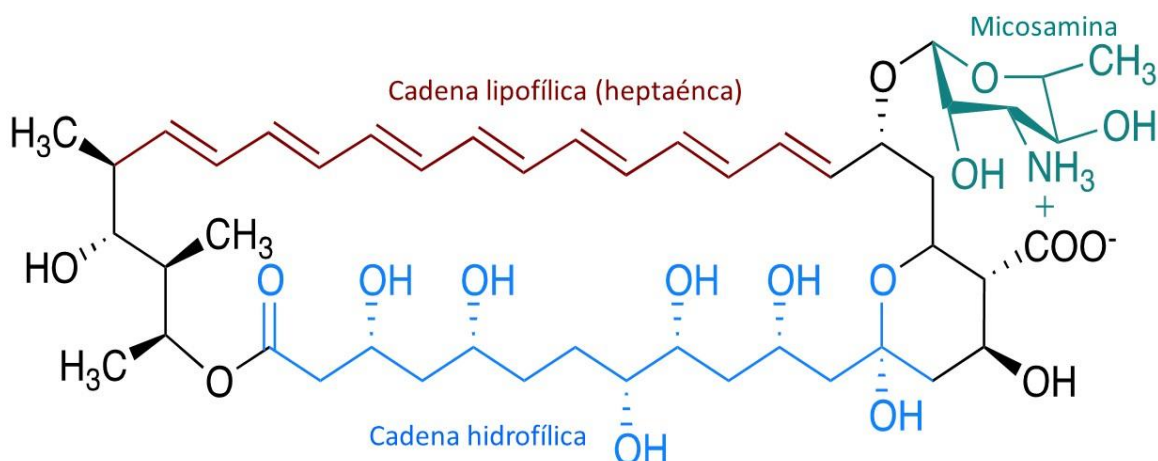


Figura 1. Estructura química de la AmB

1.3 Propiedades fisicoquímicas

La AmB es una molécula anfifílica caracterizada por presentar una cara lipofílica (hidrófoba) constituida por una cadena heptaénica que alarga la estructura del anillo macrocíclico y da rigidez a la molécula y por una cara hidrofílica (polar) compuesta por siete grupos hidroxilo y un grupo éster. Además, presenta un anillo interno tipo hemiacetal, el cual se encuentra en equilibrio con la forma cetónica abierta cuando la molécula está en solución.

La AmB es una molécula anfótera como su nombre indica, de manera que es capaz de comportarse como ácido ó como base en función del pH del medio en el que se encuentre. En el anillo macrocíclico presenta un ácido carboxílico y una cadena lateral de micosamina (aminodesoxihexosa) con un grupo amino primario. Tanto el grupo amino como el carboxílico están ionizados a pH fisiológico, con valores de pKa de 10,0 y de 5,5 respectivamente. Ambos grupos juegan un papel clave en la actividad biológica que tiene la AmB [2].

Características de la AmB como API para la fabricación de medicamentos

La AmB como principio activo en la fabricación de medicamentos debe cumplir las especificaciones de la Farmacopea que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Especificaciones de AmB según USP45-NF24 [4]

Análisis	Resultado
Apariencia	Polvo higroscópico amarillo-anaranjado
Solubilidad	Prácticamente insoluble en agua y etanol (96%). Parcialmente soluble en dimetilformamida y metanol. Soluble en dimetil sulfóxido. Sensible a la luz en solución.
Pureza	98-102%
Identificación	UV/ UV-VIS 240 to 320 nm and IR: 320 to 400 nm.
Agua residual	< 5%
Sustancias relacionadas	Totales desconocidas < 0,02 % Anfotericina A < 5% Impurezas AmB < 4%
Cenizas sulfúricas	< 3%. <0,5 % en formulaciones parenterales
Endotoxinas bacterianas	≤ 0,8%

El estudio de solubilidad de la AmB en agua a pH fisiológico (pH 6-7) demuestra una solubilidad inferior a 0,001 mg/ml. Cuando la AmB se encuentra en medios alcalinos (pH > 11) o ácidos (pH < 2), la solubilidad incrementa considerablemente (hasta 0,1 mg/ml) debido a la formación de sales. Sin embargo, su acción antifúngica a estos pH se ve reducida. Para incrementar la solubilidad de la AmB en agua, se pueden incorporar diferentes surfactantes en el medio, tales como, lauril sulfato sódico o deoxicolato sódico [3].

En cuanto a la riqueza, la AmB como materia prima en la fabricación de medicamentos debe contener entre el 98,0% y el 102,0% de AmB, calculado con respecto a la sustancia anhidra de referencia [4].

1.4 Características farmacocinéticas y farmacodinamia

Las principales vías de administración de la AmB son la vía intravenosa y la vía tópica. La absorción oral es mínima (5%) y de forma irregular, produciendo concentraciones plasmáticas variables o muchas veces subterapéuticas, por lo que la vía de administración de elección para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas (IFI) es la vía intravenosa (iv). La AmB se une en gran porcentaje a las proteínas del plasma (90-95%). El Vd es elevado (> 4l/kg), lo que explica que la AmB alcance altas concentraciones en hígado, bazo, pulmón y riñones; sin embargo, se obtienen concentraciones de

fármaco del 50-60% de la concentración plasmática mínima en el humor acuoso, pleural, pericardial, peritoneal y sinovial. Penetra mal en líquido cefalorraquídeo (LCR) (2- 4%) aumentando en casos de inflamación meníngea siendo, por tanto, necesario administrar AmB por vía intratecal en caso de infecciones en el Sistema Nervioso Central ya que la concentración del fármaco en líquido cefalorraquídeo es del 3% de la concentración del mismo en plasma. Atraviesa bien la placenta. No se disponen de ensayos clínicos que determinen la eliminación por leche humana ni la seguridad de su utilización en embarazadas. La AmB es metabolizada parcialmente por el hígado y eliminada por bilis. Entre el 2 y 5% se elimina por vía renal de forma muy lenta. La semivida de eliminación en el adulto con la función renal normal es de 24 horas, pero después de un tratamiento crónico, la semivida de eliminación puede alargarse hasta los 15 días. La semivida de eliminación de la AmB es muy variable en neonatos y en pacientes pediátricos. Se detecta concentración del fármaco en sangre 4 semanas después de la interrupción del tratamiento y en orina hasta 8 semanas después [5, 6].

1.5 Medicamentos comercializados y usos

La AmB convencional (Fungizona®) se trata de una dispersión micelar de AmB y desoxicolato sódico y fue el primer medicamento comercializado de AmB para administración IV.

En la actualidad, existen distintas formulaciones lipídicas de AmB: Abelcet® (complejo lipídico en forma de cinta), Amphocil® (complejo lipídico en forma de disco), AmBisome® (liposomas unilaminares) y Fungisome™ (liposomas multilaminares).

La principal diferencia entre AmBisome® y Fungisome™ es el gran tamaño de partícula de este último (2,7 y 3,5 μm) debido a que se trata de liposomas multilaminares, mientras que el tamaño de partícula del AmBisome® está entre 0,06 y 0,08 μm , lo que podría condicionar diferencias farmacocinéticas entre ambos.

Lo mismo ocurre con Abelcet® y Amphocil®, la disposición del complejo lipídico en forma de cinta en el medicamento Abelcet®, le confiere un tamaño de partícula de entre 1.6 a 11 μm , mientras que Amphocil® tiene un tamaño de partícula considerablemente inferior (0,11 a 0,14 μm) (Fig. 3).

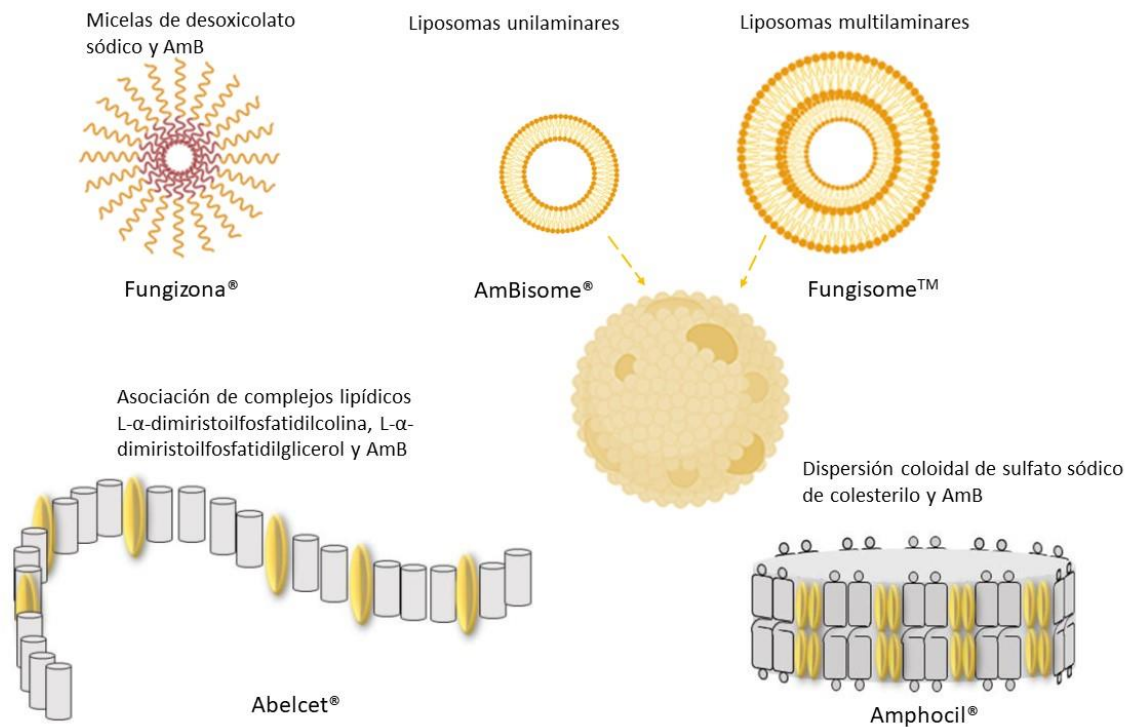


Figura 3. Representación de las distintas estructuras de los medicamentos comercializados que contienen AmB (adaptado de: [7] y [8]).

El perfil farmacocinético tras la administración IV de las formulaciones lipídicas de AmB difiere de la AmB convencional y, a su vez, AmBisome® presenta unas características diferentes a todos los demás. AmBisome® presenta altos valores de concentración en plasma y valores bajos de aclaramiento renal. El liposoma se mantiene en sangre sin romperse, liberando el fármaco poco a poco y, por tanto, actúa como reservorio en sangre para distribuir el fármaco a los diferentes tejidos. El resto de formulaciones lipídicas presentan una rápida distribución en los tejidos, siendo Amphocil® el fármaco con mayor acumulación en pulmón y bazo y Abelcet® en hígado.

Además, cabe destacar que todas las nuevas formulaciones lipídicas presentan menor concentración a nivel renal que la AmB convencional, lo que podría explicar la menor toxicidad de las mismas [2].

En cuanto a los usos de los distintos medicamentos comercializados de AmB, las formulaciones liposomales de AmB se emplean en micosis sistémicas graves en las que la AmB convencional no puede usarse por su toxicidad, especialmente toxicidad renal, o cuando no han respondido al tratamiento con AmB convencional u otros antifúngicos.

La AmB liposomal (AmBisome®) y el complejo lipídico (Abelcet®) se emplean también en Leishmaniasis visceral (VL). La AmB en complejo con sulfato sódico de colesteroilo (Amphocil®) se reserva para aspergilosis pulmonar invasiva (IPA) en pacientes con insuficiencia renal que impide el uso de AmBisome® a dosis efectivas y en casos de resistencias a terapia antifúngica previa [9].

1.6 Mecanismo de acción

En la actualidad, el mecanismo de acción de la AmB no ha sido completamente elucidado, pero se sabe que actúa en dos niveles diferentes: uno sobre la membrana celular y otro a nivel intracelular.

A nivel de la membrana celular, la AmB tiene la capacidad de unirse al ergosterol (1) y formar poros, o bien directamente “secuestrar” el ergosterol (2) desestabilizando la membrana celular (Fig. 2). A nivel intracelular, la AmB puede producir estrés oxidativo. Aunque en la actualidad el mecanismo de inducción de estrés oxidativo es desconocido, se han propuesto diversas hipótesis tales como que la AmB puede comportarse como un agente prooxidante generando especies de oxígeno altamente reactivas (ROS). Sin embargo, probablemente, se requiera una previa unión al ergosterol de la membrana para que pueda tener lugar este efecto. Por otro lado, las ROS son productos que se forman en la cadena respiratoria y, por lo tanto, no podría descartarse el hecho de que la AmB ejerciera un determinado efecto sobre la actividad mitocondrial de la célula (3), contribuyendo de esta manera al estrés oxidativo. En última instancia, la acumulación de radicales libres provocaría un daño en los principales componentes celulares (ADN, proteínas y mitocondrias) produciendo la muerte celular [2].

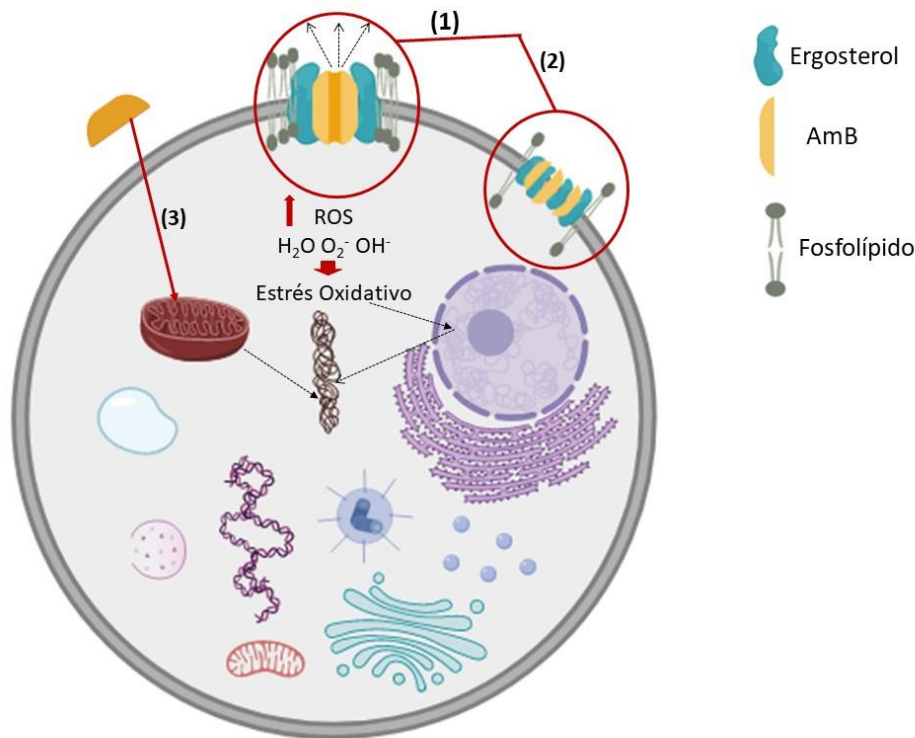


Figura 2. Mecanismo de acción de la AmB.

1.7 Indicaciones

La AmB se utiliza para el tratamiento de IFI y sistémicas. Según la sensibilidad del hongo y la concentración del fármaco en el lugar de la infección, la AmB puede comportarse como fungicida o como fungistático [2].

Su espectro de acción es muy amplio y está caracterizado por presentar un alto grado de actividad frente a la mayor parte de los agentes causantes de micosis sistémicas, siendo los más frecuentes: *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* y *Aspergillus spp.*; pero también es activa frente a muchos otros hongos patógenos tales como: *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Scedosporium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Sporothrix schenckii*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Rhodotorula spp.*, cigomicetos y otros hongos miceliales dematiáceos. La mayoría de las cepas son inhibidas a una concentración de AmB de entre 0,03 y 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *in vitro*. La principal ventaja de la AmB respecto a otros antifúngicos de uso sistémico es su mayor actividad antifúngica frente a cigomicetos y microorganismos del género *Aspergillus* y *Fusarium*.

La AmB no es activa frente a bacterias, rickettsias ni virus. Sin embargo, presenta actividad frente a algunos protozoos tales como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Plasmodium* [10, 11]. En la práctica clínica, es un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento de la leishmaniasis visceral (VL) y cutánea difusa (Kala-azar) [12]. En comparación con otros fármacos utilizados en clínica (tales como la miltefosina, la paramomicina o el estibogluconato de sodio) por lo general, la AmB presenta una actividad leishmanicida superior, sin embargo, su toxicidad es el principal factor que limita su uso. Además, cabe destacar, que existen diferencias significativas a nivel de actividad según el tipo de formulación de AmB que se utilice, que puede atribuirse en cierta medida al diferente perfil farmacocinético que presentan las distintas formulaciones.

1.8 Resistencias

A pesar del extendido uso de la AmB, la aparición de resistencias es bastante rara. Se han descrito resistencias en algunas cepas del género *Candida spp* como son *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae* y *Candida tropicalis*.

También se han descrito otras cepas resistentes a la AmB como son: *Scedosporium apiospermum* y *Scedosporium prolificans*, especies de la familia de hongos Microascales que últimamente han emergido como principales causantes de infecciones diseminadas en pacientes neutropénicos, resistentes a casi todos los antifúngicos disponibles. Estudios taxonómicos recientes han demostrado que *S. apiospermum* constituye en realidad un complejo de especies, entre ellas, *Pseudallescheria apiosperma*). Los primeros casos de infección diseminada por *S. prolificans* en Europa fueron descritos en España.

Asimismo, se han detectado resistencias a la AmB con la especie *Sporothrix schenckii*, hongo dimórfico de la familia *Ophiostomales*, que durante muchos años ha sido considerada como la única especie responsable de esporotricosis, infección subaguda o crónica que afecta a la dermis y al tejido celular subcutáneo y con una distribución mundial. Dicha especie ha sido recientemente clasificada como un complejo de especies

del género *Sporothrix*, lo que podría explicar la diferente sensibilidad a los antifúngicos actuales.

Por último, las especies del género *Fusarium spp.* han desarrollado resistencias al uso de numerosos antifúngicos, entre ellos al uso de AmB. Estos géneros de ascomicetos son saprobios o parásitos de plantas; sin embargo, ha aumentado significativamente la incidencia de fusariosis en pacientes inmunocomprometidos [13].

Se podría considerar que la aparición de resistencias tiene lugar por tres tipos de vías diferentes:

1. Disminución del contenido de ergosterol en la membrana celular.

La aparición de resistencias está relacionada con una alteración en la síntesis del ergosterol y también con cambios en la pared celular. Hay que tener en cuenta que pueden darse resistencias cruzadas entre los azoles y la AmB debido a que los azoles inhiben la síntesis de ergosterol [2].

2. Tolerancia al estrés oxidativo.

La exposición a concentraciones subinhibitorias de fluconazol puede inducir en las levaduras una respuesta que les hace ser más resistentes al estrés oxidativo (causado por ROS) y al estrés nitrosativo (causado por NO) generando una mayor tolerancia al estrés oxidativo causado por la AmB. Por un mecanismo similar, se han descrito cepas de *C.albicans* resistentes a la AmB, caracterizadas por presentar una menor susceptibilidad en presencia de H₂O₂ debido a un incremento en la actividad de la catalasa [2].

3. Alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial.

Aunque no exista una correlación perfectamente establecida, cabe pensar que la cadena respiratoria mitocondrial podría jugar un papel clave en el desarrollo de resistencias frente a la AmB, no solamente por estar implicada en la acumulación de radicales libres dentro de la célula, sino también por el hecho de ser necesaria para la síntesis de ergosterol [2].

1.9 Efectos adversos

Los principales efectos adversos relacionados con la administración IV de AmB son: la nefrotoxicidad y las reacciones adversas relacionadas con la perfusión. De hecho, la aparición de efectos adversos es uno de los principales problemas que limita la terapia

de infecciones fúngicas y parasitarias con Fungizona®. Con las nuevas formulaciones lipídicas se ha conseguido reducir parte de la toxicidad asociada a la administración IV de la AmB convencional; aun así, los efectos adversos de la AmB son muy numerosos. Estos efectos se esquematizan en la tabla 1, destacándose los que se presentan de forma muy común tras su administración IV.

La toxicidad aguda que aparece durante o tras la administración IV del fármaco se relaciona con la producción de citoquinas proinflamatorias. Entre los efectos adversos agudos más comunes se pueden destacar: fiebre, escalofríos y rigidez, cefaleas, náuseas, vómitos, diarrea, dolor en el lugar de la inyección con o sin flebitis, etc. Algunos de estos efectos adversos se pueden mitigar con la administración de analgésicos, heparina, antihistamínicos y/o antieméticos [14].

La principal toxicidad crónica se manifiesta a nivel renal. Entre los factores de riesgo para desarrollar nefrotoxicidad se encuentran: pertenecer al género masculino, la administración de una dosis diaria superior o igual a 35 mg, la utilización concomitante de diuréticos u otros fármacos nefrotóxicos, un peso corporal superior o igual a 90 kg y una función renal basal fuera de los límites normales. El daño renal se manifiesta como insuficiencia renal, hipocalcemia, hipomagnesemia, acidosis metabólica y poliuria asociada a diabetes insípida. Generalmente, la función renal mejora con la interrupción de la terapia. Sin embargo, pueden aparecer frecuentemente algunos trastornos permanentes, especialmente, cuando el total de dosis recibida por el paciente es superior a 5 g. Estudios en humanos han demostrado que la administración de solución salina, ya sea por vía oral o parenteral, reduce considerablemente la incidencia y severidad del daño renal secundario por AmB. Otro efecto adverso a tener en cuenta y que aparece hasta en un 70% de los pacientes es la anemia [15, 16].

Tabla 2. Efectos adversos de la AmB. La frecuencia de las reacciones adversas se ha descrito utilizando el convenio de frecuencias MedDRA: muy frecuentes ($=1/10$), frecuentes ($=1/100$ y $<1/10$), poco frecuentes ($=1/1.000$ y $<1/100$) raras ($=1/10.000$ y $<1/1.000$), muy raras ($>1/10.000$).

Sistema Afectado	Frecuencia	Síntomas
Trastornos Generales	muy frecuentes	Fiebre (a veces acompañada de escalofríos), malestar, pérdida de peso
	raras	sofocos
Trastornos Gastrointestinales	muy frecuentes	Anorexia, vómitos, náuseas, diarrea, dolor epigástrico (calambres)
	frecuentes	Gastroenteritis hemorrágica, melena
	raras	Anomalías en las pruebas de función hepática, ictericia, fallo hepático agudo
Trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos	poco frecuentes	Disnea, broncoespasmo, edema pulmonar no cardiogénico, neumonitis por hipersensibilidad
Trastornos del sistema nervioso	muy frecuentes	Cefalea
	frecuentes	Convulsiones, pérdida de audición, tinnitus, vértigo transitorio, visión borrosa o diplopía, neuropatía periférica, encefalopatía
Trastornos de la piel, tejido subcutáneo, reacciones alérgicas y locales	muy frecuentes	Dolor en el lugar de inyección con o sin flebitis o tromboflebitis
	frecuentes	Reacciones anafilactoides y otras reacciones alérgicas: rash, prurito...
Trastornos del sistema cardiocirculatorio	poco frecuentes	Parada cardíaca, arritmias (incluyendo fibrilación ventricular), insuficiencia cardíaca, hipertensión, hipotensión, shock
Trastornos del sistema musculoesquelético	muy frecuentes	Dolor generalizado, incluyendo mialgias y artralgias.
Trastornos de la sangre y el sistema linfático	muy frecuentes	Anemia normocítica normocrómica
	frecuentes	Agranulocitosis, alteraciones de la coagulación, trombocitopenia, leucopenia, eosinofilia, leucocitosis
Trastornos renales y urinarios	muy frecuentes	Deterioro y anomalías de la función renal, incluyendo: azotemia, elevación de la creatinina sérica, hipocalemia, hipostenuria, acidosis tubular renal y nefrocalcinosis
	frecuentes	Hipomagnesemia, hipercalemia, fracaso renal agudo, anuria, oliguria

1.10 Contraindicaciones y precauciones de uso

Se han descrito interferencias con resultados de test de laboratorio, por ejemplo, como la valoración química del fósforo. Cuando se analizan muestras de pacientes tratados con Ambisome utilizando el ensayo PHOSm (p.ej. utilizado en analizadores Beckman Coulter, incluyendo el Synchron LX20) pueden aparecer falsas elevaciones del fosfato sérico. Este ensayo sirve para la determinación cuantitativa del fósforo inorgánico en muestras de suero, plasma u orina humanos.

Las infecciones fúngicas sistémicas fueron tratadas con éxito en mujeres embarazadas con AmB convencional sin encontrar efectos claros sobre el feto, pero el número de casos recogidos es insuficiente para establecer cualquier conclusión sobre la seguridad de este medicamento en el embarazo.

Se desconoce si se excreta por leche materna y también se desconoce si tiene alguna repercusión sobre la fertilidad [3].

1.11 Interacciones farmacológicas

Los efectos causados por la administración conjunta de AmB (IV) con otros fármacos se clasifican en:

Aumento del efecto antimicrobiano:

La administración de AmB (IV) incrementa la penetración de la flucitosina, el norfloxacin y la rifampicina en la célula fúngica, debido a la alteración de la permeabilidad de la membrana celular causada por la AmB que aumenta la captación de estos fármacos, o también puede ser debido a un enlentecimiento de la excreción renal de estos fármacos provocada por la nefrotoxicidad que causa la AmB. La minociclina, debido a su naturaleza lipofílica, también ve incrementado su efecto en presencia de la AmB debido a la interacción del fármaco con los ácidos grasos libres que se encuentran en las membranas de las células fúngicas[14-16].

Disminución del efecto antimicrobiano:

Varios estudios han demostrado la ineficacia de la combinación del ketoconazol y de la AmB en tratamientos de infecciones fúngicas, y se ha demostrado la

interacción de la AmB con otros imidazoles tales como clotrimazol, itraconazol, fluconazol o miconazol [14, 17].

Aumento del efecto del fármaco administrado conjuntamente:

Varios estudios han demostrado el efecto incrementado que ejerce la AmB sobre el aciclovir, el cisplatino y los relajantes musculares no despolarizantes; esto se cree que es debido a la hipocalcemia inducida por la AmB que puede incrementar la actividad de dichos fármacos [18, 19].

Aumento de la toxicidad del fármaco administrado conjuntamente:

La pérdida de potasio producida por la AmB puede verse incrementada por la administración conjunta de corticoesteroides (hidrocortisona), glucocorticoides, mineralocorticoides, inhibidores de la anhidrasa carbónica, corticotropina y glicósidos digitálicos, incrementando la toxicidad de dichos fármacos y pudiendo causar en el paciente una disfunción cardíaca. Asimismo, el uso concomitante de corticoides, ACTH y diuréticos (derivados del asa y tiazidas) puede potenciar la hipopotasemia que afecta a la función cardíaca y a su vez puede potenciar el efecto de relajación muscular de los miorelajantes (por ej. tubocurarina) [16].

También el uso de fármacos que causan nefrotoxicidad tales como pentamidina parenteral, aminoglucósidos, ciclosporina A, diuréticos, aminoglicósidos o pentamidina asociado a la administración de AmB puede incrementar el riesgo de aparición de toxicidad renal. Sin embargo, en pacientes que recibieron de forma concomitante ciclosporina y/o aminoglicósidos junto con AmBisome® se notificó una nefrotoxicidad significativamente menor en comparación con la administración concomitante de otros medicamentos de formulaciones lipídicas de AmB para administración IV. En todos los casos, se recomienda una monitorización regular de la función renal en los pacientes [5, 20].

El uso concomitante de la AmB junto con agentes antineoplásicos puede incrementar el riesgo de aparición de broncoespasmos, hipotensión y toxicidad renal. También el uso de AmB junto con sucralfato disminuye los niveles plasmáticos de colistina (19%), por su posible formación de quelatos no absorbibles y, junto con la zidovudina, se potencia la mielotoxicidad y la nefrotoxicidad. El uso simultáneo de radioterapia junto con AmB puede incrementar el riesgo de anemias u otros efectos hematológicos [14].

Por último, se han notificado interacciones farmacológicas con transfusiones de leucocitos provocando una toxicidad pulmonar aguda en pacientes tratados con AmB (en forma de complejo de desoxicolato sódico) durante o poco después de recibir transfusiones de leucocitos. Se recomienda separar estas trasfusiones el mayor tiempo posible y vigilar la función pulmonar (Tabla 3) [16].

Tabla 3. Resumen de las interacciones de AmB (IV) con otros fármacos. Efectos causados y grupos de fármacos.

Efecto Causado	Fármacos
Aumento del efecto antimicrobiano	Flucitosina Minociclina Norfloxacino Rifampicina
Disminución del efecto antimicrobiano	Ketoconazol
Aumento del efecto del fármaco	Aciclovir Cisplatino Relajantes musculares no despolarizantes
Aumento de la toxicidad del fármaco	Corticoesteroides Glucósidos digitálicos Pentamidina Zidovudina

1.12 Posología

La posología depende del tipo de formulación comercializada y el tipo de infección.

En el caso de AmB convencional (Fungizona®), las dosis utilizadas en función de las diferentes afecciones son las siguientes:

- Candidiasis: 0,4 – 0,6 mg/kg/día.
- Criptococosis: 0,3 mg/kg/día.
- Coccidiomicosis: 1 – 1,5 mg/kg/día.
- Blastomicosis: 0,3 – 1 mg/kg/día.
- Histoplasmosis: 0,5 – 1 m/kg/día.
- Aspergilosis: 0,5 – 1 mg/kg/día o superiores en caso de infecciones graves.
- Mucormicosis rinocerebral: 0,7 – 1,5 mg/kg/día.

La duración del tratamiento para micosis profundas suele ser de 6 a 12 semanas, aunque puede prolongarse más tiempo.

En el caso de AmB liposomal (AmBisome®) las dosis utilizadas en función de las diferentes afecciones son las siguientes:

- Tratamiento específico de micosis sistémicas: 1 – 3 mg/kg/día (en casos graves, hasta 5 mg/kg/día).
- Tratamiento empírico en pacientes neutropénicos: 1- 3 mg/kg/día.
- En el tratamiento de VL en inmunocompetentes e inmunodeprimidos que no hayan respondido a antimoniales ni a AmB convencional: 1 -1,5 mg/kg/día x 21 días (pauta preferible en inmunocomprometidos); 3 mg/kg/día x 10 días ó una única dosis de 10 mg/kg [21]

En el caso de la AmB complejo lipídico (Abelcet®) las dosis utilizadas en función de las diferentes afecciones son las siguientes:

- Tratamiento empírico o de micosis sistémicas: 5 mg/kg/día si se tolera.
- Tratamiento de leishmaniasis visceral: 3 mg/kg/día durante 5 días consecutivos o durante 9 días alternos (dosis total 15 – 30 mg/kg).
- Profilaxis secundaria de la leishmaniasis visceral en pacientes con infección por VIH con recuento de linfocitos T CD4+ < 200 cel/ μ L: 3 mg/kg cada 21 días [2]

El complejo AmB-sulfato sódico de colesteroil (Amphocil®) se utiliza a dosis recomendadas de 3 – 4 mg/kg/día o si el paciente lo precisa hasta 6 mg/kg/día [2].

2. Alternativas a la administración IV de AmB

Como se ha explicado a lo largo de del capítulo anterior, la administración IV de AmB es, hasta la fecha, la ruta de administración preferente y en concreto las formulaciones lipídicas son las más utilizadas en la práctica clínica. Sin embargo, alternativas a la administración de AmB por vía IV supondrían una mejora en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinamias en el caso de infecciones locales y reduciría los efectos adversos relativos a la vía de administración en el caso de infecciones sistémicas.

2.1 Administración de AmB por vía oral

En la actualidad existen varios antifúngicos de administración oral que se utilizan habitualmente en la práctica clínica. Entre los principales antifúngicos orales se encuentran los triazoles (fluconazol e itraconazol) y alilaminas (terbinafina) que son generalmente eficaces frente a las dermatomicosis y bien tolerados por parte del paciente [22].

Los antifúngicos de la familia de las alilaminas, como es la terbinafina, suponen una mejora en la actividad fungicida frente a la mayoría de las dermatofitosis cutáneas, mientras que los antifúngicos imidazólicos suelen actuar como fungistáticos a dosis terapéuticas, ofreciendo una gran ventaja en cuanto a regímenes de dosificación y menor tasa de recidivas. Sin embargo, la terbinafina es fungistático frente a las especies del género *Candida spp.* y *Malassezia furfur*, a diferencia de los derivados imidazólicos que actúan como fungicidas. Por otra parte, existen numerosas interacciones medicamentosas descritas en el uso de antifúngicos orales azólicos [23, 24].

La AmB, como ya se ha comentado, es antifúngico de amplio espectro, eficaz tanto en infecciones cutáneas y mucocutáneas como sistémicas, es fungicida frente a todas las especies del género *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus* [25, 26]. Además, presenta menor número de resistencias que el resto de antifúngicos [27, 28].

Sin embargo, debido a la baja solubilidad de la AmB (< 1 mg/L a pH fisiológico), su tendencia a agregarse en medios acuosos y su baja permeabilidad (a causa de su peso molecular de 924 g/mol y su log P de 0,95), la biodisponibilidad por vía oral de la AmB es muy reducida [3].

Por ello, la AmB se encuentra clasificada dentro del grupo IV (baja solubilidad y baja permeabilidad) según el sistema de clasificación biofarmacéutica.

Los comprimidos de AmB (Fungilin®) que se encuentran comercializados en ciertos países, se utilizan para el tratamiento de infecciones locales del tracto orofaríngeo y gastrointestinal causadas por un sobrecrecimiento de *C. albicans*, sin embargo, la absorción de AmB es mínima.

Sin embargo, la administración oral de AmB se considera una potencial ventaja por varios aspectos que se describen a continuación:

- Elimina la potencial toxicidad asociada a la administración parenteral, reduciendo y controlando los efectos adversos.
- La vía oral facilita el cumplimiento terapéutico por parte del paciente y además permitiría reducir el tiempo de hospitalización, lo que conlleva una mejora en la calidad de vida del paciente durante el tratamiento.
- La posibilidad de suspender el tratamiento si apareciesen reacciones adversas complicadas. En el caso de la administración intravenosa, ciertas reacciones adversas tales como reacciones anafilácticas pueden suponer un gran riesgo para la vida del paciente.
- Los medicamentos de administración oral, en general, suponen un menor coste de fabricación y por tanto menor coste para el paciente, así como una disminución de los costes indirectos de la terapia IV de AmB.
- Los países en vías de desarrollo tendrían mayor accesibilidad a este tipo de tratamientos al prescindir de medios hospitalarios o ambulatorios, en tratamientos frente a *Leishmania* y otras infecciones fúngicas sistémicas [2, 29].

Los primeros estudios farmacocinéticos realizados en humanos para evaluar la absorción oral de AmB, demostraron que a pesar de la administración de dosis única o dosis múltiple de elevadas dosis de AmB (de 2 g/día a 10 g/día), las concentraciones plasmáticas obtenidas fueron muy bajas indicando una biodisponibilidad muy pequeña. Posteriormente, en los años 80, se observó que, al administrar dosis menores (del orden de miligramos), la concentración alcanzada en plasma presentaba unos valores similares, lo que parece indicar que en la absorción oral de AmB está implicado un proceso de saturación que limita considerablemente la biodisponibilidad del fármaco [30, 31].

En la última década, se viene observando un gran interés en el desarrollo de nuevas formulaciones de administración oral de AmB, en las que se busca principalmente un efecto a nivel sistémico. La tabla 4 recoge diversos estudios farmacocinéticos en animales, que evalúan la absorción oral de la AmB tras una única administración o durante un régimen de dosis múltiple.

En general, la formulación AmB- cocleatos y los sistemas lipídicos autoemulsionables (SEDDS) son las formulaciones que presentan un mejor perfil farmacocinético, con mayores concentraciones en plasma y acumulación de AmB en tejidos.

AmB- cocleatos se forman a partir de bicapas de fosfolípidos que se enrollan en espiral cuando se añaden al medio cationes divalentes (Ca^{2+} o Zn^{2+}) que sirven de enlace entre las capas adyacentes que permiten la liberación controlada del fármaco. Estos sistemas mejoran la administración oral del fármaco, permitiendo su absorción a través del tracto gastrointestinal, pasando a circulación sistémica. Además, presentan una estabilidad superior a los liposomas debido a su menor potencial de oxidación, así como la posibilidad de liofilización [2, 32].

Los sistemas lipídicos autoemulsionables (SEDDS) están formados por una mezcla de lípidos tales como peceol (glicerol monoleato) y DSPE (distearoilfosfatidiletanolamina) entre otros, combinados con PEG (polietilenglicol) y vitamina E. Estas formulaciones se caracterizan por tener una elevada vida media, al acumularse en distintos tejidos del sistema retículo endotelial, permitiendo a su vez una disminución del número de administraciones del fármaco [33].

Además, cabe destacar que ambas formulaciones han demostrado tener un buen perfil farmacodinámico en diferentes modelos animales, mostrando actividad frente a *Leishmania spp.*, *Candida spp.* [32-34] y *Aspergillus spp.* [3, 35]

Tabla 4. Estudios farmacocinéticos en diferentes modelos animales, llevados a cabo tras la administración de dosis únicas o dosis múltiples de AmB por vía oral (modificado de [36]).

Formulación	Dosis y duración del tratamiento	Recogida de muestras	Concentración de AmB en tejidos ($\mu\text{g AmB/g tejido}$)						Cmax plasma ($\mu\text{g/mL}$)	tmax plasma (h) en dosis únicas	Ref.
			Riñón	Pulmón	Hígado	Bazo	Corazón	Cerebro			
D-AmB	1,6-16,7 mg/kg	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,040-0,176	5-24	[37]
AmB-Cocleatos	0,5- 2,5 mg/kg/día (16 días)	24 h después de la última dosis	0,374	0,105	ND	ND	ND	ND	ND	ND	[32]
	10 mg/kg	1- 24 h post-administración	0,04- 0,96	0,04-0,96	0,04-0,72	0,3-0,6	0,04-0,1	0,02-0,4	ND	ND	[38]
	10-40 mg/kg/día (10 días)	24 h después de la última dosis	2,3	9,5	2,4	1,5	0,3	0,1	ND	ND	[32]
Sistemas lipídicos autoemulsionables (SEDDS)-AmB	4,5-50 mg/kg	24-72 h post-administración	0,079-0,283	0,117-0,055	0,017-0,033	0,039-0,091	ND	ND	0,071-1,187	2-12.5	[39]
	2,5-20 mg/kg/bid (5 días)	12-60 h después de la última administración	0,112-1,589	0,589-5,048	0,714-4,728	0,329-4,194	0,160-0,621	0,082-0,184	0,166-0,519	ND	[33]
iCo-010 (mono-diglicéridos+PEG ₁₅₀₀ +vitaminaE+AmB)	2,5mg/kg/día (5 días)	12 h después de la última dosis	0,495	0,408	0,446	0,342	0,084	0,059	0,172	ND	[29]
	5 mg/kg/bid (5 días)		0,813	1,168	0,836	0,916	0,156	0,112	0,232	ND	
	10mg/kg/bid (5 días)		2,268	2,014	2,543	1,407	0,338	0,157	0,418	ND	
	20mg/kg/bid (5 días)		3,685	3,179	3,494	1,939	0,366	0,169	0,538	ND	
Nanopartículas poliméricas- AmB	4-200 mg/kg dosis única 5mg/kg/día o bid (5días)	12-24 h después de la última dosis	1,716-7,884	1,548-7,456	0,892-6,281	1,716-7,884	ND	0,139-0,280	0,229-0,462	4-24	[2, 40]

Nota: D-AmB: AmB-desoxicolato; SEDDS: Self-microemulsifying drug delivery system; SLN: solid lipid nanoparticles; iCo-010: 60/40 (v/v) mono- y diglicéridos con vitamina E-TPGS (D- α -tocoferol polietilenglicol succinato);

PEG: polietilenglicol; bid: dos veces al día; Cmax: concentración máxima alcanzada en plasma; tmax: tiempo en el que se alcanza la concentración máxima; ND: dato no disponible

2.2 Administración de AmB por vía pulmonar

Características fisiológicas y farmacológicas del aparato respiratorio

Conocer la fisiología de las vías respiratorias inferiores y los pulmones es fundamental para entender la farmacodinamia y farmacocinética de la terapia inhalatoria. La vía respiratoria superior está formada por la región nasofaríngea, sin incluir la boca y la faringe a pesar de ser regiones críticas a considerar en la efectividad de la terapia inhalatoria, debido al potencial impacto de la pérdida de partículas de fármaco inhaladas en estas zonas. Existen distintas patologías que pueden afectar a la función fisiológica del pulmón y por tanto afectaría a la farmacocinética y farmacodinamia de la terapia inhalatoria.

▪ Fisiología Pulmonar

La función pulmonar está íntimamente ligada a las características estructurales de las de las vías respiratorias y del parénquima pulmonar.

En condiciones normales, las vías respiratorias se comportan como un trayecto de baja resistencia al paso del flujo de aire hasta la región periférica de los pulmones donde se encuentran los alveolos que desarrollan la función vital del intercambio gaseoso. En base a esto, se establece la división de los pulmones en dos zonas diferenciadas: la zona conductora y la zona respiratoria. La fisiología del tracto respiratorio (TR) se explica gráficamente en Figura 4.

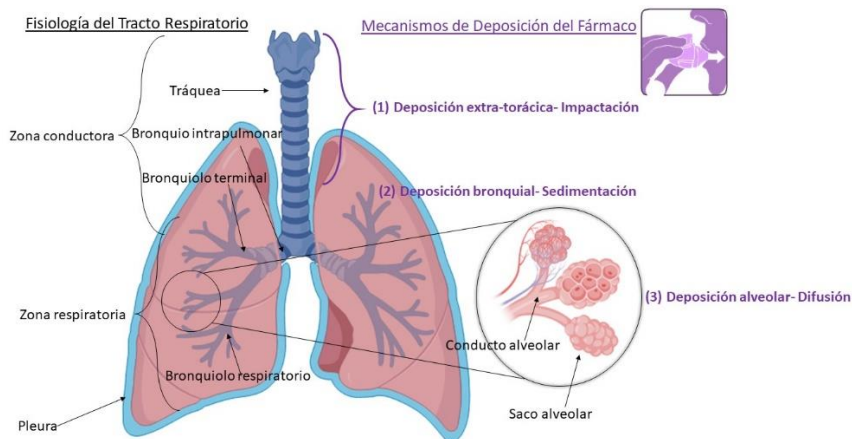


Figura 4. Representación gráfica de la fisiología del TR y de los distintos mecanismos de deposición de fármacos.

La zona conductora consiste en las 16 primeras secciones de la tráquea donde se bifurcan los dos bronquios principales, los cuales se dividirán a su vez en lóbulos pulmonares: dos en el izquierdo y tres en el derecho. El bronquio intrapulmonar continúa subdividiéndose progresivamente en bronquios y bronquiolos de menor tamaño de diámetro. En cuanto a la función fisiológica, esta zona se encarga del mantenimiento del flujo de aire durante la respiración.

La zona respiratoria está formada por todas las estructuras que participan en el intercambio gaseoso y comienzan con los bronquiolos respiratorios que contienen a los alveolos. Adicionalmente, estos bronquiolos se subdividen en conductos alveolares y finalmente en sacos alveolares.

Los modelos de ramificación de las vías respiratorias han sido clasificados en: dicotomía regular (cada rama se bifurca en dos de tamaño similar) e irregular (cada rama se bifurca en dos ramas de tamaño y diámetro diferente pero siempre menor que las ramas de origen). La función pulmonar está fuertemente influenciada por las características de esta ramificación, disminuyendo el tamaño del conducto del aire y aumentando la superficie de paso del aire. A medida que las ramificaciones son más profundas, disminuye el diámetro y la longitud de las ramificaciones, pero aumentan en número y en área transversal.

En cada segmento del aparato respiratorio inferior a partir del segmento 16 el área transversal aumenta de forma exponencial a partir del segmento 16 desde 180 a 10000 cm², llegando a alcanzar una superficie alveolar de 140-160 m² en un adulto. Como resultado de este aumento de superficie de contacto, la resistencia al paso del flujo de aire disminuye rápidamente hasta que en los alveolos el intercambio de aire ocurre directamente por difusión.

En un adulto, el volumen total o capacidad pulmonar total es el volumen total de aire tras una inspiración máxima y viene expresada como la suma del volumen de la capacidad torácica (capacidad vital) más el volumen residual. En condiciones normales suele ser de 6 L [41].

El resto de características morfológicas del árbol traqueobronquial afectan al funcionamiento pulmonar tanto en condiciones normales como fisiopatológicas. Estas características son: los distintos tamaños y formas del tejido cartilaginoso, el número y tipo de células epiteliales que unen el lumen del TR, las células glandulares que secretan

mucus, las células de músculo liso que rodean las vías respiratorias, el sistema nervioso y los vasos sanguíneos [42, 43].

Las funciones pulmonares pueden dividirse en dos categorías: funciones respiratorias y no respiratorias. Las funciones respiratorias incluyen las dos principales actividades de intercambio de gases y balance ácido base. Por otro lado, las funciones no respiratorias incluyen otros aspectos de la función pulmonar como las actividades endocrina y metabólica.

El intercambio de gases consiste en el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono lo cual ocurre principalmente en la región respiratoria del TR, concretamente en bronquiolos, conductos alveolares y alveolos. La conexión con el sistema cardiovascular a través del epitelio alveolar (barrera alveolo-capilar) de un grosor de menos de 0,5 μm permite el intercambio de gases por difusión. El gradiente de presiones parciales de gases entre el alveolo y la sangre del capilar permite llevar a cabo este proceso de intercambio. La presión parcial del oxígeno en el alveolo es de 104 mmHg mientras que la sangre deoxigenada de los capilares tiene una presión de 40 mmHg; de este modo se crea una fuerza conductora que transporta el CO_2 del capilar al interior del alveolo.

La zona de conducción no solamente sirve de paso de flujo de aire sino que interviene en la amortiguación de gases y acondicionamiento del aire.

▪ *Mecanismos de Deposición del Fármaco en el Tracto Respiratorio*

Los mecanismos de deposición de fármacos en el TR se dividen en: impactación inercial, sedimentación y difusión. En el desarrollo de formulaciones pulmonares es crítico conocer estos mecanismos de deposición para lograr una mayor eficacia del fármaco. Además, en los patrones de deposición influyen las siguientes variables: las características del aerosol, los parámetros ventilatorios y la morfología del TR. A su vez, conocer la clínica personal y los roles del proceso de deposición, puede asegurar la efectividad de los patrones de deposición del fármaco en el pulmón.

En general, en el TR superior, árbol traqueobronquial y las partículas mayores de 5 μm de tamaño se atribuyen al mecanismo de impactación inercial, mientras que en las vías

respiratorias periféricas o inferiores es más frecuente el mecanismo de sedimentación (Fig. 4).

Conociendo los efectos de los patrones ventilatorios, se puede mejorar notablemente la deposición de tipo impactación aumentando la velocidad del flujo inspiratorio o, a la inversa, se puede promover la deposición en la parte inferior del pulmón aumentando la duración de una pausa posterior a la inspiración (el tiempo de aliento).

La deposición selectiva del fármaco en las vías respiratorias es fundamental por las siguientes razones: (i) las enfermedades de las vías respiratorias pueden no manifestarse en el pulmón, o manifestarse en distinto grado, es decir, las enfermedades del sistema respiratorio pueden tener una localización concreta, por ejemplo, la fibrosis quística puede dispersarse a través de todo el árbol traqueobronquial; el asma en el TR superior, central y pequeñas zonas del TR inferior y los carcinomas broncogénicos han sido detectado en la mayoría de las bifurcaciones de los bronquios. Y (ii) tanto los receptores como las terminaciones nerviosas no están homogéneamente distribuidos en las vías respiratorias, sin embargo, están localizados.

Por otra parte, los fármacos inhalados que se depositan selectivamente en determinada localización del TR disminuyen la necesidad de liberar grandes dosis de fármaco en todo el pulmón para obtener la dosis efectiva en las vías aéreas como ocurre actualmente en la práctica clínica. Asimismo, los efectos adversos correspondientes a la administración de altas dosis del fármaco inhalado se podrían reducir gracias a la deposición selectiva [44].

Preparaciones para administración pulmonar

Según la Eur. Pharm. 9.0 son formulaciones sólidas o líquidas, destinadas a su administración en los pulmones, como vapores o aerosoles, con objeto de lograr un efecto local o general. Contienen uno o más principios activos disueltos o dispersados en un vehículo adecuado.

Dependiendo del tipo al que pertenezcan las preparaciones para inhalación pueden contener distintos excipientes como gases propulsores, co-disolventes, diluyentes, conservantes antimicrobianos, agentes solubilizantes y estabilizantes etc. Los excipientes no deben causar reacciones adversas en la mucosa del TR, ni afectar a sus funciones.

Las preparaciones para inhalación se clasifican principalmente en dispersiones de partículas sólidas o líquidas en gas que se administran empleando distintos dispositivos, en forma de nebulizadores, inhaladores en envase a presión (MDI) e inhaladores de polvo seco (DPI). Además, estas formulaciones se pueden presentar en envases multidosis o unidosis [45].

- *Nebulizadores de aerosoles*

A principios del siglo XIX, apareció el dispositivo accionado por vapor como terapia inhalatoria de elección. A pesar del desarrollo de nuevos dispositivos de nebulización para la generación de aerosoles terapéuticos y de diagnóstico, en la actualidad, la administración de fármacos en forma de aerosoles se encuentra en la tercera línea terapéutica con respecto a los MDI y DPI.

Los nebulizadores se utilizan frecuentemente en hospitales y centros ambulatorios. La principal ventaja que ofrecen estos dispositivos es permitir a los pacientes inhalar los aerosoles de medicamentos sin esfuerzos de inspiración, con la respiración basal y sin necesidad de entrenamiento en el uso del dispositivo. Por lo tanto, facilitan el uso en pacientes que no pueden coordinar su respiración con la activación del inhalador, como en el caso de ancianos y niños. Las actuales aplicaciones clínicas de la nebulización de soluciones y/o suspensiones para inhalación se basan fundamentalmente en el tratamiento del asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y las infecciones pulmonares. Otras aplicaciones terapéuticas de los nebulizadores incluyen la hipertensión arterial pulmonar y síntomas de abstinencia de la nicotina [45].

- *Inhaladores presurizados de dosificación*

En 1956, Riker Laboratories presentaron el primer MDI para el tratamiento del asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); lo que supuso un cambio significativo en la terapéutica pulmonar. Desde entonces, los MDIs han llegado a ofrecer un amplio abanico de formulaciones en el tratamiento del asma y del EPOC.

En el desarrollo de nuevos medicamentos MDIs hay dos parámetros fundamentales a considerar: la formulación y los componentes del dispositivo. La formulación consiste

en el fármaco, un propelente y, a menudo, excipientes y la forma farmacéutica suele ser una solución o una suspensión. Los componentes del dispositivo son: un vial de aluminio, lata o vidrio plastificado, una válvula de medición, un accionador y un contador de dosis.

El uso de propelentes presenta varias controversias sobre el uso de estos medicamentos como que no deben dañar la capa de ozono, ni contaminar el medio ambiente, además de la dificultad de formular con estos excipientes/ propelentes debido a la baja solubilidad del API y a la inestabilidad química del mismo, fundamentalmente debido a procesos de cristalización. Estas dificultades en la formulación conllevarían desde el punto de vista terapéutico a una liberación de dosis inexacta y una limitada capacidad de carga del fármaco, lo que afectaría a sus características farmacocinéticas y a la liberación del fármaco en el tracto respiratorio inferior.

La mayor parte de los estudios de desarrollo de nuevos MDIs se centran en el desarrollo de nuevos funcionamientos del dispositivo y la tecnología de los llamados dispositivos “sin carga”.

Clínicamente, el cumplimiento terapéutico por parte de los pacientes puede verse comprometido por los problemas de broncoconstricción (ej efecto Freón) y /o la necesidad de activar el dispositivo de inhalación simultáneamente con la inspiración, lo que supone una maniobra de inhalación compleja [46].

- *Inhaladores de polvo seco*

En 1967, aparece el primer inhalador de polvo seco de Fisons. Este tipo de inhaladores surge de la necesidad de superar los principales problemas de manejo de los MDI. Son considerados dispositivos “modernos” de inhalación y a lo largo de sus 50 años de historia se han comercializado distintos tipos de dispositivos. En la actualidad existen más de 20 dispositivos comercializados para inhalación de polvo seco distintos. Cada dispositivo DPI presenta una resistencia distinta al flujo inspiratorio de aire. A su vez, los DPIs pueden clasificarse en: DPI de dosis-única o multidosis, dependiendo del diseño del reservorio de la formulación y/o los componentes de la misma.

Dispositivos DPIs de “dosis-única” suelen necesitar ser cargados previamente a su uso, frecuentemente con cápsulas duras que contienen el polvo seco para inhalación. La principal desventaja de estos dispositivos es la necesaria cooperación del paciente en el cargado de la dosis en el dispositivo.

Dispositivos DPI “multi-dosis” suelen tener un número de dosis individuales, como cápsulas de gelatina o ampollas; de este modo, el fármaco está almacenado en dichos reservorios de polvo y las dosis son cargadas de forma individual.

Además, se ha utilizado la dinámica de fluidos computacional en los dispositivos DPI para evaluar la influencia de la geometría de la boquilla y la longitud de la misma, así como la estructura de la rejilla, el tamaño de la entrada de aire y la función de la cápsula en el rendimiento general del inhalador [47].

Clínicamente, los medicamentos DPI se utilizan en el tratamiento de las enfermedades clásicas del TR como el asma o EPOC.

De todas estas formulaciones para administración pulmonar, los polvos secos para inhalación representan el mayor número de medicamentos comercializados probablemente gracias a la facilidad de formulación, dosificación y administración de los mismos (Tabla 5).

Tabla 5. Ventajas e inconvenientes de los principales sistemas de administración pulmonar de medicamentos comercializados en España [48].

	Ventajas	Inconvenientes	Medicamentos comercializaos en Español
Nebulizador	-Tratamiento de urgencia, liberación rápida del fármaco. -Fácil manejo y utilización de forma pasiva por parte del paciente	-Incompatibilidad con la vida cotidiana, extra hospitalaria. -Dificultad de uso en tratamientos crónicos -No producen una adecuada distribución de tamaños -Incompatibles con fármacos sensibles al calor	Mesna G.E.S., Mucofluid 200 Mg/MI, Pulmotec Tm Crisol De Grafito
MDI	-Primera elección en el tratamiento de asma y EPOC -Tratamiento extra hospitalario	-Necesidad de entrenamiento en el manejo. -Propelentes nocivos para la capa de ozono -Etanol como vehículo de la formulación	Olfex Bucal Infantil, Olfex Bucal, Plusvent 25, Rilast, Salbutamol Sandoz, Seretide, Serevent, Symbicort, Trialona Budesonida Aldo Union, Budesonida Pulmictan Infantil, Budesonida Pulmictan, Salbutamol Aldo-Union, Salmeterol/Fluticasona Kern Pharma, Ventoaldo, Ventoduo, Ventolin
DPI	-Facilidad de uso y manejo -No utilizan propelentes -Dispositivos portátiles y duraderos -Liberación de tamaños de partícula eficaces para actuar en todo el TR	-Dispositivos activados por la inspiración del paciente	Adasuve, Airflusal Forspiro, Anasma Accuhaler, Anoro Ellipta, Asmanex Twisthaler, Beglan Accuhaler, Betamican Accuhaler, Eklira Genuair, Duaklir Genuair, Flixotide Accuhaler, Flusonal Accuhaler, Foradil Aerolizer, Formodual Nexthaler, Formoterol Stada, Foster Nexthaler, Gibiter Easyhaler, Inalacor Accuhaler, Inaladuo Accuhaler, Inaspir Accuhaler, Incruse Ellipta, Laventair Ellipta, Miflonide Breezhaler, Onbrez Breezhaler, Oxis Turbuhaler, Plusvent Accuhaler, Pulmicort Turbuhaler, Relenza, Relvar, Ellipta, Revinty Ellipta, Rilast Forte Turbuhaler, Rilast Turbuhaler, Rolufta Ellipta, Seebri Breezhaler, Seretide Accuhaler, Serevent Accuhaler, Spiriva 18 Microgramos, Symbicort Forte Turbuhaler, Symbicort Turbuhaler, Terbasmin Turbuhaler, Tobi Podhaler, Tovanor Breezhaler, Trelegy Ellipta, Trialona Accuhaler, Ultibro Breezhaler, Biresp Spiromax, Braltus, Budesonida Easyhaler, Bufomix Easyhaler, Duoresp Spiromax, Flixotide Accuhaler, Flusamix Easyhaler, Formatrix Novolizer, Formoterol Aldo-Unión Gregal, Inhalok Forspiro, Novopulm Novolizer, Osmohale Provocholine, Ulunar Breezhaler, Ventilastin Novolizer, Salbutamol Clickhaler, Brimica Genuair, Bronchitol 40 Mg, Colobreathe 1.662.500 Ui, Enurev Breezhaler, Hirobriz, Breezhaler, Oslif Breezhaler, Xoterna Breezhaler

Procedimiento de elaboración y excipientes utilizados en el desarrollo de DPI

La liberación de fármacos en el pulmón tiene como principales ventajas la reducción de los efectos adversos derivados de la administración IV y la reducción de la dosis necesaria para alcanzar la dosis eficaz en los pulmones. Además, se ha demostrado la eficacia de los medicamentos administrados por vía pulmonar en la liberación sistémica de fármacos [49].

La elección de excipientes usados para potenciar las propiedades fisicoquímicas de las partículas para inhalación es muy limitada. Existen nuevas estrategias que se centran en la ingeniería de partículas y que ofrecen la posibilidad de desarrollar formulaciones controlando las propiedades que se desean alcanzar, como el tamaño de partícula o la distribución del fármaco. A pesar de que pocos excipientes están autorizados para la administración pulmonar, existe una necesidad especial de desarrollar nuevas partículas o encontrar excipientes que potencien la deposición del fármaco en los pulmones [49, 50].

Al igual que en las formulaciones MDI la distribución de tamaños de gotícula afecta a la deposición del fármaco en los pulmones, la separación de las partículas sólidas en las formulaciones DPI es la característica de funcionamiento más importante para asegurar una deposición del fármaco en la zona deseada del TR.

El diámetro aerodinámico de las partículas (MMAD) es una de las variables características y más importantes de las formulaciones DPI, junto con la forma, la densidad y la higroscopicidad de las partículas. Este parámetro es medido de forma rutinaria por técnicas de evaluación de tamaño basadas en el impacto inercial [49, 51]. Para asegurar una deposición eficiente en el TR de las partículas sólidas liberadas en forma de aerosol, el tamaño aerodinámico debe estar comprendido entre 1 y 5 μm , como previamente se ha descrito en este capítulo [51].

Uno de los métodos para mejorar las propiedades de flujo de las partículas de fármacos micronizadas es a través de la formulación junto con excipientes que faciliten el transporte a los órganos diana.

Con objeto de que las partículas lleguen a los órganos diana suficientemente separadas entre sí, se debe superar las fuerzas de interacción entre las partículas.

Las cuatro principales fuerzas de interacción entre las partículas se clasifican en: fuerzas mecánicas debido a la superficie rugosa de las partículas, fuerzas capilares por la presencia de agua, fuerzas electroestáticas por la naturaleza aislante de los materiales y fuerzas de Van der Waals por la naturaleza electroestática de la materia [49]. Estas fuerzas están relacionadas con el diámetro del poro entre partículas y la tensión interfacial debido a los enlaces de hidrógeno del agua. Controlando el contenido en humedad se reducen las fuerzas capilares, pero existe riesgo de aumentar la carga superficial de las partículas. Las formulaciones farmacéuticas en polvo suelen ser poco conductoras y la carga electroestática juega un papel fundamental en su capacidad de dispersión [52]. Las fuerzas capilares surgen de la condensación de las moléculas de agua en la superficie de las partículas. En concreto, al disminuir la humedad relativa (RH), un material cristalino solo adsorbe agua en su superficie y la absorción de la humedad a su vez dependerá de la superficie específica del material y de la RH del entorno. Si por el contrario la RH aumenta, se formará una capa completa de moléculas de agua en la superficie de las partículas sólidas cristalinas. Este hecho confiere a las partículas de fármaco/excipientes un aumento de las fuerzas adhesivas y cohesivas. Por ello, los fármacos higroscópicos presentan un alto riesgo de inestabilidad química y física. La captación y pérdida de humedad debido a los cambios en la RH puede llevar a una agregación irreversible de las partículas a través de la formación de aglomerado, que afectarán en última instancia a la formación del aerosol de partículas y la deposición en el pulmón [53]. Además, la variación en la rugosidad de la superficie de las partículas puede alterar el área de contacto entre superficies contiguas y con ello las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno entre las partículas [54].

Es necesario evitar estas fuerzas de adhesión y cohesión entre partículas para obtener una dispersión de partículas en forma de aerosol adecuada a la administración pulmonar.

Los nuevos avances en tecnología farmacéutica y la ingeniería de partículas para obtener partículas de administración pulmonar, permiten una liberación eficaz del fármaco a

pesar del limitado número de excipientes disponibles para su uso en esta vía de administración.

El principal objetivo de estos avances en ingeniería de partículas se basa en obtener las propiedades deseadas para una formulación DPI. Estas propiedades ideales de una formulación DPI son: pequeño MMAD de las partículas entre 1 y 5 μm , una distribución de tamaños de partículas adecuada, una dispersabilidad óptima de la formulación, una correcta estabilidad del fármaco y una liberación controlada y dirigida del fármaco al órgano diana [49]. Para ello es necesario conocer las especificaciones de los medicamentos inhalados y los requerimientos de la liberación del fármaco de los mismos, lo que supone una de las áreas más complejas y novedosas en el desarrollo de medicamentos inhalados.

La atomización es uno de los métodos en los que se basa la tecnología farmacéutica para obtener formulaciones DPI. El proceso consiste en convertir una formulación líquida en partículas sólidas, secas en un solo paso. La formulación líquida puede ser una solución, una suspensión fina o gruesa o una dispersión coloidal. En líneas generales, este método consiste en un primer paso en el que la formulación líquida es nebulizada en forma de aerosol y cuando entra en contacto con un gas a alta temperatura (aire o nitrógeno) se produce una rápida evaporación del solvente, formando partículas sólidas secas. Finalmente, las partículas secas se separan del gas por precipitación en el interior de un ciclón electroestático [55].

Los principales métodos de atomización descritos son: de centrífuga, neumático, ultrasónico, electroestático y efervescente. La atomización neumática o de doble fluido es la más utilizada para generar partículas de tamaño adecuado para productos de inhalación y para su uso a escala de laboratorio de investigación. Este tipo de atomización se caracteriza por una alimentación de líquido bombeada a caudales bajos, que llega a una pistola de atomización (con distintos diseños y características) donde entra en contacto con un gas a baja presión, alta velocidad y alta temperatura y se genera un aerosol de partículas [56].

En comparación con otras técnicas para obtener partículas para inhalación como es el método de micronización, la atomización ofrece partículas de forma más esférica, con

una menor área de contacto entre ellas y una distribución de tamaño de partícula más pequeña y homogénea, lo que da como resultado una fracción respirable más alta que el propio fármaco micronizado.

Una de las principales ventajas del proceso de atomización es la posibilidad de controlar las variables del proceso que afectan a las características finales de la formulación. Una de las principales características es el MMAD que garantiza la deposición del fármaco en cualquier punto del aparato respiratorio a la frecuencia de inhalación normal. También es importante tener en cuenta que las partículas atomizadas a partir de soluciones suelen ser amorfas mientras que si se desea mantener el estado cristalino de los fármacos se suele preparar una suspensión para posteriormente atomizarla [57].

Asimismo, el proceso de atomización se puede utilizar a escala industrial en la fabricación de medicamentos.

Resulta interesante mencionar que tras la atomización de algunos fármacos como es el caso de la Tobramicina, se consiguió mejorar notablemente los valores de porcentaje de fracción de finos (FPF) pasando de un $36 \pm 6\%$ del fármaco sin procesar a un $49,3 \pm 0,8\%$ después de la atomización, lo cual mejora la eficacia del tratamiento [58].

En relación con los excipientes utilizados en la administración pulmonar de fármacos, en concreto en las formulaciones DPI, suelen ser principalmente excipientes transportadores, como ya se ha mencionado anteriormente. Por lo general la dosis de fármaco contenido en estas formulaciones suele ser del orden de miligramos o incluso microgramos y los excipientes proporcionan volumen a la formulación (pueden llegar a suponer hasta el 99% de la formulación) lo que mejora el manejo, la dispensación y dosificación del fármaco.

Los excipientes actuales aprobados por la FDA para la administración pulmonar son muy limitados y no son aceptados de forma global en todo el mundo. A pesar de la aparente falta de opciones, el excipiente debe ser cuidadosamente seleccionado dado que sus propiedades fisicoquímicas como el tamaño de partícula y morfología afectan a las propiedades finales de la formulación (Tabla 6) [49].

Los excipientes más comúnmente utilizados para la administración oral de fármacos como son polímeros (metilcelulosa o cross-povidona) o surfactantes aniónicos no pueden ser utilizados para la administración pulmonar debido a su naturaleza irritante o no degradable en el TR. Tampoco los excipientes utilizados en nebulizadores o en las formulaciones MPI como son polisorbatos, trioleato de sorbitano o ácido oléico están incluidos en el desarrollo de medicamentos DPI debido a su estado líquido o semisólido y su bajo punto de fusión. La Tabla 6 presenta un resumen de los excipientes aprobados para la administración pulmonar de fármacos en la actualidad. En general, se consideran excipientes adecuados para la administración pulmonar en medicamentos DPI, aquellos que son biocompatibles a nivel endógeno con el pulmón o que puedan metabolizarse fácilmente. En el caso de que las partículas de excipiente se depositen a lo largo de las vías respiratorias conductoras, estas se eliminarán por aclaramiento mucociliar. En el caso de que las partículas inhaladas se depositen en los bronquios o alveolos, estas partículas de excipiente serán eliminadas por absorción directa a través de las células epiteliales o por su captación por los macrófagos alveolares [71].

- *Lactosa*

Actualmente, la lactosa es el excipiente transportador más utilizado en las formulaciones DPI comercializadas (por ejemplo: Flixotide®, Seretide®, Spiriva® y Symbicort®). Tiene un perfil de seguridad y estabilidad adecuado y estudios de inhalación en humanos demuestran que no tiene efectos locales.

Aun así, la lactosa para inhalación cumple unos procesos de fabricación y unos estrictos controles de pureza y propiedades fisicoquímicas para asegurar la eficacia de su uso en estas formulaciones. Asimismo, es fácil de obtener y es barata.

Las partículas de lactosa al ser más grandes que las partículas respirables, se depositarán en la boca y garganta, donde se hidrolizan por enzimas de origen bacteriano y se metabolizarán posteriormente. Además, la lactosa más utilizada en la administración pulmonar es la α -lactosa monohidrato, que a su vez es cristalina, favoreciendo la separación entre partículas y por lo tanto mejorando la eficacia de la inhalación del fármaco.

Los principales problemas del uso de lactosa son las intolerancias a la misma; debido a su función reductora asociada al azúcar puede interaccionar con los grupos funcionales de los fármacos y, además, el gran tamaño de partícula de la lactosa con respecto a muchos fármacos ofrece problemas en la uniformidad de contenido de la formulación final.

Otros azúcares han sido estudiados como potenciales transportadores en medicamentos DPI como son manitol, glucosa monohidrato, trehalosa, dextrosa, maltosa, manosa, sorbitol, maltitol y xilitol. Estos tres últimos presentan en algunas ocasiones problemas en su utilización en DPI debido a su higroscopicidad.

La trehalosa y la rafinosa han demostrado ser una prometedora alternativa a la lactosa, aunque aún no se encuentran aprobadas para su administración pulmonar [59].

Un beneficio adicional que ofrecen los azúcares como excipientes transportadores en formulaciones DPI es el sabor y la sensación que dejan tras la inhalación lo que sirve de confirmación al paciente de que se ha administrado correctamente la dosis.

En relación con su naturaleza higroscópica, las propiedades de flujo de los azúcares no son las óptimas para las formulaciones DPI. Está demostrado que los derivados de dióxido de silicio hidrofóbico mejorarían estas características de flujo y a su vez aumentarían los niveles de FPF, sin embargo, no pueden ser utilizados en la práctica clínica debido a su toxicidad pulmonar.

Existen otros excipientes que podrían complementar a lactosa y mejorarían las características de las formulaciones DPI sin causar toxicidad [72].

▪ *Lípidos*

Los lípidos en el campo de la administración de fármacos se consideran seguros, GRAS (generally recognized as safe) ya que de forma general, son compuestos biodegradables y biocompatibles muy similares a los endógenos del pulmón (el surfactante natural del pulmón está formado un 90% por lípidos) y en el TR entre los que se encuentran dipalmitol fosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolinas insaturadas (35%), fosfaridilglicerol (10%), fosfatidilinositol (2%), fosfatidiletanolamina (3%) y esfingomielina (2.5%) y un restante 3% de lípidos neutros, principalmente colesterol. Dentro de las formulaciones

lipídicas, los liposomas son los más utilizados en la administración pulmonar. Los liposomas pueden estar formados por una amplia variedad de fosfolípidos endógenos del TR entre los cuales se encapsulan fármacos tanto lipofílicos como hidrofílicos en un amplio rango de tamaños de partícula. Se administran frecuentemente en solución acuosa por nebulización. La mayoría de estos liposomas producen una liberación controlada del fármaco e incluso reducen la toxicidad de alguno de ellos, así como favorecen la desaglomeración de las partículas de polvo que por su naturaleza tienden a agregarse y así facilitan que puedan llegar hasta zonas profundas del TR y a los alveolos. El mayor reto es conseguir el tamaño de partícula adecuado para la administración inhalatoria en formulaciones DPI. Además, se ha observado que la presencia de DPPC influye en la morfología final de las partículas, a mayor cantidad de DPPC mayor esfericidad de las mismas [62].

Un potencial inconveniente a tener en cuenta en la fabricación de DPI que contienen fosfolípidos por atomización es la temperatura de transición de fase de los fosfolípidos que, si se supera, puede aumentar el MMAD de la formulación final [62].

▪ *Aminoácidos*

También se ha demostrado la capacidad de los aminoácidos para disminuir la higroscopicidad y mejorar la densidad de carga en superficie de las partículas. Estudios con aminoácidos como son glicina, alanina, leucina e isoleucina, en formulaciones DPI desarrolladas por atomización han demostrado alcanzar una mayor deposición *in vitro* de la formulación. Por otra parte, los aminoácidos pueden proteger a péptidos y proteínas de la desnaturalización o estrés por temperatura y actúan como crioprotectores [73].

La adición del aminoácido leucina en formulaciones para inhalación demostró que mejoraban notablemente las características de la aerosolización del polvo. Un ejemplo, son las formulaciones desarrolladas a partir de soluciones atomizadas que contienen un 10-20% de leucina en agua o metanol ofreciendo un resultado óptimo de aerosolización del polvo final [74].

Además, se ha demostrado la influencia de la cantidad de leucina en la disminución de las fuerzas cohesivas entre partículas que por tanto disminuye el MMAD de la formulación final; esto es debido a la actividad surfactante de dicho aminoácido, reduciendo el tamaño de gotícula en el proceso de atomización, orientando los grupos hidrófobos hacia el aire en la interfaz aire/líquido durante el proceso y proporcionando una superficie hidrófoba a la partícula seca.

Asimismo, otros estudios demuestran esta misma actividad beneficiosa para las formulaciones DPI que incluyen isoleucina o trileucina en su composición [64, 74].

A pesar de no disponer de suficientes datos de toxicidad pulmonar o sistémica relativos al uso de estos aminoácidos en formulaciones para administración pulmonar, al tratarse de sustancias endógenas, probablemente no suponen un potencial riesgo para la salud.

▪ *Surfactantes*

El uso de los surfactantes utilizados en formulaciones MDI, como ya se ha mencionado anteriormente, no está aceptado para la administración en DPI. Sin embargo, el uso de poloxamer o fosfatidilcolina en la preparación de partículas de baja densidad condujo a nuevos avances en el desarrollo de DPI. Entre estos estudios, se encuentra el uso de polisorbato 80 y poloxamer 407 en formulaciones DPI de itraconazol que no mostraron toxicidad ni reacción inflamatoria (asociada a la producción de citoquinas proinflamatorias), ni cambios histológicos al ser administrados a ratones por nebulización cada 12 h durante 12 días [65].

El uso de surfactantes como excipientes en las formulaciones DPI se basa generalmente en la formulación de una emulsión que será atomizada, la fase oleosa funciona como un agente de “inflado” o “soplado” lo que retardará el secado de las gotículas, creando un poro o vacío entre las partículas. Como resultado, los MMAD suelen estar comprendidos entre 5 y 7 μm y la densidad aparente aproximadamente de 0,4 g/cm^3 . Una de las principales ventajas que ofrecen estas formulaciones es la baja cantidad de excipiente utilizada (menos de un 5 % expresado como porcentaje de API), permitiendo aumentar la concentración de fármaco en el lugar de acción y minimizando la posible toxicidad de los excipientes en el TR [71].

- *Excipientes promotores de la absorción sistémica*

El uso de excipientes promotores de la absorción sistémica se ha investigado principalmente para la administración pulmonar de péptidos y proteínas. El mecanismo de acción de estos promotores podría ser una distorsión o deformación de la capa de células epiteliales alveolares, lo que potencialmente podría provocar la entrada de partículas de polvo inhaladas durante la respiración, así como alérgenos exógenos, por lo que el uso de determinados promotores de la absorción supone, a día de hoy, una controversia respecto a la posible toxicidad pulmonar a largo plazo [66].

Las ciclodextrinas (CD) han demostrado proporcionar muchos beneficios en la administración pulmonar de fármacos como son: la solubilización del fármaco, la mejora de la absorción sistémica y el aumento de biodisponibilidad de fármacos hidrófobos o con cadenas hidrofóbicas en el interior de sus cavidades apolares, confiriéndoles así la posibilidad de mejorar las propiedades del fármaco inhalado. Las CD han sido descritas tanto como sistemas de liberación controlada como adyuvantes en el diseño de nuevos sistemas de liberación de fármacos como son los liposomas, microesferas y nanopartículas [49]. Además, se ha demostrado la actividad de las CD como potenciadores de la absorción sistémica de proteínas, como la hormona de crecimiento humana, la insulina o la ciclosporina A mediante su administración pulmonar [66, 75]. El efecto de la CD en la actividad metabólica de las células respiratorias y en la permeabilidad *in vitro* está directamente relacionado con la cantidad de CD y el grado de sustitución de la misma [49]. Los niveles de seguridad de las CD a nivel pulmonar son bastante esperanzadores, ya que no se han descrito casos de disminución de la viabilidad celular a concentraciones menores o iguales a 1 Mm. En términos de citotoxicidad local la γ CD es la más segura para su uso en administración pulmonar, al contrario que la β -CD metilada [75].

Tras la administración intratraqueal de formulaciones DPI conteniendo CD en conejos se han detectado concentraciones plasmáticas de fármaco entre 66 y 80% y además no se han observado posibles efectos nocivos de las CD en el parénquima pulmonar o árbol bronquial [67].

Las sales biliares como las sales de colato sódico, deoxicolato, glicocolato, glicoxicolato, taurocolato o taurodeoxicolato, se emplean comúnmente, aparte de como tensoactivos, como potenciadores de la absorción, aumentando el transporte transcelular a través de la interacción o fluidificación de la membrana que, posteriormente, se vuelve más permeable. Aunque los resultados de biodisponibilidad del fármaco en circulación sistémica tras el uso de sales biliares como excipiente de administración pulmonar fueron prometedores, altas cantidades de dichas sales pueden provocar efectos nocivos, ya que dañan la superficie epitelial. Especialmente el sodio taurocolato mostró una toxicidad dependiente de la concentración cuando se administró en células Caco-2, disminuyendo la viabilidad celular de las mismas [49].

Otros excipientes que potencian la absorción sistémica tras la administración pulmonar son los inhibidores de proteasa como el nafamostat mesilato o la bacitracina. También ácidos grasos como ácido oléico, palmitoléico o linoléico tienen potentes efectos sobre la absorción sistémica de fármacos [66]. El ácido cítrico resultó ser eficaz en la administración pulmonar de insulina, mejorando y prolongando el efecto de hipoglucemia. La hipótesis de este hecho se basa en la formación de micelas por el surfactante de la mucosa pulmonar que atraparía la insulina, evitando su absorción, mientras que el ácido cítrico impediría la formación de estos monómeros y, por tanto, mejoraría su absorción [49].

El quitosán y el trimetilchitosán, son polisacáridos catiónicos que también se han utilizado ampliamente como potenciadores de la absorción de proteínas y péptidos. El efecto bioadhesivo de las partículas de quitosán mejora la absorción de fármacos tras la inhalación. Sin embargo, han sido descritos casos de efecto inflamatorio local dependiente de la dosis tras la administración de estos excipientes y, además, pueden causar efectos no deseados en la estabilidad química y física de las proteínas [69].

- *Polímeros naturales y biodegradables*

El uso de polímeros naturales y biodegradables en el desarrollo de medicamentos inhalados es uno de los campos de investigación más recientes. Un ejemplo es el caso de microesferas biodegradables producidas a partir del ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA), que previamente ha sido estudiado como transportador de fármacos para

liberación sostenida en diferentes rutas de administración. En comparación con los liposomas, las microesferas biodegradables pueden ser fisicoquímicamente más estables tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que les permitiría una liberación sostenida de fármaco en el TR.

En resumen, la elección del excipiente es una fase crítica en el desarrollo de formulaciones pulmonares. Un excipiente en virtud de su naturaleza y propiedades, y teniendo en cuenta las propiedades y características del fármaco con el que se combinará, puede ofrecer las características fisicoquímicas adecuadas para la dosificación eficaz del fármaco en el TR.

Por otra parte, se han desarrollado partículas “libres de transportador” es decir, sin excipientes, que se obtienen a partir de la esferonización controlada del fármaco para obtener tamaños de partícula adecuados y conseguir mayor dosificación del mismo. La tecnología del dispositivo de inhalación también puede ayudar en estos casos a mejorar las propiedades de flujo o a romper los posibles aglomerados. Por ejemplo, el cromoglicato de sodio ha sido granulado y redispersado sin necesidad del uso de excipientes [49]. Algunos medicamentos comercializados como Pulmicort[®] o Bricanyl[®] no emplean excipientes transportadores, incluso con dosis bajas de fármaco (budesonida y terbutalina respectivamente) [48].

Tabla 6. Lista de excipientes aprobados o en fase de investigación para formulaciones DPI (Adaptado de [49]).

Excipiente	Descripción	Estado
Azúcares <ul style="list-style-type: none"> • Lactosa • Glucosa • Manitol • Trehalosa • Manosa • Rafinosa 	Transportador grueso o fino	Aprobado Aprobado Aprobado [59] [60] [61]
Aditivos Hidrofóbicos <ul style="list-style-type: none"> • Estearato de Mg 	Protección del fármaco frente a la humedad	Aprobado (SkyeProtect™)
Lípidos <ul style="list-style-type: none"> • Fosfatidilcolina • DPPC, colesterol, fosfolípidos 	Usados en el recubrimiento de la matriz de liposomas	Aprobado TOBI®Podhaler™ [62]
Aminoácidos <ul style="list-style-type: none"> • Leucina, glicina • Trileucina, isoleucina 	Mejoran las propiedades del aerosol de partículas	Aprobado (Exubera®) [63] [64]
Surfactantes <ul style="list-style-type: none"> • Poloxamer • Sales biliares 	Partículas de baja densidad y porosas	[65] [66]
Potenciadores de la absorción <ul style="list-style-type: none"> • γCD • Sales biliares • Chitosán y trietilchitosán 	Adsorción de proteínas y péptidos	[66, 67] [68, 69] [69]
Polímeros biodegradables <ul style="list-style-type: none"> • PLGA, PLA, PGA 	Usados en liberación controlada de fármacos	[70]

Terapia antifúngica Inhalatoria. Actualidad y nuevos avances.

Cada vez son más el número de enfermedades que se tratan con medicamentos inhalados. Sin embargo, el tratamiento por vía inhalatoria de infecciones fúngicas pulmonares (como aspergilosis) sigue siendo un punto de mira de la investigación terapéutica actual [76-78]. Los datos clínicos disponibles revelan que el tratamiento antifúngico hospitalario consiste en la administración oral e intravenosa de fármacos antifúngicos, pese a la mayor incidencia de infecciones fúngicas pulmonares (19.2%) [79].

El 28 de agosto de 2006 la Comisión Europea concedió al AmBisome® la designación de medicamento huérfano (para inhalación) en el tratamiento y prevención de infecciones fúngicas pulmonares en pacientes de riesgo [80].

Existen numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* que demuestran la eficacia de la AmB y de las formulaciones comercializadas mediante nebulización en el tratamiento y profilaxis de IPA y otras infecciones fúngicas pulmonares (Tabla 7).

Tabla 7: Resumen de los últimos estudios en relación con la AmB para la administración pulmonar.

Formulación	Tratamiento/Dosis	Resultado	Ref
AmB nebulizada	Formulación con excipientes surfactantes no iónicos	Se potenció la liberación de AmB en pulmón e hígado, reduciendo la toxicidad sistémica	[81]
	Tratamiento profiláctico. Ensayo randomizado con placebo.	Menor incidencia de IPA en pacientes	[82]
	12,5 mg dos veces al día/3 semanas en combinación con voriconazol	Caso clínico de eficacia del tratamiento de AmB nebulizada en IPA	[83]
	Se compara eficacia de formulaciones: AmB-Doc; AmB liposomal; AmB complejo lipídico y AmB DC	MMAD: 1,38; 2,43; 0,90 y 2,29 μm respectivamente. Eficacia de las formulaciones en la profilaxis de IPA <i>in vitro</i> en ratas. AmB liposomal resultado eficaz incluso 6 semanas antes de la inoculación	[84]
AmBisome® nebulizado	Comparación con Fungizone®	Eficacia <i>in vitro</i> , presentando mayor FPF comprendida entre 3 y 5 μm .	[85]
	ND	Se consigue una administración sistémica eficaz en mucormicosis, evitando toxicidad sistémica	[86]
	Nebulizado con AeroEclipse®	Eficacia <i>in vitro</i> . MMAD: 3,7 μm y el 60% de las FPF < 5 μm . Además los liposomas mantienen su estructura después de la nebulización	[87]
	0,3mg/kg de AmB	Eficacia en el tratamiento de infección por <i>Cryptococcus</i> local y sistémica	[88]
AmB liposomal nebulizada	3 mg/kg/día a 50 mg/kg/día	Eficacia probada en mucormicosis en pacientes con leucemia	[89]
	1,13 a 2,3 mg/kg/día	Eficacia <i>in vivo</i> en modelos murinos disminuyendo el número de CFU y los niveles de glucosamina en los pulmones	[90]
	ND	Eficacia <i>in vitro</i> ; concentración de AmB en pulmones (46,7 \pm 10,5 $\mu\text{g/g}$.) frente a los valores obtenidos con AmB IV (16,4 \pm 2,4 $\mu\text{g/g}$).	[91]
	15-20 mg/ dos veces al día junto con AmB y Caspofungina IV	Eficacia de la terapia combinada en el tratamiento y profilaxis de IPA en pacientes inmunodeprimidos	[92]
	Ensayo randomizado frente a placebo en pacientes con enfermedades hematológicas	Del grupo de pacientes tratados con AmB (91), 2 desarrollaron IPA, mientras que los tratados con placebo (97) 13 desarrollaron la enfermedad	[93]
	Ensayo controlado con placebo en pacientes con enfermedades hematológicas	La fuerza expiratoria y la capacidad pulmonar vital no se vieron afectados en pacientes tratados con AmB. Tampoco la función hepática ni renal fueron alteradas. El evento adverso más frecuente fue tos ($p < 0,0001$)	[94]
	Terapia combinada con administración intraperitoneal de micafungina	Eficacia <i>in vitro</i> de la terapia combinada frente a la monoterapia, mayor ratio de supervivencia en modelos murinos con IPA.	[95]
	ND	Eficacia de la administración pulmonar de AmB en caso clínico de una mujer de 33 años con IPA tras trasplante de pulmón	[96]
	Ensayo clínico	El tratamiento o profilaxis de IPA con AmB nebulizada no afecta al surfactante natural del pulmón, ni al contenido en fosfolípidos, ni colesterol ni al ratio de fosfolípidos agregados pequeños/grandes (marcador de lesión alveolar)	[97]
	Nebulización 1 a 5 días post infección	Eficacia <i>in vivo</i> en ratones con mucormicosis causada por <i>Rhizopus oryzae</i>	[98]
3 mg/kg/día	Eficaz en el tratamiento de infección pulmonar por <i>Hormographiella aspergillata</i>	[99]	
Tratamiento en comparación con la terapia antifúngica sistémica	No fueron detectadas diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,002$)	[76]	
AmB-complejo lipido nebulizada	Caso clínico	Eficacia y seguridad del tratamiento frente a IPA frente a voriconazol o la AmB liposomal IV	[100]

Nota: DC: dispersión coloidal; IPA: aspergilosis pulmonar invasiva; ND: no disponible.

En cuanto al uso de la AmB en formulaciones DPI no existe ningún medicamento comercializado y se está desarrollando una nueva línea de investigación en este campo ofrece resultados prometedores (Tabla 8) [101, 102].

Tabla 8: Estudios de AmB en formulaciones DPI

Formulación	Composición/Dosis	Resultado	Ref
AmB formulación DPI	Liposomas con carga positiva y negativa, desarrollados por método de evaporación de fase reversa. Excipiente Lactosa ratio (1:6 w/w)	FPF de 19,6 a 25,8 %	[101]
	Formulación de AmB (50%) y diestearoilfosfatidilcolina 0,5, 4 o 10 mg/kg 24h	Eficacia de una administración única de 4 mg/kg en la profilaxis IPA en modelos guinea pig	[102]

Los ensayos clínicos relacionados con la administración pulmonar de AmB, se basan en la aerosolización de AmB liposomal, sin embargo, la mayoría de ellos no han concluido con la publicación de resultados [103].

- Existen dos estudios no randomizados, intervencionales que estudiaron los perfiles farmacocinéticos de la inhalación del complejo lipídico Abelcet® y AmBisome® en forma de aerosol. Estos estudios fueron realizados por la Universidad de Pittsburg-Enzon Pharmaceuticals.Inc. en 2005. Se determinó la concentración de AmB mínima necesaria en el líquido de revestimiento epitelial del pulmón para prevenir infecciones fúngicas en pulmones trasplantados. Además, la concentración eficaz de AmB, por encima de la mínima inhibitoria frente a *Aspergillus*, se obtenía alrededor de 24 h después de la última dosis inhalada de 1 mg/kg/día.
- Un estudio intervencional de fase II llevado a cabo en 2015 por la Fundació Sant Joan de Déu en colaboración con el Ministerio de Sanidad, estableció los límites de seguridad y eficacia de la nebulización del medicamento Abelcet® en la profilaxis de

la aspergilosis pulmonar invasiva (IPA) en pacientes pediátricos con leucemia inducida por quimioterapia. El 68% de los participantes experimentó eventos adversos como fiebre o neutropenia, pese a la eficacia del tratamiento [103].

En definitiva, se está haciendo un gran esfuerzo para conseguir mejorar el arsenal terapéutico para paliar de infecciones fúngicas pulmonares

3 Referencias- Introducción:

1. *Catálogo de Medicamentos-Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos*. 2017.
2. Serrano, D.R., et al., *Oral particle uptake and organ targeting drives the activity of amphotericin B nanoparticles*. *Mol Pharm*, 2015. **12**(2): p. 420-31.
3. Torrado, J.J., D.R. Serrano, and I.F. Uchegbu, *The oral delivery of amphotericin B*. *Ther Deliv*, 2013. **4**(1): p. 9-12.
4. *USP45-NF24*. 2018.
5. Sasaki, J., et al., *Pharmacokinetics of a polyene antifungal agent, liposomal amphotericin B (L-AMB), in a severely burned patient*. *J Chemother*, 2014. **26**(5): p. 312-4.
6. Zielinska, J., et al., *Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 19109.
7. Kapoor, B., et al., *Application of liposomes in treatment of rheumatoid arthritis: quo vadis*. *ScientificWorldJournal*, 2014: p. 978351.
8. Fernandez-Garcia, R., et al., *Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: The role of amphotericin B and drug targeting*. *Int J Pharm*, 2017. **525**(1): p. 139-148.
9. Iyama, S., et al., *[Evaluation of the efficacy of liposomal amphotericin B]*. *Kansenshogaku Zasshi*, 2010. **84**(2): p. 182-6.
10. Smith, L., et al., *Orally Bioavailable and Effective Buparvaquone Lipid-Based Nanomedicines for Visceral Leishmaniasis*. *Mol Pharm*, 2018. **15**(7): p. 2570-2583.
11. Rolon, M., et al., *Engineering Oral and Parenteral Amorphous Amphotericin B Formulations against Experimental Trypanosoma cruzi Infections*. *Mol Pharm*, 2017. **14**(4): p. 1095-1106.
12. Salih, N.A., et al., *Liposomal amphotericin B for complicated visceral leishmaniasis (kala-azar) in eastern Sudan: how effective is treatment for this neglected disease?* *Trop Med Int Health*, 2014. **19**(2): p. 146-52.
13. Comité Editorial de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, C., *[Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: New stage, new challenges]*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2017. **35**(1): p. 1-2.
14. Schaffner, A. and P.G. Frick, *The effect of ketoconazole on amphotericin B in a model of disseminated aspergillosis*. *J Infect Dis*, 1985. **151**(5): p. 902-10.
15. Cartwright, R.Y., *Antifungal drugs*. *J Antimicrob Chemother*, 1975. **1**(2): p. 141-62.
16. Simitsopoulou, M., et al., *Interaction of amphotericin B lipid formulations and triazoles with human polymorphonuclear leucocytes for antifungal activity against Zygomycetes*. *Mycoses*, 2008. **51**(2): p. 147-54.
17. Sud, I.J. and D.S. Feingold, *Effect of ketoconazole on the fungicidal action of amphotericin B in Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1983. **23**(1): p. 185-7.
18. Malewicz, B., M. Momsen, and H.M. Jenkin, *Combined effect of acyclovir and amphotericin B on the replication of pseudorabies virus in BHK-21 cells*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1983. **23**(1): p. 119-24.
19. Bickers, D.R., *Antifungal therapy: potential interactions with other classes of drugs*. *J Am Acad Dermatol*, 1994. **31**(3 Pt 2): p. S87-90.
20. Antoniskis, D. and R.A. Larsen, *Acute, rapidly progressive renal failure with simultaneous use of amphotericin B and pentamidine*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990. **34**(3): p. 470-2.
21. Mosimann, V., et al., *Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review*. *Acta Trop*, 2018. **182**: p. 246-250.

22. Katz, H.I., *Drug interactions of the newer oral antifungal agents*. Br J Dermatol, 1999. **141 Suppl 56**: p. 26-32.
23. Agarwal, P.K., et al., *Efficacy of topical and systemic itraconazole as a broad-spectrum antifungal agent in mycotic corneal ulcer. A preliminary study*. Indian J Ophthalmol, 2001. **49(3)**: p. 173-6.
24. Rojas, F.D., et al., *Antifungal susceptibility of Malassezia furfur, Malassezia sympodialis, and Malassezia globosa to azole drugs and amphotericin B evaluated using a broth microdilution method*. Med Mycol, 2014. **52(6)**: p. 641-6.
25. Maesaki, S., et al., *Effect of sequential combination of amphotericin B and azole antifungal agents against Aspergillus fumigatus*. J Infect Chemother, 1999. **5(3)**: p. 125-129.
26. Cavalheiro, A.S., et al., *In vitro activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against Pythium insidiosum*. Vet Microbiol, 2009. **137(3-4)**: p. 408-11.
27. Masia Canuto, M. and F. Gutierrez Rodero, *Antifungal drug resistance to azoles and polyenes*. Lancet Infect Dis, 2002. **2(9)**: p. 550-63.
28. Verweij, P.E., et al., *Azole Resistance in Aspergillus fumigatus: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles?* Clin Infect Dis, 2016. **62(3)**: p. 362-8.
29. Ibrahim, F., et al., *Efficacy of an oral and tropically stable lipid-based formulation of Amphotericin B (iCo-010) in an experimental mouse model of systemic candidiasis*. Lipids Health Dis, 2013. **12**: p. 158.
30. Ching, M.S., et al., *Absorption of orally administered amphotericin B lozenges*. Br J Clin Pharmacol, 1983. **16(1)**: p. 106-8.
31. Halde, C., et al., *An evaluation of amphotericin B in vitro and in vivo in mice against Coccidioides immitis and Candida albicans, and preliminary observations concerning the administration of amphotericin B to man*. J Invest Dermatol, 1957. **28(3)**: p. 217-31; discussion, 231-2.
32. Santangelo, R., et al., *Efficacy of oral cochleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44(9)**: p. 2356-60.
33. Wasan, E.K., et al., *Development and characterization of oral lipid-based amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with Aspergillus fumigatus or Candida albicans*. Int J Pharm, 2009. **372(1-2)**: p. 76-84.
34. Wasan, K.M., et al., *Highly effective oral amphotericin B formulation against murine visceral leishmaniasis*. J Infect Dis, 2009. **200(3)**: p. 357-60.
35. Risovic, V., et al., *Assessing the antifungal activity of a new oral lipid-based amphotericin B formulation following administration to rats infected with Aspergillus fumigatus*. Drug Dev Ind Pharm, 2007. **33(7)**: p. 703-7.
36. Lalatsa, D.R.S.A., *Oral amphotericin B: The journey from bench to market*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2017. **42**: p. 75-86.
37. Italia, J.L., et al., *Biodegradable nanoparticles improve oral bioavailability of amphotericin B and show reduced nephrotoxicity compared to intravenous Fungizone*. Pharm Res, 2009. **26(6)**: p. 1324-31.
38. L. Zarif, T.J., I. Segarra, R. Mannino, *Novel hydrogel isolated cochleate formulations, process of preparation and their use for the delivery of biologically relevant molecules*. 2007: p. 27.
39. Sivak, O., et al., *Tropically stable novel oral lipid formulation of amphotericin B (iCo-010): biodistribution and toxicity in a mouse model*. Lipids Health Dis, 2011. **10**: p. 135.
40. Chaudhari, M.B., et al., *Solid lipid nanoparticles of amphotericin B (AmbiOnp): in vitro and in vivo assessment towards safe and effective oral treatment module*. Drug Deliv Transl Res, 2016. **6(4)**: p. 354-64.

41. Weis, G., [*Physiology of the respiratory tract and cough*]. Pharm Unserer Zeit, 2008. **37**(6): p. 458-61.
42. O'Malley, F.K. and H.W. Magoun, *The first American-based Handbook of Physiology*. Physiologist, 1985. **28**(1): p. 35-9.
43. Moore, M., et al., *Predictors of Adverse Outcomes in Uncomplicated Lower Respiratory Tract Infections*. Ann Fam Med, 2019. **17**(3): p. 231-238.
44. Wijnands, W.J., *The metabolic function of the lung*. Pharm Weekbl Sci, 1987. **9**(2): p. 61-4.
45. de Pablo, E., et al., *Nebulised antibiotherapy: conventional versus nanotechnology-based approaches, is targeting at a nano scale a difficult subject?* Ann Transl Med, 2017. **5**(22): p. 448.
46. Kuzmov, A. and T. Minko, *Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases*. J Control Release, 2015. **219**: p. 500-18.
47. Coates, M.S., et al., *Effect of design on the performance of a dry powder inhaler using computational fluid dynamics. Part 2: Air inlet size*. J Pharm Sci, 2006. **95**(6): p. 1382-92.
48. *Centro de información online de medicamentos de la AEMPS - CIMA*
<https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html>. fecha de acceso 03/JUL/2021.
49. Pilcer, G. and K. Amighi, *Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery*. Int J Pharm, 2010. **392**(1-2): p. 1-19.
50. Islam, N. and E. Gladki, *Dry powder inhalers (DPIs)--a review of device reliability and innovation*. Int J Pharm, 2008. **360**(1-2): p. 1-11.
51. Telko, M.J. and A.J. Hickey, *Dry powder inhaler formulation*. Respir Care, 2005. **50**(9): p. 1209-27.
52. Begat, P., et al., *The cohesive-adhesive balances in dry powder inhaler formulations II: influence on fine particle delivery characteristics*. Pharm Res, 2004. **21**(10): p. 1826-33.
53. Price, R., et al., *The influence of relative humidity on particulate interactions in carrier-based dry powder inhaler formulations*. Int J Pharm, 2002. **246**(1-2): p. 47-59.
54. Young, P.M., et al., *Characterization of a surface modified dry powder inhalation carrier prepared by "particle smoothing"*. J Pharm Pharmacol, 2002. **54**(10): p. 1339-44.
55. Nuchuchua, O., et al., *Scalable organic solvent free supercritical fluid spray drying process for producing dry protein formulations*. Eur J Pharm Biopharm, 2014. **88**(3): p. 919-30.
56. Johnson, K.A., *Preparation of peptide and protein powders for inhalation*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. **26**(1): p. 3-15.
57. Steckel, H. and H.G. Brandes, *A novel spray-drying technique to produce low density particles for pulmonary delivery*. Int J Pharm, 2004. **278**(1): p. 187-95.
58. Pilcer, G., F. Vanderbist, and K. Amighi, *Preparation and characterization of spray-dried tobramycin powders containing nanoparticles for pulmonary delivery*. Int J Pharm, 2009. **365**(1-2): p. 162-9.
59. Healy, A.M., et al., *Dry powders for oral inhalation free of lactose carrier particles*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **75**: p. 32-52.
60. Ogain, O.N., et al., *Particle engineering of materials for oral inhalation by dry powder inhalers. I-Particles of sugar excipients (trehalose and raffinose) for protein delivery*. Int J Pharm, 2011. **405**(1-2): p. 23-35.
61. Scalia, S., et al., *Quercetin solid lipid microparticles: a flavonoid for inhalation lung delivery*. Eur J Pharm Sci, 2013. **49**(2): p. 278-85.
62. Chono, S., K. Togami, and S. Itagaki, *Aerosolized liposomes with dipalmitoyl phosphatidylcholine enhance pulmonary absorption of encapsulated insulin compared with co-administered insulin*. Drug Dev Ind Pharm, 2017. **43**(11): p. 1892-1898.

63. Seville, P.C., H.Y. Li, and T.P. Learoyd, Spray-dried powders for pulmonary drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2007. 24(4): p. 307-60.
64. Chew, N.Y., et al., Effect of amino acids on the dispersion of disodium cromoglycate powders. *J Pharm Sci*, 2005. 94(10): p. 2289-300.
65. Lechuga-Ballesteros, D., et al., Trileucine improves aerosol performance and stability of spray-dried powders for inhalation. *J Pharm Sci*, 2008. 97(1): p. 287-302.
66. Vaughn, J.M., et al., Murine airway histology and intracellular uptake of inhaled amorphous itraconazole. *Int J Pharm*, 2007. 338(1-2): p. 219-24.
67. Hussain, A., et al., Absorption enhancers in pulmonary protein delivery. *J Control Release*, 2004. 94(1): p. 15-24.
68. Ungaro, F., et al., Cyclodextrins in the production of large porous particles: development of dry powders for the sustained release of insulin to the lungs. *Eur J Pharm Sci*, 2006. 28(5): p. 423-32.
69. Matilainen, L., et al., In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. *J Control Release*, 2008. 126(1): p. 10-6.
70. Huang, Y.C., et al., Pulmonary inflammation caused by chitosan microparticles. *J Biomed Mater Res A*, 2005. 75(2): p. 283-7.
71. Suzuki, Y., et al., Macrophage mannose receptor, CD206, predict prognosis in patients with pulmonary tuberculosis. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 13129.
72. Zhao, Z., et al., Low density, good flowability cyclodextrin-raffinose binary carrier for dry powder inhaler: anti-hygroscopicity and aerosolization performance enhancement. *Expert Opin Drug Deliv*, 2018. 15(5): p. 443-457.
73. Focaroli, S., et al., A Design of Experiment (DoE) approach to optimise spray drying process conditions for the production of trehalose/leucine formulations with application in pulmonary delivery. *Int J Pharm*, 2019. 562: p. 228-240.
74. Yamamoto, A., et al., Improvement of the pulmonary absorption of (Asu1,7)-eel calcitonin by various absorption enhancers and their pulmonary toxicity in rats. *J Pharm Sci*, 1997. 86(10): p. 1144-7.
75. Devrim, B., A. Bozkir, and K. Canefe, Preparation and evaluation of PLGA microparticles as carrier for the pulmonary delivery of rhIL-2 : I. Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics. *J Microencapsul*, 2011. 28(6): p. 582-94.
76. Venanzi, E., et al., Aerosolized Lipid Amphotericin B for Complementary Therapy and/or Secondary Prophylaxis in Patients with Invasive Pulmonary Aspergillosis: A Single-Center Experience. *Mycopathologia*, 2019. 184(2): p. 239-250.
77. Courtwright, A.M., et al., Treatment of a Pulmonary Aspergilloma in a Lung Transplant Recipient Using Catheter-directed Intracavitary Instillation of Liposomal Amphotericin B. *Transplant Direct*, 2022. 8(1): p. e1270.
78. Van Ackerbroeck, S., et al., Inhaled liposomal amphotericin-B as a prophylactic treatment for COVID-19-associated pulmonary aspergillosis/aspergillus tracheobronchitis. *Crit Care*, 2021. 25(1): p. 298.
79. Zarb, P., et al., Antifungal therapy in European hospitals: data from the ESAC point-prevalence surveys 2008 and 2009. *Clin Microbiol Infect*, 2012. 18(10): p. E389-95.
80. Orphan designation: Amphotericin B (for inhalation use) for: Prevention of pulmonary fungal infection in patients deemed at risk. EMA 28/08/2006 updated [cited <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu306391>].
81. Alsaadi, M., et al., The efficacy of aerosol treatment with non-ionic surfactant vesicles containing amphotericin B in rodent models of leishmaniasis and pulmonary aspergillosis infection. *J Control Release*, 2012. 160(3): p. 685-91.
82. Xia, D., et al., Aerosolized amphotericin B as prophylaxis for invasive pulmonary aspergillosis: a meta-analysis. *Int J Infect Dis*, 2015. 30: p. 78-84.
83. Zhou, Q.Y., W.J. Yang, and X.Q. Zhao, Pulmonary aspergillosis treated with inhaled amphotericin B. *Int J Infect Dis*, 2017. 54: p. 92-94.

84. Ruijgrok, E.J., et al., Nebulization of four commercially available amphotericin B formulations in persistently granulocytopenic rats with invasive pulmonary aspergillosis: evidence for long-term biological activity. *J Pharm Pharmacol*, 2005. 57(10): p. 1289-95.
85. Leenders, A.C., et al., Liposomal amphotericin B (AmBisome) reduces dissemination of infection as compared with amphotericin B deoxycholate (Fungizone) in a rat model of pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*, 1996. 38(2): p. 215-25.
86. Furco, A., et al., [Pulmonary mucormycosis: benefit of aerosol amphotericin B?]. *Rev Mal Respir*, 2001. 18(3): p. 309-13.
87. Kamalapor, H., et al., Aerosolized liposomal Amphotericin B: a potential prophylaxis of invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients. *Pediatr Pulmonol*, 2014. 49(6): p. 574-80.
88. Gilbert, B.E., P.R. Wyde, and S.Z. Wilson, Aerosolized liposomal amphotericin B for treatment of pulmonary and systemic *Cryptococcus neoformans* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992. 36(7): p. 1466-71.
89. Safdar, A., S. O'Brien, and I.F. Kouri, Efficacy and feasibility of aerosolized amphotericin B lipid complex therapy in caspofungin breakthrough pulmonary zygomycosis. *Bone Marrow Transplant*, 2004. 34(5): p. 467-8.
90. Gavalda, J., et al., Efficacy of nebulized liposomal amphotericin B in treatment of experimental pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. 49(7): p. 3028-30.
91. Ruijgrok, E.J., et al., Nebulized amphotericin B combined with intravenous amphotericin B in rats with severe invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. 50(5): p. 1852-4.
92. Castagnola, E., et al., Nebulized liposomal amphotericin B and combined systemic antifungal therapy for the treatment of severe pulmonary aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplant for a fatal mitochondrial disorder. *J Chemother*, 2007. 19(3): p. 339-42.
93. Rijnders, B.J., et al., Aerosolized liposomal amphotericin B for the prevention of invasive pulmonary aspergillosis during prolonged neutropenia: a randomized, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis*, 2008. 46(9): p. 1401-8.
94. Slobbe, L., E. Boersma, and B.J. Rijnders, Tolerability of prophylactic aerosolized liposomal amphotericin-B and impact on pulmonary function: data from a randomized placebo-controlled trial. *Pulm Pharmacol Ther*, 2008. 21(6): p. 855-9.
95. Takazono, T., et al., Efficacy of combination antifungal therapy with intraperitoneally administered micafungin and aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. 53(8): p. 3508-10.
96. Fujita, M., et al., [A case report of pulmonary aspergillosis in lung transplant recipient successfully treated with inhalation administration of liposomal amphotericin B]. *Jpn J Antibiot*, 2013. 66(1): p. 37-43.
97. Monforte, V., et al., Prophylaxis with nebulized liposomal amphotericin B for *Aspergillus* infection in lung transplant patients does not cause changes in the lipid content of pulmonary surfactant. *J Heart Lung Transplant*, 2013. 32(3): p. 313-9.
98. Mihara, T., et al., Efficacy of aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary mucormycosis. *J Infect Chemother*, 2014. 20(2): p. 104-8.
99. Godet, C., et al., Nebulized Liposomal Amphotericin B for Treatment of Pulmonary Infection Caused by *Hormoglyphiella aspergillata*: Case Report and Literature Review. *Mycopathologia*, 2017. 182(7-8): p. 709-713.

100. Canetti, D., et al., Aerosolized amphotericin B lipid complex and invasive pulmonary aspergillosis: a case report. *Infez Med*, 2015. 23(1): p. 44-7.
101. Shah, S.P. and A. Misra, Liposomal amphotericin B dry powder inhaler: effect of fines on in vitro performance. *Pharmazie*, 2004. 59(10): p. 812-3.
102. Kirkpatrick, W.R., et al., Prophylactic efficacy of single dose pulmonary administration of amphotericin B inhalation powder in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*, 2012. 67(4): p. 970-6.
103. ClinicalTrials.gov
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Amphotericin+B+inhalation+&cntry=&state=&city=&dist=>. Accessed Date: 03/06/2019.

4. Review Article Nebulised Antibiotherapy: conventional vs nanotechnology-based approaches.

Review Article

Page 1 of 16

Nebulised antibiotherapy: conventional versus nanotechnology-based approaches, is targeting at a nano scale a difficult subject?

Esther de Pablo¹, Raquel Fernández-García¹, María Paloma Ballesteros^{1,2}, Juan José Torrado^{1,2}, Dolores R. Serrano^{1,2}

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain; ²Instituto Universitario de Farmacia Industrial (IUPI), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Complutense, Madrid 28040, Spain

Contributions: (I) Conception and design: E de Pablo; (II) Administrative support: None; (III) Provision of study materials or patients: None; (IV) Collection and assembly of data: None; (V) Data analysis and interpretation: None; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

Correspondence to: Dolores R. Serrano. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain. Email: drserran@ucm.es.

Abstract: Nebulised antibiotics offer great advantages over intravenously administered antibiotics and other conventional antibiotic formulations. However, their use is not widely standardized in the current clinical practice. This is the consequence of large variability in the performance of nebulisers, patient compliance and a deficiency of robust preclinical and clinical data. Nebulised antibiotherapy may play a significant role in future pulmonary drug delivery treatments as it offers the potential to achieve both a high local drug concentration and a lower systemic toxicity. In this review, the physicochemical parameters required for optimal deposition to the lung in addition to the main characteristics of currently available formulations and nebuliser types are discussed. Particular attention will be focused on emerging nanotechnology based approaches which are revolutionizing inhaled therapies used to treat both infections and lung cancer. Promising carriers such as Trojan-Horse microparticles, liposomes, polymeric and lipid nanoparticulate systems have been investigated and proposed as viable options. In order to achieve site-specific targeting and to optimize the PK/PD balance critical nanoscale design parameters such as particle size, morphology, composition, rigidity and surface chemistry architecture must be controlled. Development of novel excipients to manufacture these nanomedicines and assessment of their toxicity is also a keystone and will be discussed in this review.

Keywords: Pulmonary infections; particle size; pulmonary deposition; nebulisers; Trojan Horse microparticles; nanoparticles; antibiotherapy

Submitted Aug 10, 2017. Accepted for publication Sep 08, 2017.

doi: 10.21037/atm.2017.09.17

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2017.09.17>

History of nebulised drugs

One of the first described inhalation therapies, was the use of atropine cigarettes obtained from the leaves of the *atropa belladonna* plant, for treating respiratory ailments occurring in the chest and throat. Limited reports of cigarettes and inhalation vapors appeared in medical literature during the following centuries. One of the most remarkable

publications was the use of “Potters Asthma Cigarettes” (with *datura stramonium* leaves) and its bronchodilator action similar to that of ipratropium aerosol. In the early nineteenth century, the steam driven device appeared as the first inhalation therapy. Even though, several nebulizing devices were developed for therapeutic and diagnostic purposes, the current use of nebulised drugs remains in third position behind metered dose inhalers (MDIs) and dry

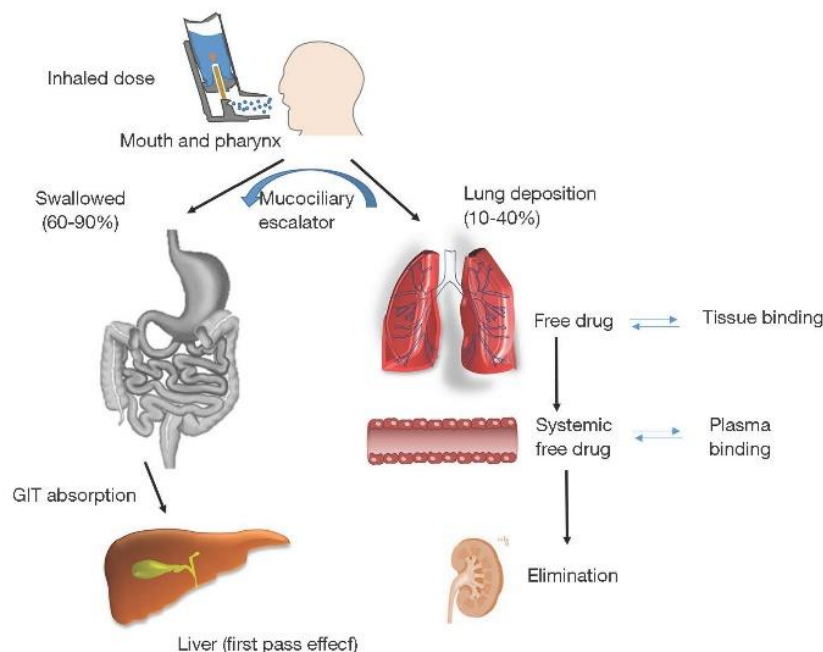


Figure 1 Fate of an inhaled active pharmaceutical ingredient (API): pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) profile. Modified from: (3,4).

powdered inhalers (DPIs). However, nebulisers can offer advantages over both MDIs and DPIs, for example through the ability to use existing intravenous drug solutions off license. Other notable advantages of aerosols or nebulised products are their ease of use, particularly amongst geriatric and paediatric populations as well as their suitability for emergency treatments and the capability to deliver higher drug amounts when compared with either DPIs or MDIs (1-3).

Pulmonary drug delivery

Aerosol deposition and airway physiology

Developing an efficient nebulised therapy requires a deeper understanding of the airway physiological pathway, aerosol deposition and physico-chemical properties of the drug product (Figure 1). The first question to be addressed is how much and where the aerosol particles are deposited within the lung cavity. Another key point is to know how long the drug will remain in the lung as this will dictate the posology and dose to be administered which will depend on (I) physicochemical properties of the active ingredient (e.g., dissolution rate, mucociliary transport and tissue binding); and (II) free drug concentration present in the lung which correlates with the pulmonary effect. It is also important

to note that on average 60–90% of all aerosol particles will be swallowed and thus, it is critical to know the oral drug bioavailability, plasma protein binding levels, elimination rates as well as the systemic correlation between the free drug concentration and adverse effects. In those cases where the drug administered is a prodrug, it is necessary to know how efficient is the activation process within the lung and also, the activation in the bloodstream for those swallowed particles (5,6).

It is possible to predict how the formulation will behave after pulmonary administration by accounting for mechanisms of aerosol deposition in the lung tissue and the factors that may affect the aforementioned deposition. Among these factors, the air velocities within the respiratory tract is of vital importance as well as the different diameters and angles of branching of the anatomic regions and the breathing cycle.

After nebulization, the drug passes through many physical and physiological barriers consisting of multiple bifurcations and the immune system (1). A thick surfactant layer is secreted by ciliated columnar epithelium cells located in the upper airway with the aim of protecting the lungs by removing foreign particles through the mucociliary escalator system (5).

Particles deposit in the respiratory track depending on their size, morphology and surface chemistry. The

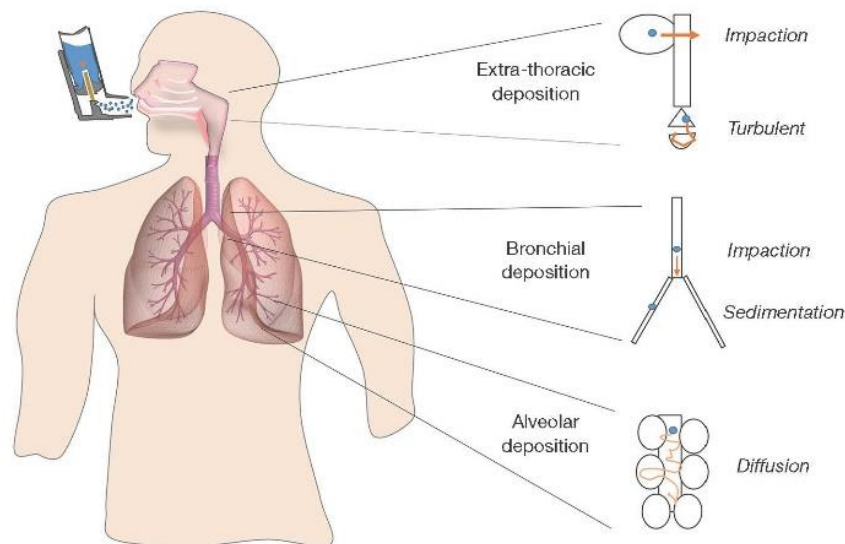


Figure 2 Deposition pattern of inhaled particles within the upper, mid and lower respiratory tract. Modified from: (3,7).

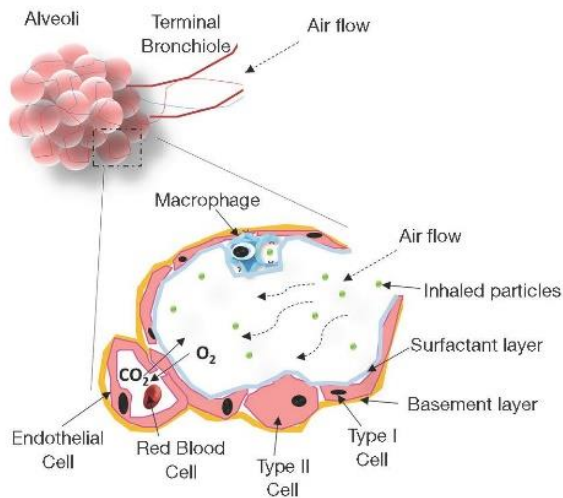


Figure 3 Diagram of the alveoli and inhaled particle deposition in the respiratory tract. Modified from: (8,9).

three main mechanisms of particle deposition are: (I) impaction; (II) sedimentation; and (III) diffusion (Figure 2). As inhaled particles travel down the respiratory tract, the airways become narrower, but at the same time more numerous increasing the cross-sectional area of the airways and reducing the air flow velocity. In the upper part of the respiratory tract, the speed of inhaled air is largest in the central airways and those particles larger than 5 μm (Mass Median Aerodynamic Diameter, MMAD) will be removed mainly by impaction. In the mid and lower tract

(smaller bronchi, bronchioles and alveoli), particles will be removed by a combination of impaction, sedimentation and diffusion mechanisms. When the particles possess a smaller size than 5 μm , the chance of peripheral penetration and retention increases. The optimal MMAD for lung deposition is considered to be between 1 to 5 μm . However, for very fine particles (<0.5 μm MMAD), there is increasing probability of not being deposited in the lung parenchyma and be subsequently exhaled (1,4).

A final line of protection within the lung tissue is provided by alveolar macrophages which can phagocytose particles reaching the deep alveolar region specially those between 1 and 2 μm (Figure 3) (8). To evade both the clearance by macrophages and the mucociliary trapping and clearance, the inhaled particle should be small enough to pass across the upper part and possess a suitable surface chemistry to avoid adhesion to the mucosal layer. The main advantage when treating lung infections is that mucociliary escalator system is compromised facilitating the penetration through the mucus and hence the drug efficacy (10). For example, certain pharmaceutical technological approaches such as PEGylation facilitate the penetration across the mucus layer (5). The entrapment and removal of particles from the mucus layer usually occurs through hydrophobic interactions and formation of polyvalent adhesive interactions due to the negative charges of the mucin proteoglycans (11). Polyethylene glycol (PEG) possesses a near-neutral surface charge with negligible protein

adsorption and hence, PEG coated particles have shown an enhanced transport across mucus layers (11,12).

Formulation and nebuliser performance

In nebulisers, the drug is commonly formulated as either a suspension or an aqueous solution, which is atomized into fine droplets via an external nebulization source during the inhalation process (1). Sterility of these aqueous-based inhalation solutions and suspensions must be ensured and to achieve this, formulations are usually packaged in single-use containers (1–3 mL). Sterile water for injection is normally used as solvent, and in some cases, ethanol or propylen glycol can be employed as co-solvents.

Historically, the off license use of intravenous drug solutions as aerosols was common, however, it had many drawbacks as the formulations were not originally intended for lung delivery such as unpleasant taste, irritation or bronchoconstriction (9). Nowadays, although the development of inhaled formulations has reduced the risk of adverse effects, formulation scientists have to carefully consider the necessity of including certain excipients in the formulation in order to improve the physicochemical properties of drugs as the potential for adverse effects always exists. For example, antimicrobial preservatives such as benzalkonium chloride or parabens are usually needed but they can cause allergic reactions (13).

Physical stability of suspensions is vital to avoid aggregation of particles. Surfactants such as polysorbates and sorbitans are commonly added to facilitate the dispersion or dissolution of drugs. Interaction with packing components can occur and hence compatibility assays should be performed in particular with proteins and peptides that have high tendency to adsorb onto plastic materials. The addition of antioxidants like ascorbic acid or metabisulphites and chelating agents like EDTA may be required when the influence of oxygen, light and trace metals lead to drug degradation (1,14).

Other critical factors to note when developing inhaled formulations are: log P, pKa, isoelectric point and solubility. Tonicity and solution pH tend to be a problem during preformulation as acidic pH and non-isotonic aerosols can provoke bronchoconstriction which is of major importance in patients with asthma (4). The lungs have limited buffering capacity unlike the blood and thus, isotonicity and pH must be adjusted (targeting neutral solutions of 300 mOsm/L) in order to avoid bronchoconstriction by the addition of pH and osmolarity regulators such as HCl,

NaOH, citric acid, phosphates, trometamol and/or NaCl and other salts (15).

Regarding nebuliser performance, the critical quality attributes (also denominated as CQAs) of the product need to be assessed and maintained across of all supported devices. Amongst them, drug delivery rate (output) and aerodynamic droplet size distribution are usually the most relevant factors. It is important to study in depth and understand how the key formulation parameters, such as viscosity, surface tension and drug concentration, influence these CQAs. An increase in solution viscosity could slow down the nebulization and reduce the drug output for jet nebulisers but also lead to decreased particle size, and modification of the drug deposition pattern (6,18). The electrostatic charge in the aqueous solutions can inhibit the flow and detachment of fluid through the mesh, and the introduction of electrolytes can suppress the charges improving particle size, drug output and nebulization time. Drug concentration levels have been known to have a negative effect on nebuliser output but this has been demonstrated to be specific to certain nebuliser types (6,18).

Types of nebulisers and methods of nebulisation

The main principle of all drug nebulisers is based on the fact that an aqueous drug solution or suspension is transformed into an aerosol containing the drug dispersed in fine droplets which will be consequently inhaled and deposited in the lung parenchyma. By controlling the rate (or amount) of drug aerosol and its particle size, a desired dose of drug can be delivered and site-specific targeted within the lung cavity, thereby minimising dosage and systemic distribution as well as side effects.

However, significant differences in aerosol output and particle size exist among the different nebuliser devices. Even with the same nebuliser, different droplet size distribution can take place when using different compressors or pressures. It is important to note that one cannot select a theoretical nebuliser design suitable for all applications. It is not possible for a single device to be employed where individual patient needs, target areas and desired doses must be accommodated. For example, inspiratory flow rate and lung volume capacity are significantly altered in patients with pulmonary infections or chronic diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) affecting drug output and deposition (19). In order to improve delivery efficiency, some breath devices such Pari LC Star or AeroEclipse II have been created in such a way

that aerosols are generated only during inspiration (20).

Regarding the method for aerosol generation, it is key to use systems that keep constant the particle size distribution and the drug concentration in the solution or suspension. These parameters are highly affected for the method of aerosolisation and the duration of the process and will significantly affect the characteristics of the resulting aerosol. Particles between 0.5 to 5 μm are the ones that can reach the lung and the pulmonary alveoli giving a local effect during the administration of the drug.

Larger particles will be eliminated by impaction not reaching the mid and deeper lung parenchyma and smaller particles will be exhaled, without achieving efficacy in any of the cases. The generation of the highest amount of particles or droplets within this range is necessary for the successful delivery of the drug.

The most commonly utilized systems for pulmonary delivery are the following: (I) the evaporation-condensation method which is not very stable and reproducible and generates a result with particle sizes from 0.1 to several microns; (II) electrospray which is based on electrostatic charges that decreases the surface tension and cause breakup of the surface of the liquid; (III) nebulisers that employ either compressed air or ultrasounds for air blast atomization of liquids; and (IV) spinning-disk based on the breakup into larger and smaller droplets created at the edges of the rotating disk (5). One of the major drawbacks associated with the electrospray method is the generation of small particles between 0.002 and 0.3 μm , which are easily exhaled resulting in less efficacy. On the contrary, the spinning disk system leads to the formation of larger particles (up to 100 μm) compared to other techniques that will not reach the lung. Overall, nebulisers generate aerosols with the best particle size characteristics between 0.01–5 μm (3).

The two classical devices for nebulization are: jet and ultrasonic nebulisers which operate using compressed air and vibrating piezo-electric crystals respectively (18,21). Jet nebulisers are still the most utilised device for inhalation of solutions and suspensions. However, these systems have some disadvantages such as noise, less comfortable to carry and long dosing duration (10–15 min). The cooling effect of jet nebulisers due to the expansion of atomising gas and evaporation of solvent also influences patient's use. In contrary, ultrasonic nebulisers are compact and silent, and the dosing time is shorter. Nevertheless, heat may often be generated during ultrasonic nebulization, making then unsuitable for heat sensitive drugs.

Vibrating mesh nebulisers, a new generation of nebulisers, are a recent technology that uses vibrating perforated mesh to generate respirable sized droplets. The main advantages of these nebulisers are: (I) fast treatment time; (II) minimal residual dose; and (III) reduced drug waste. Spiriva Respimat[®], commercialised by Boehringer Ingelheim, works by creating a slow-moving aerosol cloud within a pocket size form factor. Due to the inherent differences in terms of atomisation mechanisms and device designs, even though the device is still classified as nebuliser, many clinicians prefer to consider it as a propellant free MDI or classified it as a metered dose liquid inhaler (MDLI). This portable device format allows for multiple doses and enables drug delivery in a single breath of moistened vapour without the need for continuous inhalations and is seen as the future direction of new nebulisers (22).

Another marketed nebuliser with enhanced performance characteristics is the AERx[®] Pulmonary Drug Delivery System. In this system, a bolus of aerosol particles is generated at the same time that the inspiration process takes place (23). The AKITA[®] Inhalation System (Activaero) is another advanced aerosol technology where the nebulisation is controlled by a computer programmed to mimic the lung function characteristics and the inhalation pattern of the patient (24).

Nebulised therapies in clinical practice

Currently nebulisers remain widely utilised in hospitals and home settings. The major advantage of the nebulisers is that allow patients to inhale drug aerosols with tidal breathing movements and little training required. Nebulisers are especially suitable for patients unable to coordinate their breathing or activate MDIs or DPIs, such as the geriatric and paediatric population. Nebulised therapy is primarily intended as a treatment for pulmonary infections or chronic diseases such as asthma and COPD (Tables 1,2) (3).

Asthma and COPD

Most currently marketed inhalation solutions and suspensions used to treat bronchospasm during asthma and COPD consist of one or two combined drugs which can behave as: (I) short acting β_2 -agonist (SABA) like salbutamol; (II) long acting β_2 -agonist (LABA), such as formoterol; (III) short-acting muscarinic antagonist (SAMA), such as ipratropium; and (IV) long-acting muscarinic antagonist (LAMA), like tiotropium. Several

Table 1 Different characteristics of marketed nebulised drugs to treat prevalent pulmonary diseases such as asthma and COPD (16,20). All formulations are solutions except from Pulmicort respules that is a suspension

Drug	Product (pharma company)	Excipients							Nebuliser	Administration
		pH regulators	Osmolarity regulators	Preservatives	Stability enhancers	Surfactants				
Albuterol sulfate	AccuNeb (Mylan)	H ₂ SO ₄	NaCl	-	-	-	-	Pari LC Plus nebuliser (with a facemask or mouthpiece) and Proneb Ultra compressor	2 inhalations every 2 or 4 hours. For bronchospasm 15 min before sport	
Salbutamol	Salbutamol Inhalation (Focus)	H ₂ SO ₄ , NaOH	NaCl	-	-	-	-	Pari LC Plus nebuliser (with mouthpiece) and Pari Dura Neb™3000 compressor	2.5/5 mg four times a day as a starting dose Twice inhalation daily	
Formoterol fumarate	Perforomist (Mylan)	Citric acid	NaCl, sodium citrate	-	-	-	-	-	Twice a day	
Arformoterol tartrate	Brovana (Sunovion)	Citric acid	Sodium citrate	-	-	-	-	-	Twice a day	
Olodaterol	Striverdi Respimat (Boehringer Ingelheim)	Citric acid	-	Benzalkonium chloride	Edetate disodium	-	-	Spiriva Respimat inhaler	Two inhalations, once a day	
Tiotropium	Spiriva Respimat (Boehringer Ingelheim)	HCl	-	Benzalkonium chloride	Edetate disodium	-	-	Spiriva Respimat inhaler	Two inhalations, once a day	
Budesonide	Pulmicort Respules (AstraZeneca)	Citric acid	NaCl, sodium citrate	-	Edetate disodium	-	Polysorbate 80	Pari-LC-Jet Plus Nebuliser/Pari Master compressor system	1-2 mg/twice a day	
Cromolyn sodium	Intal Nebuliser (Sanofi Aventis)	HCl	-	Benzalkonium chloride	Edetate disodium	-	-	Pari-LC-Jet Plus Nebuliser/Pari Master compressor system	20 mg 3/4 times a day	
Tiotropium + olodaterol	Stiolto Respimat (Boehringer Ingelheim)	HCl	-	Benzalkonium chloride	Edetate disodium	-	-	Pari-LC-Jet Plus Nebuliser/Pari Master compressor system	0.5/1 mg a day, 3/4 times a day or 15 min before sport	
Ipratropium bromide + albuterol	Combivent Respimat (Boehringer Ingelheim)	HCl	-	Benzalkonium chloride	Edetate disodium	-	-	Combivent Respimat inhaler	Two inhalations, once a day	
Ipratropium bromide + albuterol sulfate	Duoneb (Mylan)	HCl	-	Benzalkonium chloride	Edetate disodium	-	-	Pari LC Plus nebuliser (with face mask or mouthpiece) and Proneb compressor	3/4 times a day or more in severe cases. At least 4 times a day	
Albuterol sulfate	Ventolin Solution (Glaxo Smith Kline)	H ₂ SO ₄	-	Benzalkonium chloride	-	-	-	Pari LC Jet and Pari LC Plus nebulisers and PARI Master Dura-Neb 2000 and Dura-Neb 3000 compressors	1.25 to 2.5 mg, 3 or 4 times a day 0.31 to 0.63 mg, 3 or 4 times a day	
Levalbuterol hydrochloride	Xopenex (Sunovion)	H2SO4	NaCl	-	-	-	-	-	-	

Table 2 Different characteristics of several marketed nebulised antimicrobial formulations (20)

Indications	Drugs	Products	Excipients					Nebuliser	Administration
			pH regulators	Osmolarity regulators	Preservatives	Stability enhancers	Co-solvents		
Cystic fibrosis infection	Tobramycin	Bethkis	H ₂ SO ₄	NaCl	-	-	-	Pari LC Plus Reusable Nebuliser and Pari Vios Air compressor	300 mg/5 mL, twice a day
		Tobi	H ₂ SO ₄ , NaOH	NaCl	-	-	-	Pari LC Plus Reusable Nebuliser and DeVilbiss Pulmo-Aide compressor	
		Kitabis Pak	H ₂ SO ₄ , NaOH	NaCl	-	-	-	Pari LC Plus Reusable Nebuliser and DeVilbiss Pulmo-Aide air compressor	
	Aztreonam	Actitob	-	NaCl, lysine	-	-	-	Altera Nebuliser System	300 mg/4 mL, twice a day
	Dornase alfa	Pulmozyme	-	NaCl, CaCl ₂ 2H ₂ O	-	-	-	eRapid Nebuliser System (eRapid)	75 mg, three times a day
Infection pulmonary arterial hypertension (PAH)	Ribavirin	Virazole	-	-	-	-	-	I-neb AAD System	15/20 mg/kg a day
	Iloprost	Ventavis	Tromethamine, HCl	NaCl	-	-	Ethanol	I-neb AAD (Adaptive Aerosol Delivery) System	2.5 µg/6 or 9 times a day
	Treprostnilil	Tyvaso	H ₂ SO ₄ , NaOH, HCl	NaCl, sodium citrate	-	-	-	Tyvaso Inhalation System	18 µg/4 times a day
	Colistimethate sodium	Colistina GES/ colomycin/colfinair	-	-	-	-	-	Variable/variable/I-neb AAD®	0.5–2 million UI (1 million), 2 or 3 times a day, 0.5–1 million UI, 2 or 3 times a day during 4 to 6 min

administrations per day are usually required to obtain the desired effect. However, the FDA has recently approved the inhalation spray of a LAMA/LABA combination (tiotropium/olodaterol), which can be delivered to patients as a single daily dose (16,25). Inhaled corticosteroids such as budesonide are also common (Table 2). Most of the excipients employed are those described in section "Formulation and nebuliser performance" (Table 1).

Pulmonary infections

Nebulisers have the advantage that can continuously deliver drugs for a long dosing duration, being suitable for the administration of large doses, generally required to treat infections. Also, the administration of aerosol antibiotics through the pulmonary route allows high drug concentrations at the infection site (26). This may decrease intravenous toxicity, particularly the renal adverse effects, commonly caused by intravenous administration of aminoglycosides, colistin and amphotericin B (27).

Tobramycin was the first antibiotic solution approved for inhalation for the treatment and also the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients suffering from cystic fibrosis (CF). A long-term therapy study indicated that inhaled tobramycin improved lung function and reduced exacerbation rate for patients with CF (28). Multiple nebulised formulations are currently in the market to treat this disease (Table 2).

Inhalation antibiotic therapy has been also investigated for both prophylactic and acute treatment of Gram-negative and, fungal pneumonia. It has previously been shown that intermittent or short-term use of prophylactic inhaled antibiotics can be effective in decreasing colonisation of the airways by Gram-negative bacteria and reducing the incidences of pneumonia. However, increased bacterial resistance is a global health problem, and prolonged use of antimicrobials is associated with an unacceptably high prevalence of pneumonias caused by multi-drug resistant (MDR) bacteria. The use of aerosolised antibiotics should therefore be limited to well established bacterial pulmonary infections (29,30).

The safety of nebulised antibiotherapy has been proven in numerous studies. Its efficacy as concomitant treatment along with parenteral drug administration or in monotherapy has been also demonstrated when treating respiratory infections in mechanically ventilated (MV) patients. Nebulised antibiotherapy has several advantages in this patient group such as: (I) improvement

of pharmacokinetic profile compared to traditional systemic administration of antibiotics; (II) prevention of MDR bacteria; and (III) minimization of side effects and drug interactions. Until recently, development of this technique was slow, partly due to the limited knowledge of the determinants of aerosolisation during mechanical ventilation and poor technique implementation. The major disadvantage of conventional nebulisers was that lower amounts of drug reached the alveolar region due to great amounts of particles remained trapped either in the tracheobronchial tree or ventilator circuits. On the contrary, the latest generation of nebulisers has improved considerably the inhaled particle deposition and antibiotic aerosolisation in MV patients has received renewed interest (1).

However, multiple meta-analyses have failed to show a clear effect due to the heterogeneity of the studies. The optimal use of nebulised antibiotherapy can be achieved if techniques are standardised, indications are clarified and clinical guidelines are implemented. An important limitation in many studies has been the inadequate characterisation and control of variables affecting the efficiency of drug deposition, such as nebuliser design, operating conditions, particle size and patient's breathing pattern.

Clinical trials on nebulised antibiotherapy

Clinical trials on nebulised antibiotherapy have increased in recent years especially in the treatment of local diseases (Table 3). One such drug that has awoken interest is amphotericin B probably because it is an antifungal drug with a broad spectrum of action and limited resistance but its adoption is limited in clinical practice due to its severe nephrotoxicity after intravenous administration (31,32). The efficacy and safety of nebulised amphotericin B lipid complex (ABLC) and liposomal formulation (AmBiosme®) are being evaluated in clinical trials in neutropenic haematological patients for prophylactic use against invasive pulmonary aspergillosis. Preliminary data has shown promising results in reducing the incidence of pulmonary aspergillosis in this patient group (31). The use of other antibiotics such as tobramycin and gentamicin are also being investigated in clinical trials for pulmonary administration. All the formulations undergoing clinical trials are of extreme importance for clinicians as a guide about the use of new inhalable therapies as well as the prevalence of microbial contamination that may be associated with the use of inhalation devices.

Table 3 Clinical trials on nebulised antibiotics that are currently in progress or recently complete (3/1)

Study	Drug	Dose	Description/type of study	Organization/year
Long term nebulised gentamicin in patients with bronchiectasis	Gentamicin	80 mg	Phase IV randomized placebo controlled study based on targeted nebulised gentamicin to the airways with the aim of reducing bacterial burden and limiting neutrophil airways inflammation	University of Edinburgh/2008
Inhalation of liposomal amphotericin B to prevent invasive aspergillosis	Amphotericin B	25 mg	Phase II/III randomized double-blind study focused on the comparison of the safety and the efficacy of a weekly administration of 25 mg nebulised AmBisome® with nebulised placebo solution to prevent invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic hematologic patients	Erasmus Medical Center/2005–2006
A study to access safety and efficacy of nebulised tobramycin in patients with bronchiectasis	Tobramycin	80 mg	Randomized phase IV study based on the evaluation of the efficacy, indications, adverse reactions and resistance of combined administration of nebulised tobramycin compared with systemic administration alone in patients with bronchiectasis in acute exacerbation of bronchiectasis	Shandong University/2012
The effects of long term inhalation of hypertonic saline in subjects with cystic fibrosis	Hypertonic Saline		Randomized phase III study focused on the evaluation of the efficacy of inhalation of nebulised hypertonic saline on lung function with no adverse effects on infection and inflammation in adults and children with cystic fibrosis	Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, Australia/2005–2006
Evaluation of a therapeutic strategy including nebulised liposomal amphotericin B (AmBisome®) in maintenance treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA)	Amphotericin B		Phase II study based on the comparison of the incidence of severe clinical exacerbations in the treatment of ABPA, between a strategy with a maintenance treatment and a conventional strategy without antifungal maintenance therapy	Poitiers University Hospital/2014–2017
Nebulised amphotericin B lipid complex in invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in paediatric patients with acute leukaemia	Amphotericin B	0.5 mg/kg three times weekly	Phase II interventional study focused on the evaluation of the overall tolerability of the amphotericin B and the efficacy of aerosolised amphotericin B as a lipid complex (ABL-C) for primary prophylaxis of IPA in pediatric patients with acute leukemia undergoing intensive chemotherapy	Fundació Sant Joan de Déu/2012–2015
Ease of use and microbial contamination of tobramycin inhalation powder (TIP) versus nebulised tobramycin inhalation solution (TIS) and nebulised colistimethate (COL)	Tobramycin		Phase IV interventional study focused on the evaluation of the ease of use of TIP and prevalence of microbial contamination of the T-326 Inhaler compared with TIS and colistimethate administered via nebuliser for the treatment of cystic fibrosis patients chronically infected with <i>P. aeruginosa</i>	Novartis Pharmaceuticals/2013–2016

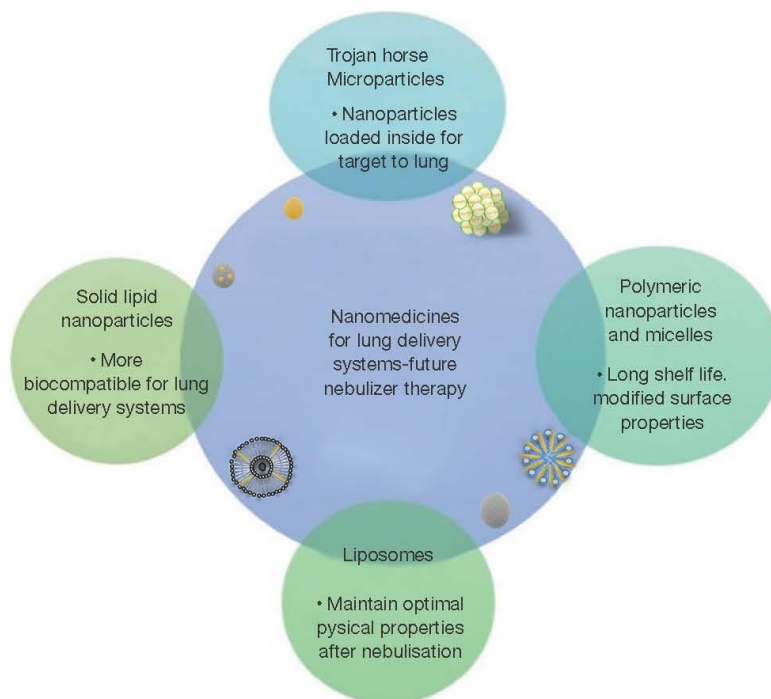


Figure 4 Nanomedicines characteristics of future lung delivery systems on nebulised therapy.

Nano scale for lung delivery systems

Pulmonary drug delivery has many advantages over other routes such as oral or parenteral administration. It is an attractive route due to two main reasons: (I) its non-invasive character allowing self-administration that leads to enhanced patient compliance and adherence to treatment; and (II) its large surface area for absorption along with reduced drug degradation and high permeability (34,35). This route has been used successfully for local delivery of a variety of APIs including proteins, peptides, chemotherapeutics, antibiotics and vaccines that could not have been possible via other administration routes (36,37).

In order to achieve successful pulmonary drug delivery, particle engineering is a key factor to take into account when developing inhalable formulations. Micro and nanoparticulate systems have been especially useful in sustained delivery and drug targeting with enhanced therapeutic effects (38).

An aerodynamic particle size below 5 μm is crucial for particles reaching the mid and deep lung parenchyma. However, bearing in mind that particles below 0.5 μm in size are easily exhaled, the development of successful nanotechnological approaches for lung application is not

an easy task. Amongst all the critical nanoscale design parameters, particle size, morphology, composition, rigidity and the surface chemistry architecture have to be controlled in order to optimise the PK/PD balance and to achieve site-specific targeting.

The combination of a variety of techniques at the micro and nanoscale has transformed pulmonary drug delivery. The most successful approaches will be discussed in the next section (Figure 4) (1).

Trojan Horse microparticles

One nanotechnology strategy for lung delivery is the use of "Trojan Horse microparticles" which are basically porous nanoparticles assembled within microparticulate systems (commonly between 2–5 μm in diameter), in such a way that the potential for drug targeting of the nanoparticles and the better flow and aerosolisation properties of the microparticles are combined in the same system.

Trojan Horse microparticles have been successfully produced using different strategies such as spray drying of solutions consisting of polymeric and non-polymeric nanoparticles (39) or using supercritical CO_2 as

antisolvent (40). During the spray drying process, Van der Waals forces are created which keeps the nanoparticles together within a matrix of excipients such as phospholipids or other polymers. Upon inhalation, the microparticulate systems dissolve releasing the nanoparticles within the lung parenchyma.

As an example for the treatment of lung cancer or bacterial infection, superparamagnetic iron oxide Trojan Horse microparticles (MMAD of 2.2 μm) have been produced utilising PEG, hydroxypropyl- β -cyclodextrin, ammonium carbonate and magnesium stearate as excipients. The particles are highly sensitive to the magnetic field and the targeting and deposition within the lung parenchyma can be facilitated by means of a magnet (41).

Polymeric nanoparticles and micelles

The use of multiple polymers for pulmonary drug delivery have been thoroughly investigated such as: (I) polycaprolactone; (II) alginate; (III) poly(lactic acid); (IV) poly(lactic-co-glycolic acid); (V) carbohydrate-based polymer such as chitosan; and (VI) gelatin base (42,43). The usage of these polymers has numerous advantages such as high drug encapsulation, sustained release, long shelf life, modified surface properties and prevention of drug degradation. Amongst all excipients for building nanoparticulate systems, block copolymers, chitosan and PEG are the most successful for achieving optimal sustained drug release and improved uptake (44). In addition, PEGylation also avoids phagocytosis of the particles and prolongs their half-life in the lung parenchyma (45). Nevertheless, in order to promote their biodegradability, modification of the polymer surface chemistry is required for therapeutic purposes and actually, their degradation rate in physiological media must be analysed along with toxicity assays to check the efficacy/toxicity balance of the carriers.

Multiple studies have been performed loading polymeric nanoparticles with anti-cancer drugs for targeted lung diseases. For instance, paclitaxel was loaded into polymeric particles consisting of PEG and polymer poly(ethylene oxide)-block-distearoyl phosphatidylethanolamine. The intratracheal instillation administration of the particles showed better drug absorption and improved drug localisation in the lung parenchyma in comparison with the intravenous administration of taxol (marketed formulation) (46).

Solid lipid nanoparticles

They are single layered solid particles consisting of solid lipid as matrix material, emulsifier and water which can be found physiologically. Several techniques have been successfully employed in the manufacture of these systems such as solvent evaporation or high pressure homogenization which are easily scalable from an industrial point of view. Good results in treating lung infections have been achieved when formulating amikacin with cholesterol using the latter strategy (47).

Phospholipids are found in most regions of the lung parenchyma at the alveolar surface (Figure 3). They are essential for friction reduction and maintaining of surface tension necessary for the proper functioning of the breathing mechanism (42,48). These type of nanoparticulate systems have shown a better efficacy/toxicity ratio than the polymeric ones due to their composition based on physiological components that are less toxic and demonstrate greater biocompatibility towards pulmonary drug delivery. As an example, solid lipid nanoparticulate systems consisting of a 30:70 ratio of phospholipids and triglycerides has demonstrated a good safety profile after nebulisation with no activation of pro-inflammatory cytokines in mice (49).

Liposomes

The difference between solid lipid nanoparticles and liposomes is that the latter consists on single or multiple concentric lipid bilayers manufactured primarily from phospholipids and cholesterol encapsulating an aqueous environment. As solid lipid nanoparticulate systems, liposomes exhibit higher biocompatibility than polymeric nanoparticles and possess sustained release characteristics, enabling the maximum drug effect over a prolonged period of time. For example, AmBisome[®], amphotericin B-loaded liposomes are commonly used in the prophylaxis of pulmonary fungal infections; however, currently, it is only commercialised for parenteral use but yet not for pulmonary.

Nonetheless, inhaled liposomes are challenging to manufacture as it is critical to maintain their optimal physical properties after nebulisation (50). Currently, two such liposomal formulations are in the final stages of clinical trials prior to commercialisation as dry powder systems. Arikace[®] (containing amikacin) and Pulmaquin[™] (containing ciprofloxacin) both developed for use in the treatment

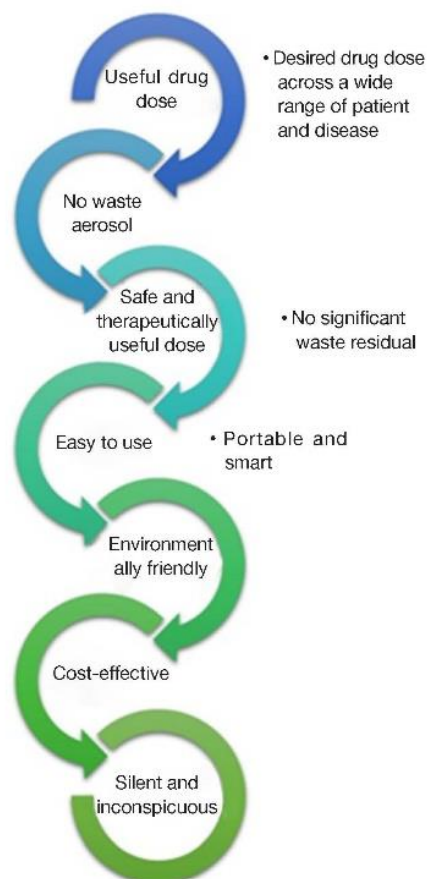


Figure 5 Characteristics of the ideal drug aerosol delivery system.

of pulmonary infections (42,51). Arikace[®], consisting of amikacin, dipalmitoyl-phosphatidylcholine and cholesterol, is in phase 2 clinical trials with the aim of treating CF-associated lung infection caused by *P. aeruginosa*. After treatment with the liposomal inhaled formulation, an improvement in lung function and reduction in the number of colonies of *P. aeruginosa* in sputum was achieved along with a satisfactory safety and tolerability profile. A further application of liposomal formulations is the encapsulation of antioxidant molecules for the treatment of acute oxidant-related lung injury (52).

Regulatory perspective of inhalation products by EMA and FDA: bioequivalence and toxicity issues

The European Standard recognizes that different nebulisers will deliver different doses of drug to the same patient—even if all conditions are controlled, such as breathing

pattern, volume fill of drug solution or suspension and what is more, in a wide range of diseases and patient groups (3). Even though, a great effort is being doing in developing more effective and reproducible inhalation products, they are still far from ideal.

Ideally, inhalers should deliver the desired drug aerosol dose across a variety of drug preparations with no significant wasted residual drug left in the device after use. They should be easy to use for all patients including paediatric and geriatric populations. Nebulisers should be portable (small and light), silent, inconspicuous and smart (signals indicating when not functioning properly; dose delivery is complete; patient compliance monitor, etc.). They should be a cost-effective therapeutic device with limited wasted aerosol and environmentally friendly, with no damaging propellants such as chlorofluorocarbons and hydrofluoroalkanes and ideally recyclable. All these characteristics are summarised in *Figure 5* (3).

The differences in bioequivalence studies of the inhalation devices and their high cost is an issue of concern for the regulatory bodies such as FDA and EMA. In 2009, the EMA issued the guideline focused on the demonstration of therapeutic equivalence between two inhaled products, based on a step-wise approach for the approval of generic inhaled formulations (53). From the point of view of the formulation, both the originator and the generic product should have an identical dosage form with the same API. Differences in crystalline structure, polymorphic form of the active ingredient or qualitative and quantitative variation in excipients should not unduly influence the pharmaceutical performance and efficacy/safety balance of the inhaled product.

The handling and resistance to airflow within the device for both the generic product and reference formulation should be the same. The CQAs to determine *in vitro* equivalence are: (I) dose delivery uniformity; and (II) particle size distribution (assessed by impactor stage), which should be within 15% of each other. The sole use of *in vitro* data is acceptable for approval when the generic formulation satisfies all of the above pharmaceutical criteria for equivalence. Otherwise, *in vivo* studies (pharmacokinetic or pharmacodynamics assays) may be required.

In 2013, five separate draft guidance were published by the FDA for each specific inhalation product: fluticasone propionate/salmeterol DPI and salbutamol sulphate, levalbuterol tartrate, ipratropium bromide, budesonide/formoterol fumarate MDIs (54,55). There are several challenges in gaining FDA approval for generic products

as it requires that all tests including *in vitro* (single actuation content and MMDA), pharmacokinetic and pharmacodynamic assays demonstrate equivalence. In addition, in order to demonstrate the similarity of physical components for generic MDIs, plume geometry, spray pattern, priming and repriming studies may also be required.

The requirements for equivalence of DPI devices include: (I) premetered multi-dose format; (II) the device mechanism; (III) the dose administered; (IV) the operating procedure; (V) the size; (VI) the shape; (VII) the device resistance; and (VIII) the dose counter. It is also a requirement to demonstrate both qualitative and quantitative equivalence or sameness. Qualitative sameness (Q1) implies that the generic product uses the same inactive ingredient as the originator whereas the quantitative sameness (Q2) infers that the concentration of the inactive ingredients in the generic product must be within 5% of those in the originator. The guidance documents have been criticised and challenged by bodies representing the pharmaceutical industry and rather than follow the Q2 requirement, it has been proposed to incorporate a quality-by-design (QbD) approach to study the control space of the excipient concentration for each generic product (20,56,57).

It is worth noting that there are a limited amount of excipients approved for pulmonary applications and there remains a dearth of published literature guidance regarding safety and marketing authorization of pharmaceutical excipients for pulmonary use. Some guidelines mention the type of toxicity assays required to determine whether the use of a novel excipient is safe for human use (ICH, M3, S3A and S7A) (15). In order to achieve regulatory approval for a new excipient, a complete toxicological evaluation may be sufficient without to include an inhalation toxicology profile. Consequently, there remains no inhalation toxicology or LD50 data available for many well-known excipients (15).

Overall, pulmonary delivery is very challenging in terms of: (I) to show bioequivalence between innovator and generic inhaled formulations; and (II) to approve the use of nanoparticulate systems as inhaled therapies. One of the main reasons why there is no inhaled nanomedicines in the market is due to its potential toxicity, not only within the respiratory tract but also in extrapulmonary tissues that can be secondarily targeted. Currently, most drugs are very potent and many of them can produce adverse effects at the lung level specially in those patients with impaired pulmonary functions due to smoking and/or chemotherapy (58,59). For example, inhalation of cytostatic

drugs can have a significantly negative effect leading to severe complications on the lungs. However, this can be an advantage in treating lung cancer and targeting cytostatic agents towards the lung parenchyma, limiting penetration into the bloodstream and protecting the rest of the body from adverse effects (35,42).

Future perspectives and concluding remarks

Nebulised antibiotics offer great advantages over intravenous administered antibiotics as well as other conventional antibiotic therapies. However, their use is not widely standardized in the current clinical practice leading to large variability between patients. This is the consequence of large differences in nebuliser performance and the lack of robust preclinical and clinical data. Nanotechnology based approaches are revolutionizing inhaled therapies especially in lung cancer and infections. Promising carriers such as Trojan Horses microparticles, polymeric and lipid nanoparticulate systems and liposomes are emerging. Amongst all the critical nanoscale design parameters, particle size, morphology, composition, rigidity and surface chemistry architecture have to be controlled in order to optimise the PK/PD balance as well as the efficacy/toxicity balance and to achieve site-specific targeting. Development of novel excipients to manufacture these nanomedicines and assessment of their toxicity is also a keystone. Indeed, pharma companies need to evaluate carefully the benefits of using novel substance versus the delay in commercialisation due to objections from regulatory agents. For this reason, many companies prefer to use first, the few excipients already approved for inhalation in different concentrations and second, physiological and biocompatible excipients whose toxicity profile is well-known in other routes. In conclusion, the development of novel excipients and drug delivery systems is a current clinical need in order to achieve safer and more effective pulmonary formulations.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Complutense University and Madrid Community Administration to the research group 91093.

Footnote

Conflicts of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Poulakou G, Siakallis G, Tsiodras S, et al. Nebulized antibiotics in mechanically ventilated patients: roadmap and challenges. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017;15:211-29.
2. Lahzami S, Nicod LP. Inhaled therapies for cystic fibrosis. *Rev Med Suisse* 2011;7:2285-8.
3. Dennis JH, Pieron CA. Chapter 2: Quality control and standards in nebulizer performance and use. In: Boe J, O'Driscoll BR, Dennis JH. editors. *Practical Handbook of nebulizer therapy*. Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group plc., 2004.
4. Hickey AJ. *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*. New York, USA: Marcel Dekker, 2004.
5. Current best practice for nebuliser treatment. The Nebulizer Project Group of the British Thoracic Society Standards of Care Committee. *Thorax* 1997;52 Suppl 2:S1-3.
6. Sukumaran T, Pawankar R, Ouseph J. Asthma diagnosis and treatment - 1009. A clinical study of NE-C900 (OMRON) nebulizer. *World Allergy Organ J* 2013;6 Suppl 1:P9.
7. Mao L. Formulation considerations for inhaled products. Available online: <http://www.catalent.com/index.php/thinking/science/formulation-of-inhaled-products>. Accessed date: 03/08/2017. 2011.
8. Sou T, Meeusen EN, de Veer M, et al. New developments in dry powder pulmonary vaccine delivery. *Trends Biotechnol* 2011;29:191-8.
9. Chen S, Goode AE, Sweeney S, et al. Sulfidation of silver nanowires inside human alveolar epithelial cells: a potential detoxification mechanism. *Nanoscale* 2013;5:9839-47.
10. Esper RC, Estrada IE, de la Torre Leon T, et al. Treatment of diffuse alveolar hemorrhage secondary to lupus erythematosus with recombinant activated factor VII administered with a jet nebulizer. *J Intensive Care* 2014;2:47.
11. Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:158-71.
12. Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:214-21.
13. Farber MK, Angelo TE, Castells M, et al. Anesthetic management of a patient with an allergy to propylene glycol and parabens. *Anesth Analg* 2010;110:839-42.
14. O'Riordan TG. Formulations and nebulizer performance. *Respir Care* 2002;47:1305-12; discussion 12-3.
15. Pilcer G, Amighi K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int J Pharm* 2010;392:1-19.
16. Martin AR, Finlay WH. Nebulizers for drug delivery to the lungs. *Expert Opin Drug Deliv* 2015;12:889-900.
17. Chan JG, Traini D, Chan HK, et al. Delivery of high solubility polyols by vibrating mesh nebulizer to enhance mucociliary clearance. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2012;25:297-305.
18. Ibrahim M, Verma R, Garcia-Contreras L. Inhalation drug delivery devices: technology update. *Med Devices (Auckl)* 2015;8:131-9.
19. Heathcote KL, Cockcroft DW, Fladland DA, et al. Normal expiratory flow rate and lung volumes in patients with combined emphysema and interstitial lung disease: a case series and literature review. *Can Respir J* 2011;18:e73-6.
20. Hou SG, Wu JY, Li X, et al. Practical, regulatory and clinical considerations for development of inhalation drug products. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015;10:490-500.
21. Dennis JH. Chapter 3: New developments in nebulizer technology. In: Boe J, O'Driscoll BR, Dennis JH. editors. *Practical Handbook of nebulizer therapy*. Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group plc., 2004.
22. Dalby RN, Eicher J, Zierenberg B. Development of RespiMat((R)) Soft Mist Inhaler and its clinical utility in respiratory disorders. *Med Devices (Auckl)* 2011;4:145-55.
23. Fischer A, Stegemann J, Scheuch G, et al. Novel devices for individualized controlled inhalation can optimize aerosol therapy in efficacy, patient care and power of clinical trials. *Eur J Med Res* 2009;14:71-7.
24. Scheuch G, Siekmeier R. Novel approaches to enhance pulmonary delivery of proteins and peptides. *J Physiol Pharmacol* 2007;58 Suppl 5:615-25.
25. Ryan G, Singh M, Dwan K. Inhaled antibiotics for long-term therapy in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(3):CD001021.
26. Maselli DJ, Keyt H, Restrepo MI. Inhaled Antibiotic Therapy in Chronic Respiratory Diseases. *Int J Mol Sci* 2017;18(5). pii: E1062.
27. Godet C, Cateau E, Rammaert B, et al. Nebulized Liposomal Amphotericin B for Treatment of Pulmonary Infection Caused by *Hormoglyphiella aspergillata*: Case Report and Literature Review. *Mycopathologia* 2017;182:709-13.
28. Mantero M, Gramegna A, Pizzamiglio G, et al. Once daily aerosolised tobramycin in adult patients with cystic fibrosis

- omplianceregulatoryinformation/guidances/ucm367643.pdf. Accessed date: 01/08/2017. 2013.
55. FDA. Salbutamol sulphate guidelines for bioequivalence products. Available online: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM346985.pdf>. Accessed date: 01/08/2017. 2013.
56. Solé-Lleonart C, Rouby JJ, Blot S, et al. Nebulization of Antiinfective Agents in Invasively Mechanically Ventilated Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *Anesthesiology* 2017;126:890-908.
57. Ran A. *Practical Inhalation Aerosol Technology*. 1 ed. Chapel Hill, USA: University of North Carolina, 2004.
58. Schwaiblmair M, Behr W, Haeckel T, et al. Drug induced interstitial lung disease. *Open Respir Med J* 2012;6:63-74.
59. Yonemori K, Hirakawa A, Kawachi A, et al. Drug induced interstitial lung disease in oncology phase I trials. *Cancer Sci* 2016;107:1830-6.

Cite this article as: de Pablo E, Fernández-García R, Ballesteros MP, Torrado JJ, Serrano DR. Nebulised antibiotherapy: conventional versus nanotechnology-based approaches, is targeting at a nano scale a difficult subject? *Ann Transl Med* 2017. doi: 10.21037/atm.2017.09.17

Anfotericina características fisicoquímicas formulaciones orales de AmB AmBisome Fun
gizona anfotericina B pellet estabilidad ace
erada **OBJETIVOS** formulaciones admin
tración pulmonar tamaño aerodinámico d
de las partículas CD manos aleucinadistribuci
ón RT retículo endotelial toxicidad hemolíti
macrófagos Leishmania AmB Beagle shipo
ensión ciclodextrinas chitosán modificado
anfotericina poliagregado tamaño de partíc
la absorción oral toxicidad hemolítica biod
distribución prolongada circulación plasmát
a combinación con SS distintas capacidades
respiratorias AmBD Plynebulización

PLANTEAMIENTO/ OBJETIVOS

En base a las formulaciones comercializadas de AmB y a la alta prevalencia de pacientes con infecciones pulmonares severas, se pone de manifiesto la necesidad de desarrollar formulaciones de AmB adaptadas a la vía pulmonar con el fin de reducir los efectos adversos y de asegurar una liberación eficaz del fármaco a lo largo de todo el TR. Por esta razón, en esta tesis se ha planteado en primer lugar el desarrollo de una forma farmacéutica, microesferas, de administración pulmonar de AmB. En el desarrollo de la nueva forma farmacéutica se tuvo en cuenta la selección y proporción de excipientes adaptados para esta vía de administración.

Sin embargo, además de la vía pulmonar, es necesario mejorar el arsenal terapéutico por vía oral. En este sentido en esta tesis también se ha abordado el desarrollo de una formulación avanzada de administración oral en la cual la AmB ha sido previamente solubilizada y depositada en una fina capa de recubrimiento sobre pellets comerciales con el fin de mejorar la biodisponibilidad oral.

El desarrollo de ambas formulaciones por vía oral y pulmonar supondría un gran avance terapéutico en el tratamiento de las infecciones fúngicas, teniendo en cuenta que actualmente, la mayoría de las especies infecciosas de hongos presentan un elevado número de resistencias frente a los tratamientos a excepción de la AmB.

Teniendo en cuenta esta clara necesidad terapéutica, los objetivos de esta tesis son los siguientes:

- El desarrollo de micropartículas optimizadas para la administración pulmonar de AmB como DPI para el tratamiento de infecciones pulmonares y sistémicas.
- El desarrollo de una formulación de AmB por vía oral para el tratamiento de infecciones sistémicas antifúngicas y antiparasitarias.

Anfotericina características fisicoquímica
s formulaciones orales de AmB AmBisome F
ungizona anfotericina B pelletse estabilidad
acelerada **PUBLICACIONES** formula
ciones administración pulmonar tamaño
aerodinámico de las partículas CD mano sa
leucinadistribución RTretículo endotelial
toxicidad hemolítica macrófagos Leishma
nia AmB Beagle shipotensión ciclodextrin
aschitosán modificado anfotericina polia
gregada tamaño partícula absorción oral to
xicidad hemolítica biodistribución prolon
gadacirculación plasmática combinación
con SSdistinta capacidades respiratorias
AmBD Plynebulización eficaz estabilidad

CAPÍTULO 1.

ANFOTERICINA B DE ADMINISTRACIÓN ORAL

Understanding the impact of stability on the drug efficacy, safety and release when manufacturing oral solid dosage forms: A case study with amphotericin B coated pellets

E. de Pablo ^a, M.I. Mitroi ^a, P. O'Connell ^b, R. Fernández-García ^a, M.A. Dea-Ayuela ^c, F. Bolás ^d, R. Raposo ^e, M.P. Ballesteros ^{a, f}, J.J. Torrado ^{a, f}, A.M. Healy ^b, D.R. Serrano ^{a, f, *}

^a Pharmaceutics and Food Technology Department, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

^b Synthesis and Solid State Pharmaceutical Centre, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland.

^c Pharmacy Department, School of Life Sciences, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Moncada, 46113 Valencia, Spain.

^d Parasitology Department, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

^e Physiology Department, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

^f Instituto Universitario de Farmacia Industrial, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

*Corresponding author:

Dolores R. Serrano
Department of Pharmaceutics and Food Technology
School of Pharmacy
Universidad Complutense de Madrid
Plaza Ramon y Cajal s/n
28040-Madrid, Spain.
Email: drserrano@ucm.es

Abstract

Stability studies are necessary not only to verify the drug content but also that dissolution, toxicity and efficacy parameters are within the specification limits required by Pharmacopeia during the whole shelf life of the product. This is especially important when new oral drug delivery systems for poorly water soluble drugs are manufactured. In this work, a highly water soluble amphotericin B (AmB) formulation was developed based on the formation of a stable amorphous solid dispersion during spray coating. AmB has ensured its use as an antifungal agent for over six decades due to its broad spectrum of action. However, this drug is not without significant limitations such as toxicity and restriction of use as IV infusion, but also has a very narrow therapeutic window. The development of an oral formulation would improve these shortcomings. A range of oral AmB formulations were developed by spray coating an aqueous solution containing the drug, sodium deoxycholate as surfactant and a binder (polyvinylpyrrolidone or hydroxypropylmethyl cellulose acetate succinate) on microcrystalline cellulose pellets. Pellets coated with a second layer containing Eudragit L-100 were also studied. To assure their suitability for manufacturing and clinical oral use, a series of parameters such as dissolution, efficacy and toxicity were investigated before and after aging to understand the impact of stability during the whole shelf life period.

The AmB coated beads have shown an improved in *in vitro* performance, characterized by higher activation energies and hence, greater chemical stability, and better dissolution profile than the raw unprocessed AmB. All the formulations displayed a therapeutic index higher than 10, making them suitable to enter further tests and clinical trials. The type of binder and coating with the second layer of Eudragit played a key role in the pharmacochemical properties of the formulations, being the formulation containing hydroxypropylmethyl cellulose acetate succinate as binder and Eudragit L-100 as a second coating layer the most promising formulation for the oral delivery of AmB.

Keywords: Amphotericin B; coated pellets; oral delivery; stability.

1. Introduction

Amphotericin B (AmB) is a broad-spectrum antifungal drug used in the clinical setting since the 1960s. Even with the passage of time, it is still one of the most widely used drugs to treat systemic fungal infections, due to its high potency and low appearance of resistance. However, this medication comes with many limitations due to its poor aqueous solubility, permeability and high nephrotoxicity and haemotoxicity levels [1].

The first commercialised formulation was Fungizone[®], which is a micellar dispersion of AmB and sodium deoxycholate (NaDOC) and was considered to be the ‘first-line treatment’ for more than thirty years, but due to its narrow therapeutic window and strict monitoring time was downgraded to second line treatment [2]. In order to improve these shortcomings, new formulations, such as lipid-based formulations were commercialised in the 90s (Ambisome[®], Abelcet[®] and Amphocil[®]), but although they improved some of the drug limitations, they are still used as an IV infusion, with no oral formulation available for the patients [3]. The lack of an oral commercially available AmB formulation is due to its poor aqueous solubility (< 1mg/ml), low permeability and lack of chemical stability [4]. The limitation in parenteral route of administration directly impacts patient’s adherence, but also hospitalisation time and ease of use, which overall increases time and costs of treatment. Hence, the development of an oral stable AmB formulation is a current clinical need that could potentially eliminate these factors of distress and improve the quality and costs of health care [5].

Three main parameters should be born in mind when developing a new oral AmB drug delivery system, its efficacy-toxicity ratio, dissolution and stability. As due to its mechanism of action, AmB has a high toxicity profile. It disrupts the ergosterol which is present solely in fungal and parasite membranes, but it can still affect sites high in cholesterol, such as the kidneys and red blood cells. As a consequence of these side effects, haemolysis tests are a requirement to monitor the toxicity levels [6]. These studies are of high importance when studying the safety profile of novel AmB formulations and establishing their suitability for preclinical studies [7, 8].

An optimum dissolution profile is critical to make sure that the formulation characteristics are meeting the bioavailability parameters to ensure enough drug absorption. The development of amorphous solid dispersions is a common strategy to enhance dissolution of poorly water-soluble drugs. Spray coating is a well-established scale-up technique that allows the formation

of stable amorphous solid dispersions. The deposition of a spray layered formulation on a solid support enhances the surface area available for dissolution but also may promote chemical and physical degradation for which may be required a second moisture protective layer. During the formulation development stage, it has to be verified that the increased in dissolution rate is maintained during the whole drug shelf life and that is not affected by chemical and physical degradation. Otherwise, the oral bioavailability may be dramatically decreased if the amorphous solid dispersion formed during the spray coating process is altered.

For this reason, stability studies are of high importance, as stability is a critical parameter when deciding if the drug meets the pharmacopoeia specifications to be suitable for clinical use and also helps specifying the drug shelf life, storage and packaging conditions [9]. Long term stability studies according to the International Conference of Harmonisation (ICH) guidelines (25°C/60%RH) can take several years which hampers the decision making process to warrant a suitable formulation for clinical trials. Hence, the implementation of Accelerated Predictive Stability (APS) studies at more extreme conditions of temperature and relative humidity are an alternative strategy to shorten the time needed in the preformulation step.

The hypothesis underpinning this research is that oral formulations containing poorly water soluble drugs may not meet the established criteria regarding dissolution, efficacy and toxicity after aging. Stability studies are necessary to verify not only the drug content but also that the established criteria are within the specification limits during the whole shelf life of the product. Hence, the aim of this project was the development of a highly water soluble AmB coated pellet formulation for oral drug delivery and the evaluation of the impact of chemical and physical stability on efficacy, toxicity and drug release. Stability predictive models comparing long-term with accelerated stability data will be also developed.

2. Materials and methods

2.1 Materials

AmB was purchased from Azelis (Barcelona, Spain). Non-Pareil Seeds[®] (Sugar beads) with 500 µm were a gift from JRS Pharma (Rosenberg, Germany). Neutral starter cores, Cellets[®] (pellets made of microcrystalline cellulose) and functional starter cores, TAP[®] (pellets made of tartaric acid) were a gift from Pharmatrans Sanaq AG (Allschwi, Switzerland). Polyvinylpyrrolidone (PVP K90) was donated from BASF (Ludwigshafen, Germany). HMPC

AS LG was supplied by Shin-Etsu Chemical Co (Tokyo, Japan). Eudragit L100 was a gift from Evonik (Darmsdat, Germany). Sodium deoxycholate was purchased from Fluka Chemie (A.G.Buch, Switzerland). Ethanol was supplied from Corcoran Chemicals (Dublin, Ireland). Methanol HPLC grade was purchased from Fisher Scientific (Dublin, Ireland). Phosphoric acid (85%) and sodium hydroxide were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2 Methods

2.2.1 Preparation of AmB coated pellets by spray coating

Formulations were produced using a fluidised bed apparatus (Wurster, Mini-Glatt, Binzen, Germany). Microcrystalline cellulose (MCC), sugar and tartaric acid (TAP) beads of 500 μm in diameter were coated with an aqueous solution containing AmB: NaDOC and a binder (PVP K90 or HPMC AS). The aqueous solution was prepared as follows: NaDOC (400 mg) was solubilised in 100 ml of deionised water and sodium hydroxide 2N solution was added to adjust the pH to 12.0. AmB (500 mg) was dispersed in the aqueous basic solution following by the addition of orthophosphoric acid (diluted at 10%) to lower the pH to a physiological value of 7.4 [10, 11]. Afterwards, the binder (100 mg) was added to the solution. The final AmB concentration was 5 mg/ml.

The spray coating process parameters were as follow: 80°C inlet temperature, 0.5 mm nozzle diameter, 1.7 g/min spray rate, 25 m³/h nitrogen flow rate and 0.8 bar atomisation pressure. The aqueous solution above described (AmB: NaDOC: binder, 50:40:10, W:W:W) was sprayed onto 9 g of beads (either sugar, MCC or TAP). In a second set of experiments, an ethanolic solution (100 ml) containing Eudragit L-100 (1%) was sprayed on top of the AmB coated pellets to study the impact of a second layer in the stability and the physicochemical properties of the formulation.

2.2.2 Physicochemical characterisation

Quantification of Drug Loading

AmB coated pellets (10 mg) were diluted in 1 ml of methanol and then in mobile phase (1:10, V:V). Samples were filtered by 0.45 μm PVDF filters (Millex[®] HV, Merck Millipore) and analysed using a validated HPLC method [12]. Briefly, HPLC was equipped with a Jasco PU-1580 pump, a Jasco AS-2050 Plus autosampler and a Jasco UV-1575 UV-Visible detector.

The integration of peaks was performed using a Borwin PC program (JMBS Development). The retention time averaged 8 min on a reverse- phase C18 column (Hypersil BDS, 200 x 4.6, 5µm) using an acetonitrile- acetic acid-water (52: 4.3: 43.7 v/v/v) mixture as mobile phase, filtered through a 0.45 µm hydrophilic polypropylene filter membrane (GH polypro, Pall Corp., USA). The flow rate was 1 ml/ min and the effluent was monitored at 406 nm. The injection volume was 100 µL of volume of injection. The AmB concentration of each sample was extrapolated from a calibration curve of AmB dissolved in dimethylsulphoxide further diluted with mobile phase (between 50 µg/ml to 0.1 µg/ml).

Scanning Electron Microscopy (SEM) and Digital Microscope

The surface morphology of the beads, coated with gold/palladium, was evaluated using SEM as previously described [13]. In addition, beads were cut in half and imaged by using a 9MP 2-200 x digital microscope (Conrad Electronics, Germany). Images were processed by Image J v1.46 image analysis software [13].

Dynamic Vapour Sorption (DVS)

Water sorption kinetic profiles were obtained using a DVS (Advantage, Surface Measurement Systems, Alperton, UK) at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and using water as the probe vapour. Samples were dried at 0% relative humidity (RH) for 1 h and then subjected to step changes of 10% RH up to 90% RH, and the reverse for desorption. The sample mass was allowed to reach equilibrium, defined as $dm/dt \leq 0.002$ mg/min over 10 min, before the RH was changed [14, 15].

Near-IR spectroscopy

The Near Infrared Spectrometer used was a Brimrose AOTF-NIR Luminar 5030 (Sparks, Maryland USA) spectrometer with a reflectance probe. Data was normalised and the spectral range scanned was between 1100 nm and 2300 nm. One hundred scans were collected on average for a total collection time of 10 seconds per spectrum.

Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry (MTDSC)

Sample scans were recorded in triplicate on a QA-200 TA instrument (TA instruments, Elstree, United Kingdom) calorimeter using nitrogen as the purge gas. Beads were weighted (4-6 mg), sealed in aluminium pans with one pin-hole and analyzed in a scanning rate of $5^\circ\text{C}/\text{min}$ from

25° C to 210° C, amplitude of modulation of 0.796° C and modulation frequency of 1/60 Hz. Calibration of the instrument was carried out using indium as standard [10].

2.2.3 Dissolution studies

Dissolution studies (n=3) were performed for all the pellet formulations (200 mg) and unprocessed AmB in triplicate using a USP apparatus 2 at 100 rpm (Erweka DT 80, Heusenstamm, Germany). The dissolution medium was prepared according to USP Pharmacopeia and was consisting of 500 ml of simulated gastric fluid without enzymes (pH 1.2 ± 0.05) during the first hour followed by the addition of 400 ml of simulated intestinal fluid without enzymes (pH 6.8 ± 0.05) during 5 hours. Sodium hydroxide at 30% (6 ml) was added to adjust the pH. Temperature was set as 37 ± 0.5 °C. Samples (5 ml) were collected without reposition at 5, 10, 15, 30 and 45 minutes and at 1, 2, 3, 4 and 6 hours. Samples were then centrifuged (Genesys, Madrid, Spain) at 5000 rpm for 5 min to precipitate undissolved AmB. Supernatant was diluted with mobile phase (1:1, V:V) and subsequently analysed by the HPLC method previously described.

2.2.4 *In vitro* Candida activity assay

The antifungal activity of the formulations was tested against *C. albicans* CECT 1394. This strain was selected due to its higher incidence and prevalence compared to other *Candida spp.* Prior to the beginning of the study, yeast isolates were cultured on Sabouraud dextrose agar at 30 °C for 72 h to ensure viability and absence of contamination. Antifungal sensitivity was performed in YPD broth medium which was first sterilized at 121 °C and once attemperated, a yeast suspension, prepared in sterile saline (NaCl 0.9%) was inoculated resulting in 2×10^6 cells/ml. The AmB coated pellets were counted and added in each well (1, 4, 8, 12, 20 or 30 pellets per well). PBS (100 µl) and the inoculated YPD broth (100 µl) were added in each well. The experiment was performed in triplicate. For the positive control, PBS with no AmB pellets was used and for the negative control, AmB dissolved in DMSO (500-3.6 µg/ml) was added (10 µl) in each well containing 90 µl of PBS and 100 µl of inoculated YPD broth. After the plates were set up, they were incubated at 37° C for 24 hours. The absorbance was measured at 595 nm in a multiplate reader (ELx808, BioTek Instruments Inc. Swindon, UK).

The following equation was used to calculate the inhibition of growth:

$$\text{Inhibition growth (\%)} = 100 - \frac{\text{ABS}_s - \text{ABS}_n}{\text{ABS}_p - \text{ABS}_n} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Where ABS_s is the average absorbance of the sample, ABS_n is the average absorbance of the negative control, and ABS_p is the average absorbance of the positive control.

2.2.5 *Ex vivo* Red Blood Cell (RBC) Toxicity assay

Venous blood (25 ml) was obtained from a healthy volunteer, following the Institutional Review Board (IRB) guidelines. The blood was centrifuged at 1000 rpm for 5 min. After the plasma and RBC were separated, the haematocrit tube was filled with 150 ml of NaCl solution and was centrifuged again. The erythrocytes were washed twice, by repeating the steps above. The supernatant was removed, and the RBC were washed twice with isotonic PBS (pH 7.4). RBCs were diluted in PBS to a 4% final concentration. A 96 well plate was prepared by adding 100 μl of PBS (pH 7.4) and 100 μl of the diluted RBC to each well. The AmB coated pellets were added in, as 1, 4, 8, 12, 20 or 30 pellets per well. The experiment was performed in triplicate. For the positive control, 20% Triton X-100 was added (10 μl) and for the negative control, buffer 7.4 pH was added in each well with no AmB coated pellets. AmB dissolved in DMSO was also tested at the same concentrations for comparison purposes. After the plates were set up, they were incubated at 37 °C for 1 hour. The plates were then centrifuged at 500 x g for 5 min to maintain the integrity of the erythrocytes. The supernatant (100 μl) from each plate were transferred into a new 96-well plate. The plates were then analysed by reading the absorption of haemoglobin at 595 nm using a plate reader (ELx808, BioTek Instruments Inc. Swindon, UK). The percentage of haemolysis was calculated using the following equation (Eq. 2) [16]:

$$\text{Haemolys (\%)} = \frac{\text{ABS}_s - \text{ABS}_b}{\text{ABS}_{s1} - \text{ABS}_b} \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

Where ABS_s is the absorbance of the sample, ABS_b is the average absorbance of the buffer, and ABS_{s1} is the average absorbance of the lysed samples with Triton X.

2.2.6. Stability Studies

Accelerated stability studies were performed at different temperatures and relative humidity conditions: 50/11, 50/50, 60/11, 60/75, 70/11, 70/50, 80/11 and 80/75 (°C/ % RH). Each stability chamber contained several vials of each AmB coated pellet formulation (3- 5 mg). The temperature was achieved by placing each hermetically closed jar in an oven (Mettler, Bittmann,Ireland). The relevant relative humidity was obtained by adding vials containing saturated solutions (sodium bromide for 50%, sodium chloride for 75%) or silica for 11% RH. The chambers temperatures and relative humidity was checked daily, with a RH monitor and thermometer and changes were made accordingly. At different time points (1, 3, 4, 6, 10 and 14 days), samples were collected, diluted with mobile phase and the drug content was quantified using the HPLC method previously described.

The degradation reaction of AmB was calculated by fitting the percentage of drug degraded at different time points to several kinetic order equations (zero order, first order, second order, Avrami and diffusion) [13, 17]. The best fitting kinetic order equation was considered the one with the highest averaged R^2 at the different temperatures at 11% RH. Using the degradation rates obtained by the best fitting kinetic order at different temperatures the logarithmic expression of the humidity-corrected Arrhenius equation was employed to calculate the activation energy (Eq.3):

$$\ln(k)=\ln(A) - \frac{E_a}{RT} + B(RH) \quad (\text{Eq.3})$$

where K is the degradation rate (% drug degraded/day), A is the collision factor, T is the absolute temperature in Kelvin, R is the gas constant (1.985 cal/mol/K) and E_a is the activation energy in cal/mol. The B term (moisture sensitivity factor) was calculated using the following equation:

$$B(RH)=\frac{\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right)}{RH_1-RH_2} \quad (\text{Eq.4})$$

Where K_1 and K_2 are the degradation constants calculated at the same temperature but different relative humidity, RH_1 and RH_2 , respectively. The B term was calculated at the different temperatures and the averaged value was included in the humidity-corrected Arrhenius equation.

Long term stability (at 6 months) of the AmB coated pellets was performed at two different conditions: 25/10 and 4/10 (°C/HR). Drug stability at these conditions was then predicted using the calculated Arrhenius equation and data was compared to experimental values [13].

2.2.7 After-aging studies

The AmB coated pellets were exposed for one week at 50° C and 11% RH (which results in 10% drug degradation). Afterwards, dissolution studies, *in vitro* efficacy and *ex vivo* red blood cell toxicity assay were performed as previously described.

2.2.8 Statistical analysis

Statistical analysis was performed via one-way analysis of variance test using Minitab 17 (Minitab Ltd, Coventry, UK) followed by Tukey's test considering p-values for statistical significance <0.05 [18].

3. Results

3.1. Development of AmB coated pellets

Three different types of core materials were used as support: MCC, non-pareil sugar and tartaric acid. During the spray coating, the sugar and tartaric acid beads started to dissolve and to form clusters resulting in an unsuccessful process which probably was related with an inefficient drying of the water solvent utilised to dissolve the drug and the excipients. On the contrary, MCC beads performed well and did not exhibit any signed of aggregation during the spray coating process. For this reason, MCC was selected as support to proceed with further coating experiments. Four different types of pellets were manufactured whose composition is illustrated in Table 1. The first layer was consisting of an aqueous solution containing the drug (AmB) solubilised in the dimeric form by the NaDOC [6] and a binder that was either PVP K90 (formulation A) or HMPA AS (formulation B). Each formulation was also coated with a second layer of an anionic copolymer (Eudragit L100) based on methacrylic acid and methyl methacrylate.

Table 1: AmB coated pellets composition. First layer was consisting of AmB, NaDOC and binder (50:40:10, w:w:w). Second layer was consisting of 1% ethanolic solution of Eudragit L100. MCC: Microcrystalline Cellulose; PVP K90: Polyvinylpyrrolidone K90; HPMCAS: Hypromellose Acetate Succinate; NaDOC: Sodium Deoxycholate.

Formulation	Beads	First layer	Second layer
A1	MCC Beads	AmB: NaDOC: PVPK90	N/A

A2	MCC Beads	AmB: NaDOC: PVPK90	Eudragit L-100
B1	MCC Beads	AmB: NaDOC: HPMCAS	N/A
B2	MCC Beads	AmB: NaDOC: HPMCAS	Eudragit L-100 L

3.2. Physicochemical characterization

Drug Loading

Considering that the total starting materials were 10 g for formulations A1 and B1 and 11 g for formulations A2 and B2, the average drug loading was ranging between 76 and 85% (Table 2). These spray coating efficiencies were successful bearing in mind the small batch size utilized to prepare each batch and consequently, the drug lost resulting of the deposition on the exhaustion filters.

Table 2: AmB loading and yield of spray coating process.

Formulation	AmB loading (%)	Yield (%)
A1	4.16 ± 0.22	83.2 ± 0.9
A2	3.74 ± 0.60	82.3 ± 0.6
B1	3.46 ± 0.53	85.8 ± 0.2
B2	4.29 ± 0.34	76.2 ± 0.5

Morphology

The SEM micrographs showed that the morphology of the coated beads were quasi spherical. The coating with both type of binders resulted in a smoother matrix which was related to the amorphous nature of the first coating layer (A1 & B1). In both cases, small particles deposited on the surface of the beads were observed (Fig 1). In contrast, the surface morphology of A2 and B2 formulations was more polyhedral suggesting a non-homogeneous deposition of the Eudragit layer. However, both A2 and B2 formulations showed a highly porous structure surface compared to A1 and B1. Beads cut in half (row 3) show the thickness of the coating layer (few microns). In the digital microscope images, it is clearly observed the yellow color of the surface of the pellets attributed to the AmB and the white core corresponding to the crystalline MCC.

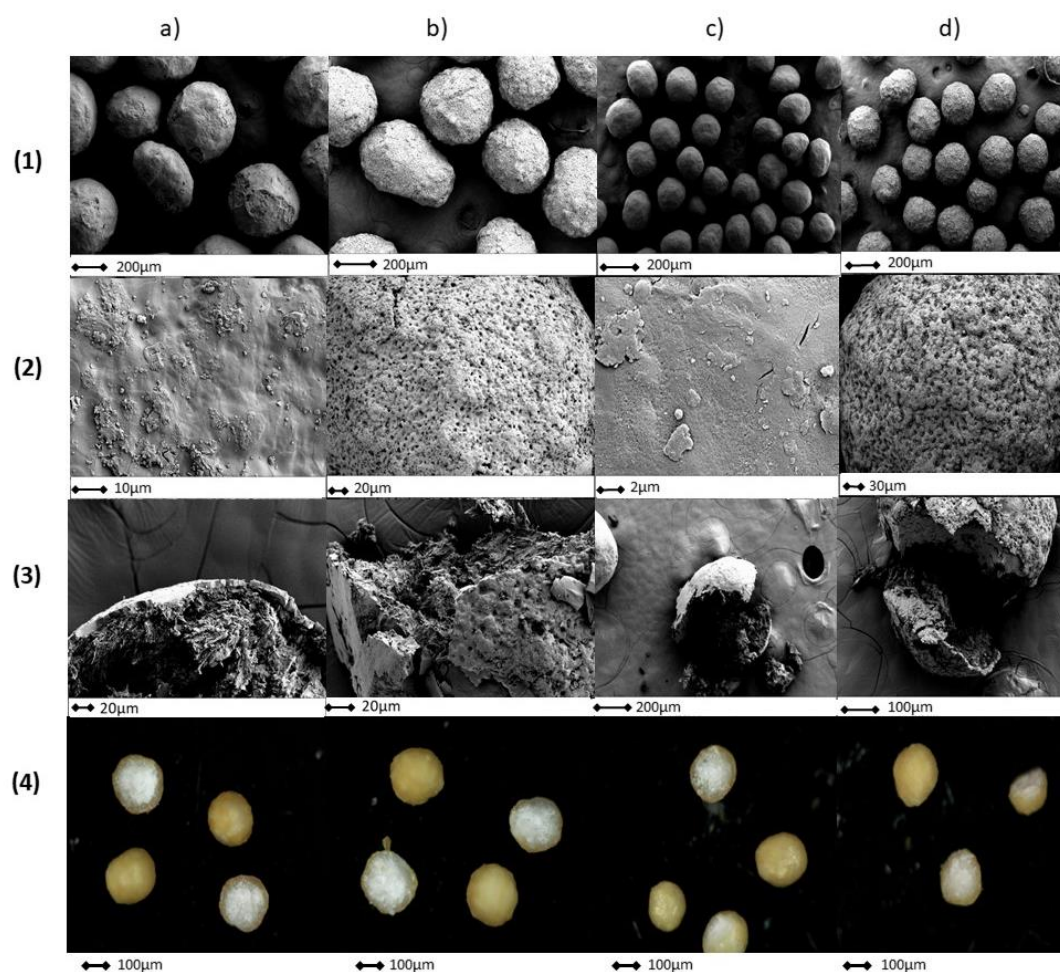


Figure 1. Surface images obtained by SEM (rows 1-3) and digital microscope (row 4). Key: AmB coated pellet formulations A1 (column a); A2 (column b); B1 (column c); B2 (column d).

DVS analysis

The water sorption kinetic profile showed a 10% increment in mass at 90% relative humidity (Figure 3). All the formulations exhibited a similar behavior after exposure to different partial humidity pressures. However, hysteresis was more pronounced in those pellets coated with two layers probably because the water vapor can be condensed and retained in the porous structured observed by SEM. No loss mass associated to drug crystallization was evidenced with any of the formulations. In Figure 3c, it is clearly observed that the second sorption-desorption cycle is overlapping the first cycle.

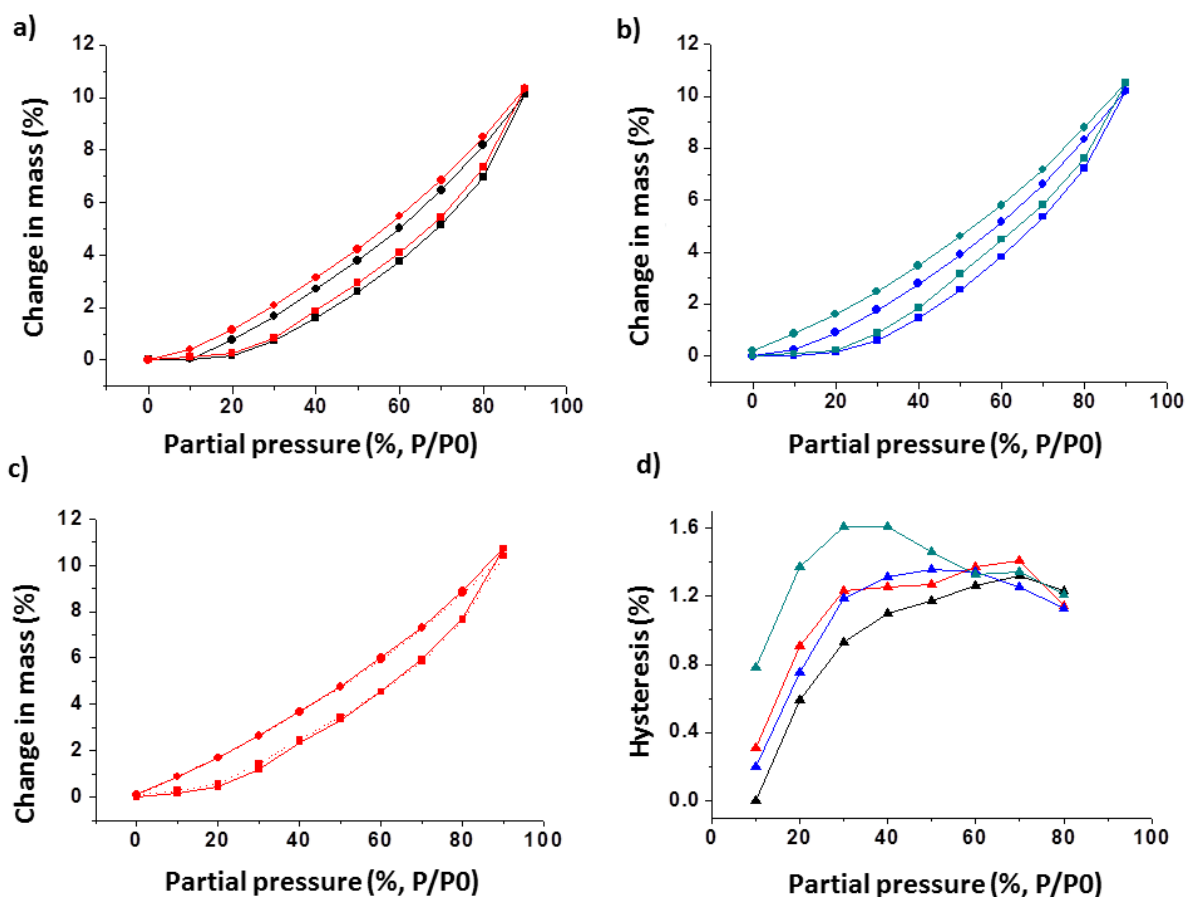


Figure 3: Water sorption kinetic profiles (a-c) and hysteresis (d) of AmB coated pellets. Key: formulation A1 (black line), formulation A2 (red line), formulation B1 (blue line), formulation B2 (green line). Squares represents the sorption cycle and circles represents the desorption cycle. In panel c, the solid line corresponds to the first cycle (sorption-desorption) and the dash line corresponds to the second cycle (sorption-desorption).

Near-IR

Unprocessed AmB exhibited a characteristic band in the NIR at a wavelength of 2000-2100 nm, corresponding with the R-OH functional groups (1st overtone) (Fig. 4). This is an essential structure feature in the activity of the molecule as -OH groups interact with the ergosterol located in the lipidic bilayer membrane of the microorganisms forming a channel that triggers the killing of the fungus and parasites. The bands at 1600-1700 nm and 1300-1400 nm are also very distinctive in the four AmB coated pellet formulations with a clear shift compared to the unprocessed AmB. These bands correspond to the CH, CH₂ and CH₃ groups (1st and 2nd overtone region respectively) of the molecule. The interaction of AmB with the NaDOC and the binder during the coating process can explain the shift in the bands observed in the formulations compared to the unprocessed. As both NaDOC and AmB have a polar and non-polar side, they are able to form a colloidal micellar complex, with the hydrophobic faces close to each other and the hydrophilic side being able to form hydrogen bonds.

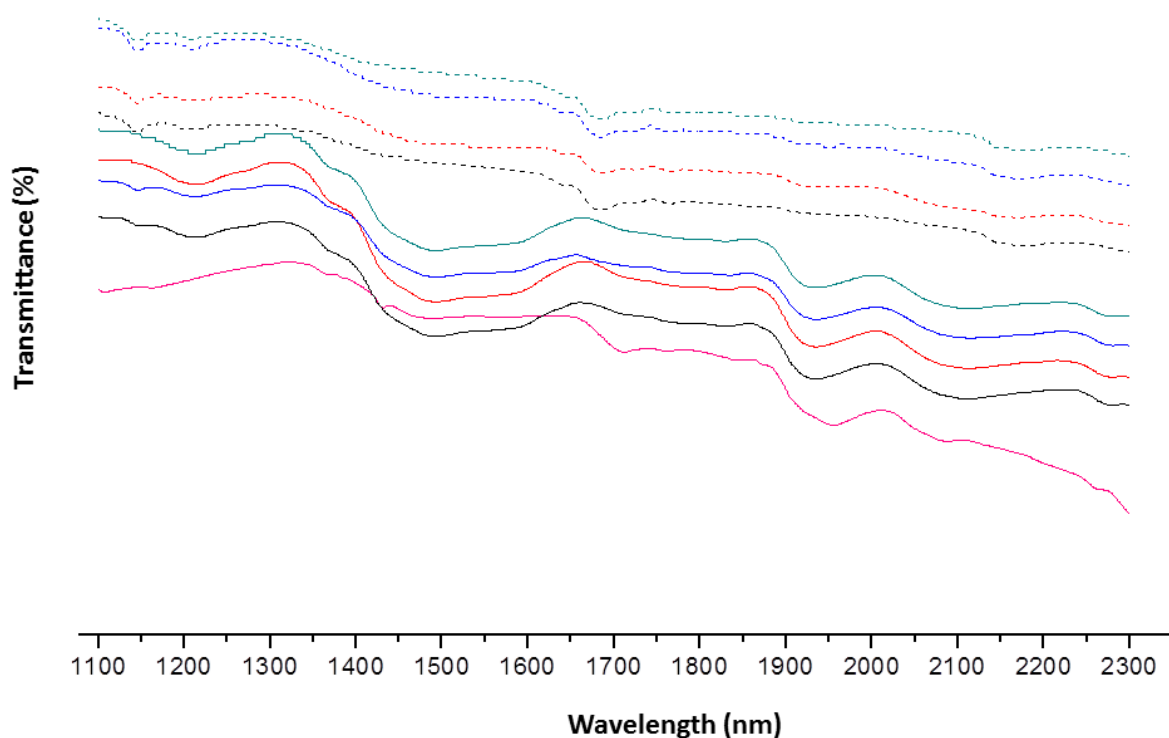


Figure 4: NIR spectra of unprocessed drug and AmB coated pellets before aging (solid line) and after aging (dash line). Key: unprocessed AmB (pink line), formulation A1 (black line), formulation A2 (red line), formulation B1 (blue line), formulation B2 (green line).

Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry

The reverse heat flow signal of the thermograms showed differences between the temperature of glass transition (t_g) of the two binders onto the same MCC beads. PVPK90 formulations showed a t_g at 94.8°C and HPMCAS ones exhibited a t_g at 116.9°C. No evidence of glass transition was found in any of formulations with Eudragit layer (A2 and B2). Also, A2 and B2 formulations showed the AmB melting point (200 °C) (Supplementary Fig.S1).

3.3. Dissolution Studies

A minimal release (< 1% /min) was observed in all the AmB coated pellet formulations until the pH was shifted to 6.8, which is an advantage considering that AmB degrades quickly in acidic environments (Fig. 5). The AmB coated pellets exhibited a significantly greater drug release ($p < 0.05$) than unprocessed AmB (between 3.5-5 fold higher depending on the formulation) at 6 h. The formulation with the faster dissolution profile was A2. This might be due to the presence of PVPK90 as a binder instead of HPMCAS considering that the latter has

a dissolution profile pH dependent due to its carboxyl groups [20, 21]. Surprisingly, the coated formulations with Eudragit L-100 (A2 and B2) showed a greater drug release than the A1 and B1 respectively which can be linked to the porous structure observed by SEM.

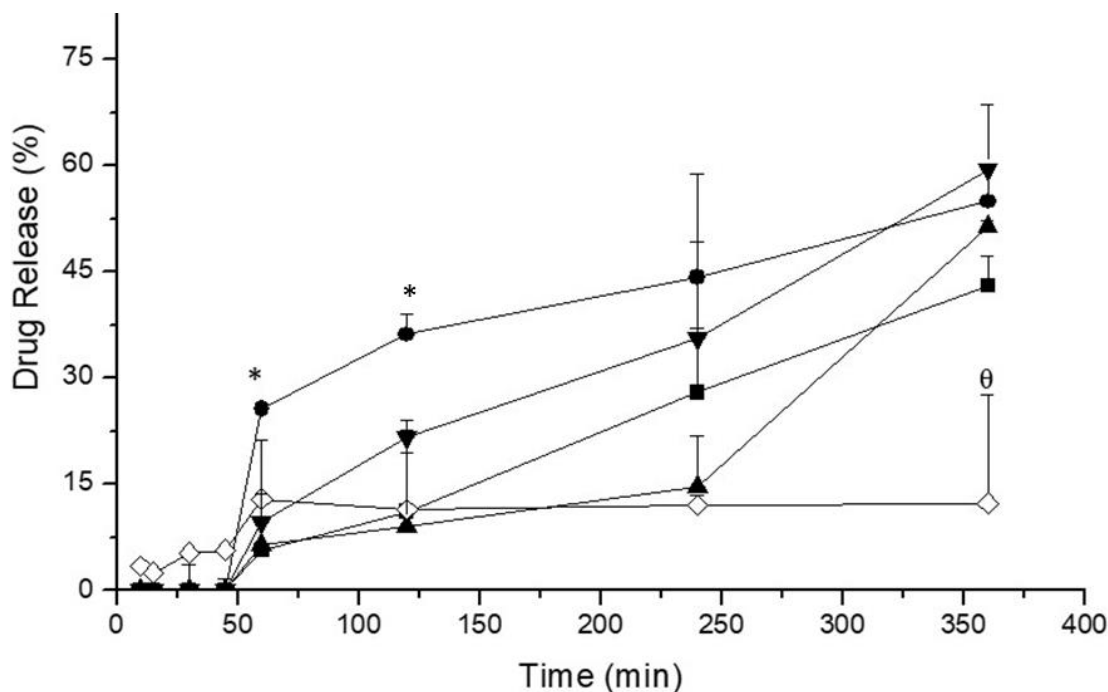


Figure 5: Release profile of AmB coated pellets formulations and raw AmB at pH 1.2 (first hour) and at pH 6.8 (following 5 h). Key: -■- A1; -●- A2; -▲- B1; -▼- B2; -◇- raw AmB. Statically significant differences * = $p < 0.05$ between A2 and the rest of formulations and ^θ = $p < 0.05$ versus unprocessed AmB.

3.4. *In vitro* Candida Activity

All the formulations exhibited 100% inhibition at the highest tested concentration (30 pellets equivalent to $37\mu\text{g/ml}$ of AmB). The IC_{50} of the four formulations was ranging between 5 and $10\mu\text{g/ml}$, being A2 and B2 the most active ones with lower IC_{50} probably linked to their faster release in aqueous media (Table 3). However, AmB dissolved in DMSO was the most active with an IC_{50} : $0.48 \pm 0.12\mu\text{g/ml}$.

3.5. *Ex vivo* toxicity on RBCs

All AmB coated pellets exhibited a much lower toxicity (between 11 to 26 fold less) on RBCs than the drug dissolved in DMSO. It is worthy to highlight that A1 and B1 were almost 2-fold more haemolytic than A2 and B2 respectively, even though the latter exhibited a faster drug release (Table 3 and Figure S2 in Supplementary material). The lesser toxicity of the A2 and B2 formulations might be due to the presence of Eudragit L-100 (a negatively charged

polymer) which can interact with the AmB and hence, this can hamper the interaction of the AmB with the RBCs membrane. The selectivity index of A1 and B1 was similar to the AmB dissolved in DMSO. Nevertheless, A2 and B2 demonstrated to be a safer formulations with 2 and 3-fold higher selectivity indices than A1 and B1 respectively.

Formulation	HC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	SI (HC ₅₀ /IC ₅₀)
A1	141.81 ± 0.81	5.92 ± 1.33	23.96 ± 0.61
A2	226.43 ± 0.75	5.09 ± 0.81	44.51 ± 0.93
B1	181.25 ± 1.73	9.97 ± 1.25	18.19 ± 0.85
B2	338.01 ± 1.21	5.53 ± 1.93	61.22 ± 0.65
AmB in DMSO	12.87 ± 0.84	0.48 ± 0.11	26.8 ± 0.76

Table 3: *In vitro* Candida efficacy and *ex vivo* toxicity on red blood cells. Key: HC₅₀, AmB concentration required to produce 50% haemolysis; IC₅₀, AmB concentration that produces 50% inhibition growth. Selectivity index (SI) was calculated as the ratio between the HC₅₀ and the IC₅₀.

3.6. Stability Studies

The degradation profile of all formulations showed a more prominent decrease in potency at higher temperatures (70 and 80°C) and higher RH (Supplementary Fig S4).

The degradation model that overall exhibited the highest average R² at all the conditions tested was considered as the most suitable to predict the long-term stability for each formulation (Supplementary Table S1-S4).

The kinetic profile of A1 and B1 AmB pellet formulation was diffusion kinetic profile. However, A2 and B2 AmB pellet formulation followed the first order kinetic profile.

The degradation rates (K) was also calculated from the slope of each equation. This parameter was later employed in the Arrhenius equation.

The desiccated conditions (10% RH) were analysed separately from the ones with a higher RH value and the following formula was used to calculate the B values (Eq. 3).

$$B(RH) = \frac{\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right)}{RH_1 - RH_2} \quad (Eq. 3)$$

This was important in order to determine the influence of the relative humidity on the chemical stability of the formulations. The LnK values were plotted against 1/T. Linear regression was used to calculate the equation that correlated LnK and 1/T and from the slope of the equation it was calculated the E_a.

Formulation	Degradation reaction	E _a (kcal/mol)	B	R ²
A1	Diffusion	18.52 ± 3.02	0.007 ± 0.002	0.941 ± 0.256
A2	1 st order	24.13 ± 2.78	0.046 ± 0.010	0.989 ± 0.428
B1	Diffusion	23.38 ± 1.94	0.017 ± 0.015	0.975 ± 0.394
B2	1 st order	18.30 ± 3.43	0.009 ± 0.006	0.983 ± 0.277

Table 4: Stability parameters: kinetic order of degradation reaction, activation energy and sensitivity moisture factor of the AmB coated pellets.

The activation energy (E_a) of all the formulations shows that they are stable formulations without significant differences between them and the B terms were very low showed the small impact of RH in the chemical stability of the formulations.

The formulation B2 exhibited lower B value than A2, as expected from the lower susceptibility to RH of the formulations with HPMCAS (Table 4).

Once the parameters of the modified Arrhenius equation were calculated, the prediction of chemical stability at long term conditions (6 and 24 months at 4 °C and 10% RH) was estimated. The long term stability results showed that the predicted chemical stability of the drug in all the AmB pellet formulations in a conservative manner was overestimated against the experimental data. This results lead that the followed AmB degradation kinetics were the predicted models of each formulation and the AmB doses values of all the formulation was at least the predicted ones.

3.6. After-aging studies

Dissolution studies after aging

As before aging, the formulation with the best dissolution profile was A2. The statistical difference (p<0.05) appeared in the AmB raw and the AmB pellet formulations after aging (Fig.6).

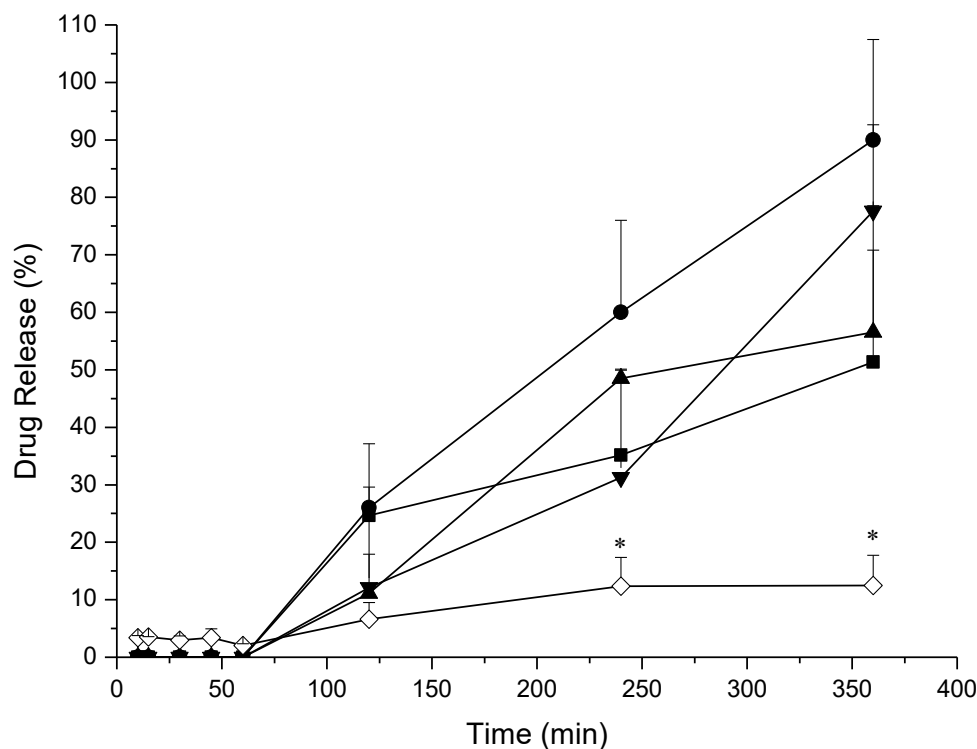


Figure 6. Release profile of AmB coated pellets formulations and raw AmB after aging at pH 1.2 the first 60 min and at pH 6.8 until 6 hours. Key: -■- A1; -●- A2; -▲- B1; -▼- B2; -◇- raw AmB. Statically significant differences * = $p < 0.05$ between raw AmB and the rest of formulations.

In vitro Candida Activity after aging

After aging, all the formulations (except A2) were more effective (reduction in the IC_{50} ranging from 3.5-9.6) considering that larger amounts of AmB are released from the pellets (Table 5).

Ex vivo Red Blood Cell toxicity after aging

After aging, B2 was the least haemolytic formulation at the highest concentration tested while the A1 was the most toxic formulation (Supplementary Fig S3).

Overall, the selectivity index of all the formulations (except A2) after aging was even greater than before aging and hence, it can be concluded that the impact of aging will potentially not lead to formulations with higher risk for patients.

Formulation	HC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	HC ₅₀ /IC ₅₀
A1	137.94 ± 0.8	1.52 ± 1.1	90.84 ± 0.9
A2	217.23 ± 1.2	6.37 ± 0.7	34.09 ± 1.2
B1	134.10 ± 1.5	1.03 ± 1.2	129.59 ± 1.8
B2	232.84 ± 0.6	1.58 ± 1.4	147.76 ± 2.2

Table 5: HC₅₀, IC₅₀ values and therapeutic index for the four AmB pellet formulations after aging.

Near-IR after aging

These peaks are still present after aging, but with a reduced transmittance which can be due to the destabilisation of the amorphous matrix and hence, the weaker interaction between the AmB and the other two excipients (See Fig.4).

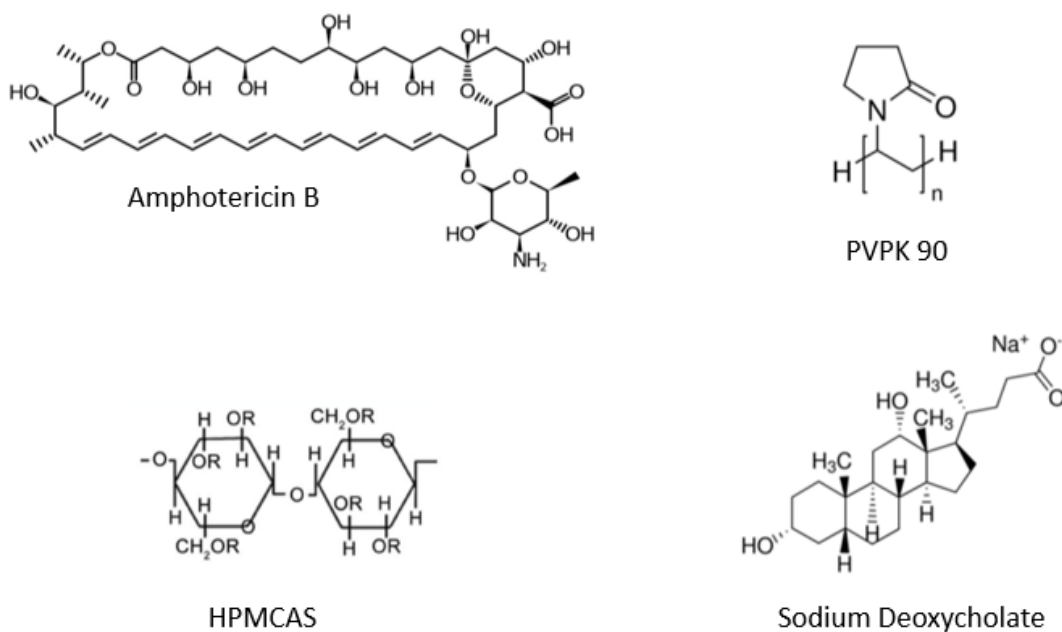


Figure 7. Chemical structure of the four components (API and excipients) of the pellets coating layer.

4 Discussion

The development of AmB coated pellets formulations resulted a successful method to enhance AmB oral delivery and to improve the cost-effectiveness balance of other AmB marketed formulations.

Four optimised formulation were developed (A1, A2, B1 and B2) with the common bead's material of MCC and different AmB coating layers with PVPK 90 (A1 and A2) or HPMCAS (B1 and B2) as binders which led formulations different referable properties. From the SEM micrographs, it was observed that the granules containing HPMCAS as a binder had a harder, less porous surface, compared to the ones that contained PVP K90. Despite the DVS results showed that the four AmB formulations, as consequence of the coating the beads became more stable to changes of relative humidity (12% increase in mass) the lower susceptibility to RH of the formulations with HPMCAS as binder (B1 and B2) led the formulations an improvement in stability. The DSC thermographs also showed a better physical stability at high temperature conditions of formulations with HPMCAS as binder than PVP K90 ones.

Bearing in mind that AmB solubility is greater at extreme pH (both acidic and basic) and this is associated with quicker degradation in solution the fact that the pellets hinder the release in acid media makes them a suitable formulation for the oral delivery of AmB [22]. The ability of the NaDoc to self-assembly and form micelles in aqueous media, facilitates the solubilisation of the AmB upon release from the coated layer potentially enhancing its oral bioavailability [23]. The interaction between AmB and NaDoc is well described, and actually Fungizone[®], the first commercially AmB formulation, consists on micelles formed in a 2:1 NaDoc: AmB molar ratio [24]. The same ratio has been kept during the spray coating process to ensure drug solubilisation at intestinal pH. In addition, NaDoc, which is a biliar salt component can bind to other bile salts presence in the GIT facilitating AmB oral absorption [25] and hence the effectiveness against visceral leishmaniasis or systemic fungal infections [14, 26].

The second layer with Eudragit L-100 in formulations A2 and B2 led them a greater drug release results than the other two formulations. However, all the AmB formulations displayed a delayed release profile over a 6h period at pH 6.8. The release was highly pH dependent and it showed almost no release at a pH of 1.2. The lack of drug release in acid media is caused by the presence of NaDoc in the four developed formulation, which has a very low solubility in those conditions but also due to the interaction with the polymers whose solubility is also pH dependent especially for the HPMCAS and the Eudragit L100 formulations.

The formulation with the best dissolution profile was A2, followed by B2, B1 and A1 at 6 h. The Eudragit coating layer conferred the pellets a porous surface, which facilitated the wettability and the interaction between the drug and the media. And in this case, the difference in binder influenced the amount of drug released over time, as the formulations with HPMCAS showed a slower release at pH 6.8 at earlier times [27].

All the formulations exhibited an improved dissolution rate compared to the unprocessed AmB. The co-amorphous coating systems development by spray coating technique resulted an advantage method to improve the dissolution profile and therefore the oral administration of poorly water- soluble drugs such as AmB. A co-amorphous system is made up of an API (AmB) and another molecule or polymer, which are connected to each other by hydrogen bonds and Vanderwaal hydrophobic interactions, easily dissociable in the media. These interactions between drug and excipients were confirmed by NIR and the band shifts observed in the formulations compared to the unprocessed AmB. After the dissociation, the polymer is drawn out of the amorphous matrix in the buffer and the media becomes supersaturated with the AmB molecules. The supersaturation was maintained due to the use of NaDoC and the formation of micelles in the aqueous media keeping the drug solubilised and preventing it from aggregation and precipitation facilitating its absorption for longer periods of time [19, 24]. The formation of stable co-amorphous systems is critical during storage and transportation to avoid drug recrystallization [28].

From previous studies, it has been established that the aggregation state of the AmB as well as the excipients used for the final formulation play an important role in the toxicity profile of the drug [22]. Upon the interaction in aqueous media between AmB and NaDoc, the dimeric aggregation state is present in solution [29]. A reduction in the haemolysis can be attributed to the slower release of the AmB- NaDoc micelles from the solid cores as well as due to secondary interactions with the other polymers in the formulation especially Eudragit hindering the contact with the RBCs and reducing the overall haemolytic effect of the dimeric AmB [15, 30, 31].

The AmB pellets formulation B2 showed the lowest haemolytic toxicity (HC_{50} of 338 $\mu\text{g/ml}$) and this is because of the anionic structure of the HPMCAS and Eudragit L-100 as well as their behaviour of entrapping the AmB- NaDoc micelles better than the PVP, leading to less contact with the erythrocytes [32]. In addition, the previously shown synergic effect between NaDoc and HPMCAS, even at very low concentrations leads to the formation of a polymer surfactant with polyelectrolyte behaviour [33]. The lower surface tension area and an uncoil and spread

of the polymer at the surface are derivatives thereof. As NaDoc is haemolytic by itself, this can explain the reduction of toxicity on the RBCs [34].

According to the IC₅₀ values there was no significant difference between A1, A2 and B2. The only one with a higher value was B1 and this can be attributed to a lower dissolution profile than the rest, allowing *Candida* to grow more before the drug is solubilised up to a concentration in solution that can inhibit the growth of the microorganism.

As an overall summary, the selectivity index for all the formulation is high enough (ranging from 18-62) to be able to be administered safely, as a good safety profile is considered to be one with a therapeutic index (TI) greater than 10 [2]. In this research an innovative oral delivery formulation of AmB (B2) has been developed, with improved solubility and bioavailability, and reduced haemotoxicity.

AmB is a thermolabile drug, easily affected by environmental factors, hence AmB formulations required strict controlled storage conditions (2-8 °C protected from humidity, air and light). The autoxidation of the carbon-carbon double bonds of the polyene moiety is the main consequence of this molecule instability. Other possible degradation pathways are hydrolysis of the lactone functionality and/or hydrolysis of the amino sugar [35]. It is worthy of notice that the developed AmB pellet formulations coated with a second layer (Eudragit) followed a different degradation kinetic (first order kinetic) than A1 and B1 (diffusion kinetic). This could be related to the Eudragit acts as a barrier regulating down the permeability to water molecules from the environment resulting in systems with higher activation energy and therefore, greater chemical stability [9]. A2 required the highest amount of energy for the degradation to start followed by A1, B1 and B2.

The generated models were able to predict AmB degradation in a conservative manner compared with the long term stabilities studies, showing an overestimation of the degradation rate (from 11% to 18% over 2, 4 months, at 4 °C and 11% RH for A1). Overall, conservative predictive models are considered less risky and hence more suitable for the development studies compared to other models that underestimate the degradation levels and can potentially lead to an unviable formulation at later stages [9].

Bearing in mind the fact that these formulations are intended for oral delivery, a capsule shell should be chosen for the drug that would allow appropriate targeting and release. As the pellets are highly electrostatic, the filling method of the capsules should be taken into account as this directly impacts on the manufacturing process. Once the final formulation is established, the

tests can move on to deciding on the most suitable packaging and storage condition to maintain the drug stable.

5 Conclusions

An overall improvement in the physico-chemical properties of the AmB have been achieved upon formulations by spray coating technique with appropriate excipients, making it suitable for the development of oral formulations. The APS studies have allowed the development of predictive stability models able to guide future development and selection of stable formulations. The development of a stable AmB oral formulation would further improve patient adherence, but also will help the treatment of patients from developing countries, where the prevalence of diseases caused by microorganisms, such as parasites and fungi is much higher, and hospitalisation might not be available.

From the four developed AmB pellet formulations, the one that include a good stability profile, but also with the highest therapeutic index was B2 (AmB-NaDoc-HPMCAS and Eudragit L-100) with a suitable sustained drug release in physiological media (>50% at 6h), making it the best candidate for further tests and initiations of clinical trials.

6 Supplementary Material:

Figure S1: DSC modulated thermograms. Key: **Heat Flow (W/g):—** and **Rev Heat Flow (W/g) thermograms** **a1 and b1)** A1 pellet formulation; **a2 and b2)** A2 pellet formulation; **a3 and b3)** B1 pellet formulation and **a4 and b4)** B2 pellet formulation.

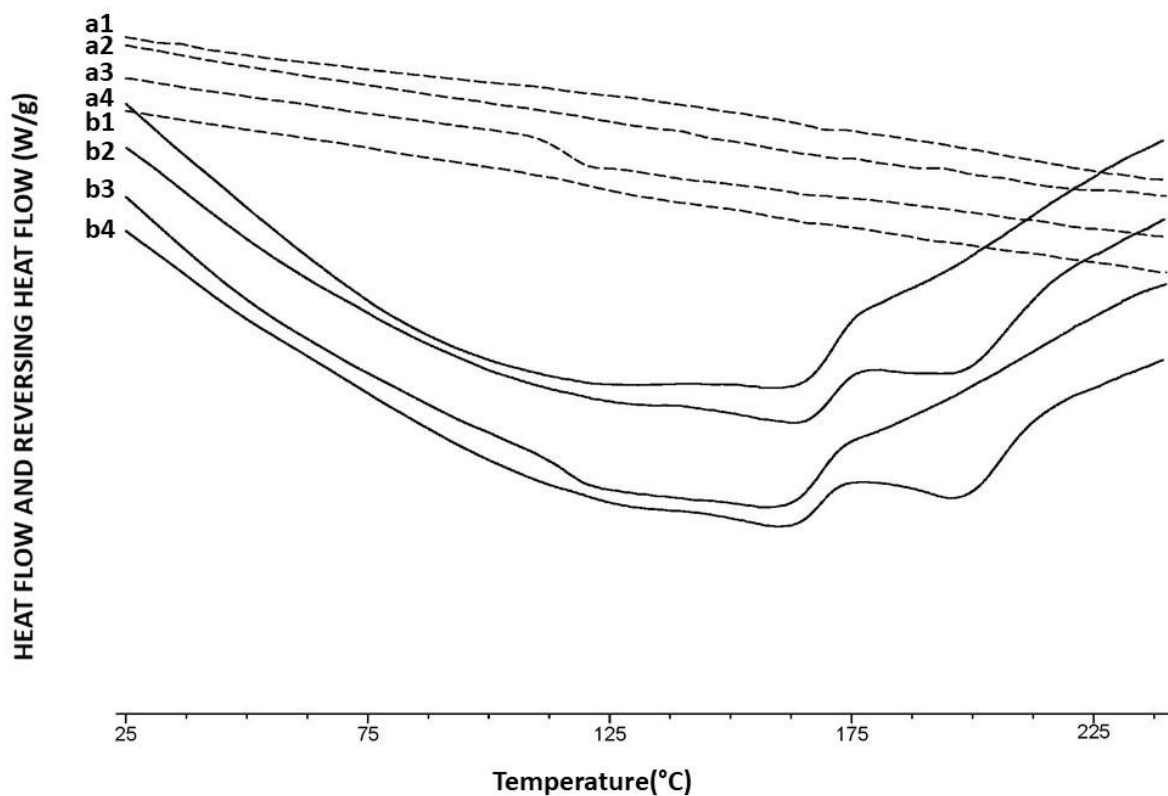


Figure S2: Haemolysis (%) profile for A1, B1, A2 and B2 formulations. Key: -■- A1; -●- A2; -▲- B1 and -▼- B2.

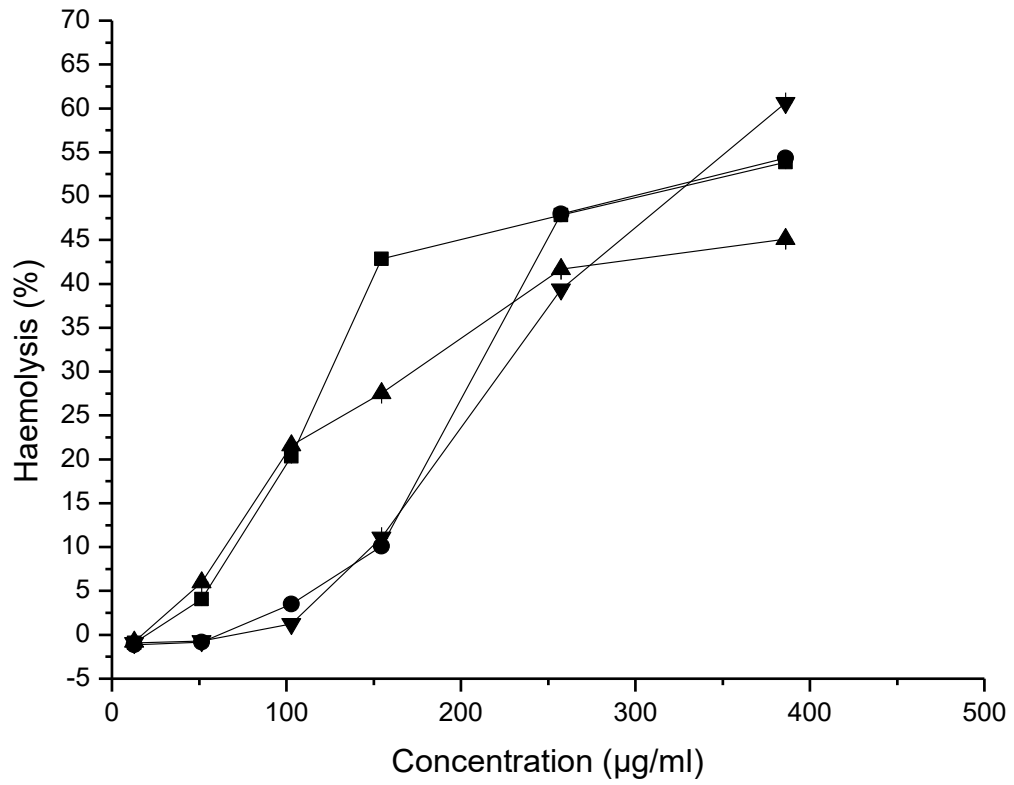


Figure S3: Haemolysis (%) profile for A1, B1, A2 and B2 formulations after aging. Key: -
■- A1; -●- A2; -▲- B1 and -▼- B2.

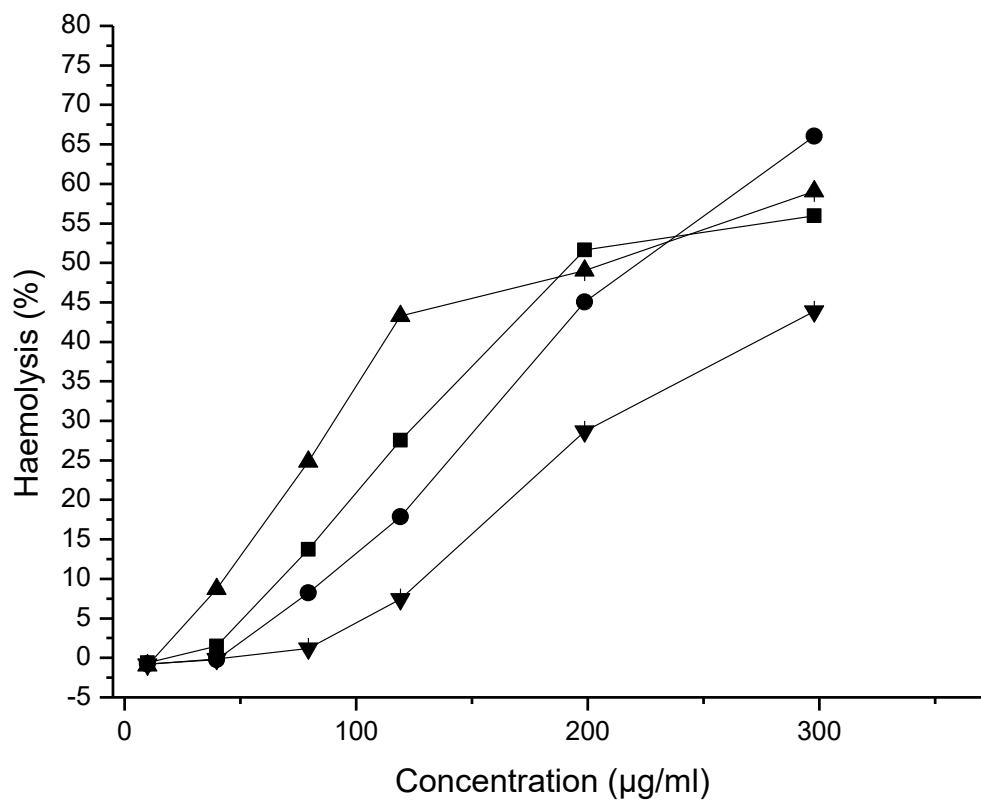


Figure S4: Degradation profile of AmB pellet formulations at different conditions of temperature and relative humidity.

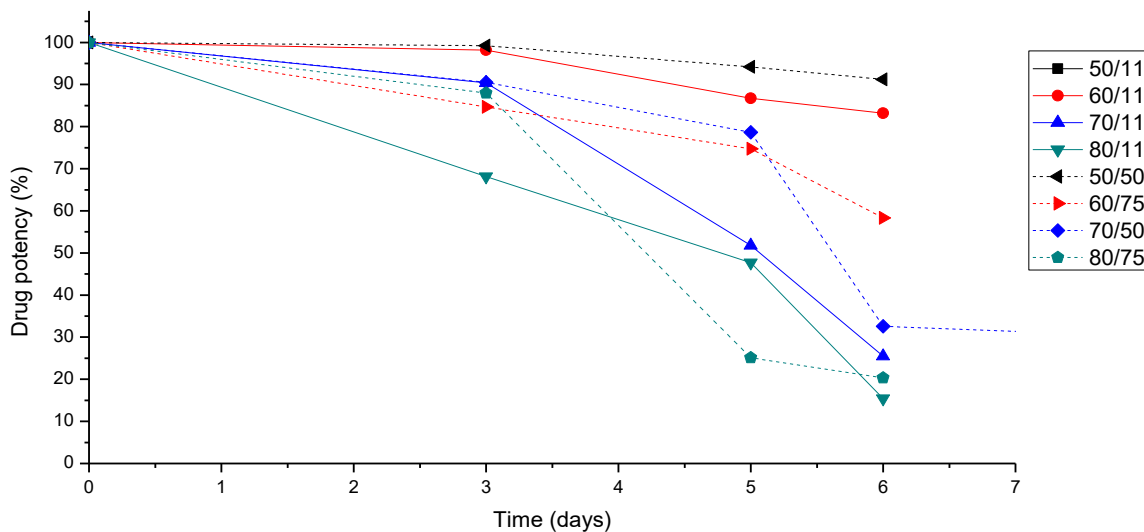


Table S1: Fitting of different kinetic orders of degradation reaction for formulation A1. The fitting to each degradation reaction is represented by R².

Temp (C°)/RH (%)	R ² (Zero order)	R ² (1 st order)	R ² (2 nd order)	R ² (Avrami)	R ² (Diffusion)
80/11	0.998	0.957	0.897	0.966	0.982
70/11	0.964	0.999	0.977	0.974	0.989
60/11	0.822	0.834	0.847	0.862	0.885
50/11	0.848	0.856	0.864	0.838	0.909
Averaged R²	0.901	0.923	0.896	0.9101	0.941

Table S2: Fitting of different kinetic orders of degradation reaction for formulation A2. The fitting to each degradation reaction is represented by R².

Temp (C°)/RH (%)	R ² (Zero order)	R ² (1 st order)	R ² (2 nd order)	R ² (Avrami)	R ² (Diffusion)
80/11	0.9722	0.9978	0.995	0.995	0.9934
70/11	0.9857	0.9996	0.978	0.9712	0.9989
60/11	0.9461	0.9598	0.9534	0.95	0.969
50/11	0.9994	0.9992	0.9989	0.9957	0.986
Averaged R ²	0.9759	0.9891	0.9813	0.9780	0.9868

Table S3: Fitting of different kinetic orders of degradation reaction for formulation B1. The fitting to each degradation reaction is represented by R².

Temp (C°)/RH (%)	R ² (Zero order)	R ² (1 st order)	R ² (2 nd order)	R ² (Avrami)	R ² (Diffusion)
80/11	0.9102	0.9927	0.982	0.9731	0.9532
70/11	0.9884	0.9999	0.9925	0.9729	0.9995
60/11	0.9988	1	0.9995	0.971	0.997
50/11	0.8886	0.8996	0.9102	0.8801	0.9507
Averaged R ²	0.9465	0.9731	0.9711	0.9493	0.9751

Table S4: Fitting of different kinetic orders of degradation reaction for formulation B2. The fitting to each degradation reaction is represented by R².

Temp (C°)/RH (%)	R ² (Zero order)	R ² (1 st order)	R ² (2 nd order)	R ² (Avrami)	R ² (Diffusion)
80/11	0.9626	0.9994	0.9817	0.9973	0.9883
70/11	0.9758	0.9953	0.9996	0.9989	0.9951
60/11	0.9989	0.9958	0.991	0.9962	0.9851
50/11	0.9169	0.9425	0.9298	0.9324	0.9613
Averaged R ²	0.9636	0.9833	0.9755	0.9812	0.9825

7 References

1. Torrado, J.J., et al., *Amphotericin B formulations and drug targeting*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(7): p. 2405-2425.
2. Tamargo, J., J.Y. Le Heuzey, and P. Mabo, *Narrow therapeutic index drugs: a clinical pharmacological consideration to flecainide*. Eur J Clin Pharmacol, 2015. **71**(5): p. 549-67.
3. Grazziotin, L.R., L.B. Moreira, and M.A.P. Ferreira, *Comparative effectiveness and safety between amphotericin b lipid-formulations: a systematic review*. International Journal of Technology Assessment in Health Care, 2018. **34**(3): p. 343-351.
4. Torrado, J.J., D.R. Serrano, and I.F. Uchegbu, *The oral delivery of amphotericin B*. Ther Deliv, 2013. **4**(1): p. 9-12.
5. Fernandez-Garcia, R., et al., *Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: The role of amphotericin B and drug targeting*. Int J Pharm, 2017. **525**(1): p. 139-148.
6. Serrano, D.R., et al., *Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations*. Int J Pharm, 2013. **447**(1-2): p. 38-46.
7. Bolard, J., *Mechanism of Action of an Anti-Candida Drug: Amphotericin B and Its Derivatives*. 1991. p. 214-238.
8. Hamill, R.J., *Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity*. Drugs, 2013. **73**(9): p. 919-34.
9. Waterman, K.C., *The application of the Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) to quality by design (QbD) for drug product stability*. AAPS PharmSciTech, 2011. **12**(3): p. 932-7.
10. Serrano, D.R., et al., *Optimising the in vitro and in vivo performance of oral cocrystal formulations via spray coating*. Eur J Pharm Biopharm, 2018. **124**: p. 13-27.
11. Rolon, M., et al., *Engineering Oral and Parenteral Amorphous Amphotericin B Formulations against Experimental Trypanosoma cruzi Infections*. Mol Pharm, 2017. **14**(4): p. 1095-1106.
12. Curtin, V., et al., *Reducing mechanical activation-induced amorphisation of salbutamol sulphate by co-processing with selected carboxylic acids*. Int J Pharm, 2013. **456**(2): p. 508-16.
13. Grossjohann, C., et al., *Polymorphism in sulfadimidine/4-aminosalicylic acid cocrystals: solid-state characterization and physicochemical properties*. J Pharm Sci, 2015. **104**(4): p. 1385-98.
14. Ruiz, H.K., et al., *New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and Leishmania spp*. Int J Pharm, 2014. **473**(1-2): p. 148-57.
15. Zelko, R., et al., *Effect of plasticizer on the dynamic surface tension and the free volume of Eudragit systems*. Int J Pharm, 2002. **244**(1-2): p. 81-6.
16. Serrano, D.R., et al., *Cocrystal habit engineering to improve drug dissolution and alter derived powder properties*. J Pharm Pharmacol, 2016. **68**(5): p. 665-77.

17. Jullien, S., et al., *Study of the effects of liposomal amphotericin B on Candida albicans, Cryptococcus neoformans, and erythrocytes by using small unilamellar vesicles prepared from saturated phospholipids*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1989. **33**(3): p. 345-349.
18. Pereira Damasceno Lima, M., et al., *Technological development of microemulsions with perspectives for pain treatment: a patent review*. Vol. 28. 2018.
19. Chang, Y., Y.-H. Wang, and C. Hu, *Simultaneous determination of purity and potency of amphotericin B by HPLC*. Vol. 64. 2011. 735-9.
20. Goyanes, A., et al., *Development of modified release 3D printed tablets (printlets) with pharmaceutical excipients using additive manufacturing*. Int J Pharm, 2017. **527**(1-2): p. 21-30.
21. Zecevic, D.E., et al., *Site specific solubility improvement using solid dispersions of HPMC-AS/HPC SSL--mixtures*. Eur J Pharm Biopharm, 2014. **87**(2): p. 264-70.
22. Selvam, S. and A. Mishra, *Disaggregation of amphotericin B by sodium deoxycholate micellar aggregates*. Vol. 93. 2008. 66-70.
23. Yu, B.G., et al., *Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B*. J Control Release, 1998. **53**(1-3): p. 131-6.
24. Kagan, L., et al., *Physiologically based pharmacokinetic model of amphotericin B disposition in rats following administration of deoxycholate formulation (Fungizone(R)): pooled analysis of published data*. AAPS J, 2011. **13**(2): p. 255-64.
25. Serrano, D.R., et al., *Oral Particle Uptake and Organ Targeting Drives the Activity of Amphotericin B Nanoparticles*. Molecular Pharmaceutics, 2015. **12**(2): p. 420-431.
26. Moreno-Rodriguez, A.C., et al., *Efficacy and toxicity evaluation of new amphotericin B micelle systems for brain fungal infections*. Int J Pharm, 2015. **494**(1): p. 17-22.
27. Thomas, D.C. and S.D. Christian, *Micellar and surface behavior of sodium deoxycholate characterized by surface tension and ellipsometric methods*. Journal of Colloid and Interface Science, 1980. **78**(2): p. 466-478.
28. Sun, D.D. and P.I. Lee, *Evolution of Supersaturation of Amorphous Pharmaceuticals: The Effect of Rate of Supersaturation Generation*. Molecular Pharmaceutics, 2013. **10**(11): p. 4330-4346.
29. Umegawa, Y., et al., *Possible conformation of amphotericin B dimer in membrane-bound assembly as deduced from solid-state NMR*. Bioorg Med Chem, 2012. **20**(19): p. 5699-704.
30. Chudzik, B., et al., *Amphotericin B-copper(II) complex shows improved therapeutic index in vitro*. Vol. 97. 2016.
31. Fung, Y.C. and P. Tong, *Theory of the sphering of red blood cells*. Biophysical journal, 1968. **8**(2): p. 175-198.
32. Mukherjee, K., A. Barman, and R. Biswas, *Impact of the aggregation behaviour of sodium cholate and sodium deoxycholate on aqueous solution structure and dynamics: A combined time resolved fluorescence and dielectric relaxation spectroscopic study*. Journal of Molecular Liquids, 2016. **222**: p. 495-502.

33. Avranas, A. and V.V. Tasopoulos, *Aqueous Solutions of Sodium Deoxycholate and Hydroxypropylmethylcellulose: Dynamic Surface Tension Measurements*. *J Colloid Interface Sci*, 2000. **221**(2): p. 223-229.
34. Espada, R., et al., *Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations*. *Int J Pharm*, 2008. **361**(1-2): p. 64-9.
35. Gomez-Bombarelli, R., E. Calle, and J. Casado, *Mechanisms of lactone hydrolysis in neutral and alkaline conditions*. *J Org Chem*, 2013. **78**(14): p. 6868-79.

Resumen del Capítulo 1:

El objetivo de este trabajo fue desarrollar nuevas formulaciones orales de AmB y evaluar el perfil de actividad/toxicidad de las mismas. Al mismo tiempo, se busca conseguir unas formulaciones de fácil preparación, eficaces, que sean estables en las condiciones ambientales de almacenaje y que supongan una ventaja desde el punto de vista económico. Para el desarrollo de estas formulaciones se llevó a cabo el recubrimiento de pellets de celulosa microcristalina (MCC) con formulaciones líquidas micelares de AmB utilizando un lecho fluido (Fig.1).

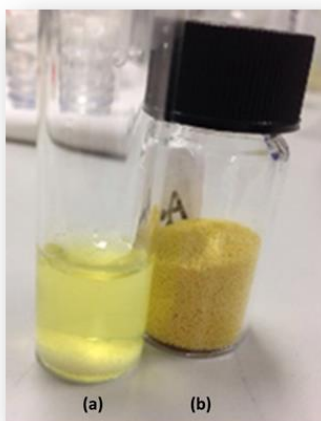


Figura 1: (a) Aspecto de las soluciones micelares de AmB y (b) aspecto de las formulaciones de pellets recubiertos de AmB.

Las formulaciones líquidas micelares de AmB tienen desoxicolato sódico (NaDoc) como excipiente solubilizante, cuyo uso está avalado por estudios que demuestran la formación de micelas capaces de encapsular y disolver la AmB en una proporción molar NaDoc: AmB de 2:1 [22]. Asimismo, el NaDoc es un componente de las sales biliares que podría facilitar la absorción gastrointestinal de la AmB al unirse a las sales biliares presentes en el TGI [23], lo que potenciaría la eficacia de estas formulaciones frente a

infecciones fúngicas sistémicas o leishmaniasis visceral [14, 24]. Además, estas formulaciones tienen dos tipos distintos de excipiente aglutinante: Hidroxi propil metil celulosa acetato succinato (HPMC AS) y Polivinil pirrolidona K90 (PVP K90).

Los parámetros del proceso de recubrimiento de pellets mediante lecho fluido (velocidad de nebulización, la velocidad del flujo de nitrógeno, la presión del aire de nebulización y la temperatura de entrada), se mantuvieron constantes durante todas las fases del mismo, garantizando una encapsulación eficiente del fármaco.

Como consecuencia del recubrimiento de pellets de MCC, se obtuvieron cuatro formulaciones distintas (A1, A2, B1 y B2), cuyas diferencias se detallan a continuación:

- Las formulaciones A1 y A2 tienen PVPK90 como aglutinante de la solución micelar de recubrimiento, mientras que las formulaciones B1 y B2 tienen HPMC AS como aglutinante.
- Además, las formulaciones A2 y B2 presentan una segunda capa de recubrimiento con el polímero Eudragit L-100, excipiente entérico para la liberación retardada. Este paso se realizó en una segunda fase del proceso de recubrimiento con el fin de estudiar el posible impacto en las propiedades fisicoquímicas de la formulación final.

Tras la caracterización fisicoquímica de las cuatro formulaciones de pellets de AmB, se ha determinado que, gracias al recubrimiento de los pellets, se consigue desarrollar un sistema coamorfo entre el NaDoc y el aglutinante. Este sistema favorecería la disolución de la AmB en medio acuoso y mejoraría su biodisponibilidad, lo que no se ha conseguido hasta ahora con ninguna de las formulaciones de AmB autorizadas para su comercialización.

Los sistemas coamorfos están formados por un principio activo y otra molécula o polímero, los cuales están conectados entre sí por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas de Vanderwaals, que son fácilmente dissociables en medios acuosos [20,

26]. La existencia de estas interacciones entre el principio activo y los excipientes han sido confirmadas mediante infrarrojo al comparar los cambios de banda observados en estas formulaciones con respecto a la AmB sin procesar.

Los estudios de velocidad de disolución de estas formulaciones han revelado que, gracias a la selección adecuada de excipientes, se consigue una liberación retardada del fármaco altamente dependiente del pH que consigue evitar la degradación de AmB en medios ácidos [20].

En relación con los estudios de la actividad *in vitro* y toxicidad *ex vivo*, se han evaluado los índices de selectividad de todas las formulaciones desarrolladas, entendido como la relación entre la concentración citotóxica que reduce la cantidad de glóbulos rojos al 50%-y la concentración que causa un 50% de inhibición del crecimiento de *Candida spp* (CC50/CI50) [2]. De los resultados se deduce que se ha conseguido mantener la actividad del principio activo y reducir su toxicidad con respecto a la formulación de AmB convencional. Por lo tanto, las cuatro formulaciones son adecuadas para el desarrollo de medicamentos antifúngicos orales eficaces y con un buen perfil de seguridad.

El sistema coamorfo podría limitar la estabilidad química del fármaco, y, además la AmB es un principio activo termolábil, con alta inestabilidad química debido a la autooxidación de los dobles enlaces carbono-carbono de la fracción poliénica de la molécula, así como la hidrólisis del grupo funcional lactona y/o la hidrólisis del aminoazúcar [33]. Es por estos motivos por los que se han llevado a cabo estudios de estabilidad (estabilidad acelerada y estabilidad a largo plazo). En estos estudios se han evaluado diferentes modelos de ajuste cinético para determinar aquel que presenta el mejor valor de coeficiente de determinación (R^2) y que permita establecer la cinética de degradación de cada una de las formulaciones. Las formulaciones que tienen una segunda capa de recubrimiento con Eudragit L-100 (A2 y B2) presentan una cinética de degradación de primer orden, mientras que sus formulaciones análogas (A1 y B1) presentan una cinética de degradación de tipo difusión. Esta diferencia se ve reflejada

en el resto de propiedades estudiadas, tales como la velocidad de disolución, actividad y toxicidad.

Además, para cada tiempo de análisis se ha extrapolado el valor de la energía de activación (E_a) y el valor del factor de humedad de la ecuación de Arrhenius modificada (B), que determina la influencia de la humedad relativa en la estabilidad intrínseca de cada una de las formulaciones. Los valores de E_a de todas las formulaciones demuestran una estabilidad química óptima a largo plazo. Estos resultados están relacionados con la baja permeabilidad al vapor de agua, que manifiestan las curvas de histéresis de los estudios de sorción dinámica de vapor (DVS). Es decir, frente a cambios en la presión de vapor, a una temperatura determinada, las formulaciones experimentan un aumento máximo en masa del 12% en el ciclo de adsorción y vuelven al estado original tras el proceso de desorción. Asimismo, los valores del factor de humedad (B) evidencian un bajo impacto de la HR en las formulaciones de pellets desarrolladas. Además, los termogramas DSC también exhibieron una estabilidad física en condiciones de alta temperatura para las formulaciones que tiene HPMC AS como aglutinante (B1 y B2).

Los modelos identificados en los estudios de estabilidad acelerada han sido capaces de predecir la cinética de degradación de AmB, de forma que se han estimado valores más altos de degradación que los resultados obtenidos en los análisis a largo plazo (una estimación superior al 10% de los valores experimentales). Esto podría considerarse una ventaja en el desarrollo de nuevas formulaciones, ya que la predicción de valores inferiores a los experimentales puede conducir a que las formulaciones no sean válidas en etapas posteriores del desarrollo [9].

Por último, cabe destacar la importancia del estudio de degradación forzada realizado a las cuatro formulaciones de pellets que se sometieron durante 1 semana a 50 °C y 11 % de HR. Tras este periodo, el resultado de potencia de las formulaciones cumple la especificación de > 90 % respecto al estándar, además se ha estudiado la velocidad de disolución, la eficacia y la toxicidad de estas formulaciones, demostrando que no existe ningún cambio significativo en sus propiedades. En el espectro infrarrojo continúan

apareciendo los picos característicos de los grupos funcionales, pero con una transmitancia reducida que puede deberse a la desestabilización de la matriz amorfa y, por lo tanto, a la interacción más débil entre la AmB y los demás excipientes.

Con relación a los resultados de este trabajo se puede destacar lo siguiente:

Los estudios *in vitro* de las cuatro formulaciones desarrolladas de pellets de AmB de administración oral, demostraron que a pH 6,8 se produce una liberación del fármaco más rápida y eficaz (del orden de 3.5 a 5 veces) respecto a la AmB de referencia. Además, se evita la liberación del principio activo en medios ácidos que provocaría su degradación y consiguiente pérdida de efectividad.

La toxicidad hemolítica está inversamente relacionada con la velocidad de liberación del fármaco. Las formulaciones A2 y B2 son menos tóxicas para los glóbulos rojos y liberan más rápido el fármaco que las formulaciones análogas A1 y B1. Esto es debido a la presencia de la segunda capa de recubrimiento con Eudragit L-100, que impide o retrasa la interacción del fármaco con la membrana de los hematíes y, a la vez, aumenta la porosidad de la superficie de los pellets potenciando la liberación del fármaco en medios fisiológicos.

Las cuatro formulaciones desarrolladas de pellets de AmB, poseen una estabilidad química eficaz a largo plazo (> 2 años) en comparación con la AmB de referencia, evitando la degradación del principio activo en medios acuosos, manteniendo su actividad y disminuyendo su toxicidad.

CAPÍTULO 2.

ANFOTERICINA B DE ADMINISTRACIÓN PULMONAR

Design of an Amphotericin B dry powder inhaler formulation for the treatment of pulmonary fungal infections and leishmaniasis - Manipulating solid state form to alter lung deposition and macrophage uptake

E. de Pablo ^a, P. O'Connell ^b, R. Fernández-García ^a, S. Marchand ^{c,d}, A. Chauzy ^c, M.A. Dea-Ayuela ^e, Dinehs Kumar ^f, F. Bolás ^g, M.P. Ballesteros ^{a,h}, J.J. Torrado ^{a,h}, A.M. Healy ^b, D.R. Serrano ^{a, h*}

^a Pharmaceutics and Food Technology Department, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

^b School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland.

^c UMR 1070, Université de PoitiersPôle Biologie Santé, 1 Rue Georges Bonnet, 86073 Poitiers, France.

^d Laboratoire de Toxicologie-Pharmacocinétique. CHU de Poitiers. 2 Rue de la milétrie, 86021 Poitiers, France.

^e Pharmacy Department, School of Life Sciences, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Moncada, 46113 Valencia, Spain.

^f Department of Pharmaceutical Engineering & Technology, Indian Institute of Technology (Banaras Hindu University), Varanasi, India.

^g Parasitology Department, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

^h Instituto Universitario de Farmacia Industrial. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spai

*Corresponding author:

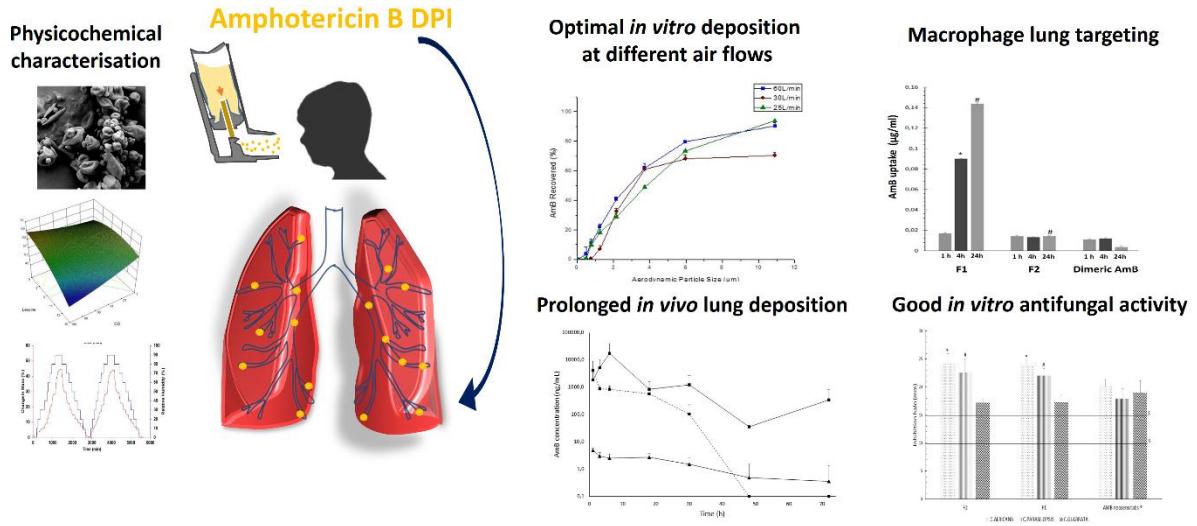
Pharmaceutics and Food Technology Department
School of Pharmacy
Universidad Complutense de Madrid
Plaza Ramon y Cajal s/n
28040-Madrid, Spain.
Email: drserran@ucm.es

Abstract

The incidence of fungal pulmonary infections is known to be on the increase, and yet there is an alarming gap in terms of marketed antifungal therapies that are available for pulmonary administration. Amphotericin B (AmB) is a highly efficient broad-spectrum antifungal, widely used in clinical practice. It is also used in the treatment of disseminated leishmaniasis, where parasites can spread to the lung. However, AmB is currently only marketed as an intravenous formulation. Based on the lack of effective antifungal and antiparasitic pulmonary treatments, the aim of this study was to develop a carbohydrate-based AmB dry powder inhaler (DPI) formulation, prepared by spray drying. A Design of Experiments (DoE) study was performed with a view to understanding the critical formulation and process parameters. Amorphous AmB microparticles (F2 formulation) were developed by combining 39.7% AmB with 39.7% γ -cyclodextrin, 8.1% mannose and 12.5% leucine. An increase in the mannose concentration from 8.1 to 29.8%, led to partial drug crystallisation. The semicrystalline formulation (F1) consisted of 29.8% AmB, 29.8% γ -cyclodextrin, 29.8% mannose and 10.4% leucine. Both F1 and F2 formulations were versatile and considered easily adaptable to suit patients' needs. They showed good *in vitro* lung deposition characteristics (80% FPF < 5 μ m and MMAD < 3 μ m) at different air flow rates (60 and 30 L/min) when used with a DPI, but also during nebulisation upon reconstitution in water, with F1 being less sensitive to air flow rate changes. The reduced haemolytic toxicity of F1 and F2 along with prolonged retention times (> 24 h), and lung concentrations above the IC₅₀ against *Aspergillus* in the respiratory tract after intratracheal *in vivo* administration, demonstrated that AmB DPI can provide a therapeutic advantage compared to other current treatments employed in clinical practice in the treatment of pulmonary fungal infections. A fixed dose combination DPI containing AmB and salbutamol sulphate was also developed for the treatment of fungal pulmonary infections associated with bronchoconstriction, and also showed good *in vitro* deposition characteristics.

Keywords: amphotericin B, pulmonary administration, spray drying, dry powder inhaler, ASAP, amorphous, crystalline.

Graphical abstract



1. Introduction

Every day, we inhale many types of particles that are circulating in the environment, including spores, which are single dormant fungal cells. In immunocompromised, transplant, cancer or HIV patients, these spores can colonize high, medium and low regions of the respiratory tract (RT) causing fungal lung infections [1, 2]. Symptoms of pulmonary fungal infection (such as aspergillosis) are shortness of breath, chest pain, cough, fever, and weight loss. Pulmonary fungal infections are life-threatening due to the high risk of severe pulmonary disease and fungal sepsis [2].

Patients with disseminated leishmaniasis, a disease caused by an intracellular protozoan parasite from genus *Leishmania*, can also suffer from severe pulmonary symptoms such as bilateral pleural effusions specially in those cases where parasites are spread even to the lung contained in alveolar macrophages [3].

Amphotericin B (AmB) is the gold-standard drug currently utilized in the treatment of fungal pulmonary infections and leishmaniasis due to its broad-spectrum activity and low resistance. Its mechanism of action is based on the selective binding to ergosterol present in the cell plasma membranes of fungi and some parasites, such as *Leishmania*. AmB self-assembles on the membrane, forming pores that lead to loss of small cations, particularly K^+ , causing cell death [4]. In spite of its selectivity for ergosterol, AmB can also bind to cholesterol present in mammalian cells causing toxicity, in particular nephrotoxicity, as kidney cell membranes are rich in cholesterol [5].

Formulating AmB is challenging, due to its large molecular weight (924 KDa), low aqueous solubility at physiological pH ($< 1\text{mg/L}$), low membrane permeability ($\log=0.95$) and its zwitterionic and amphiphilic nature associated with an asymmetrical distribution of its hydrophilic and hydrophobic groups [5, 6]. Currently, AmB is only marketed as a lyophilised powder for extemporaneous reconstitution before intravenous administration. The conventional micellar formulation of AmB (Fungizone[®]) was replaced in clinical use by lipid-based medicines (AmBisome[®], Abelcet[®] and Amphocil[®]) due to their improved efficacy/toxicity balance [1, 7].

However, AmB for inhalation use is not authorised anywhere worldwide. On 28 August 2006, orphan designation (EU/3/06/391) was granted by the European Commission to Nektar Therapeutics UK Ltd, United Kingdom, allowing the use of AmB by oral inhalation for the prevention of pulmonary fungal infections in patients deemed at risk (2.2/10,000 estimated people in the EU) [2]. To date, marketed lipid-based AmB intravenous medicines are authorised for the treatment and prophylaxis of pulmonary fungal infections; however, these formulations are not designed for pulmonary administration, and require patient hospitalization in order to reconstitute the formulation appropriately by trained personnel and administer it using a suitable nebulizer apparatus [2].

Today, there are more than 400 different inhaled products marketed in Europe and more than 40 drugs are registered to treat respiratory diseases [8]. Inhaled medications are administered using pressurised metered-dose inhalers (pMDIs), nebulizers or dry powder inhalers (DPIs) and each device requires a different formulation strategy to ensure successful drug delivery into the lung [1, 9].

Overall, DPIs have several advantages over other inhalation devices such as the consistency of the dose delivered to the airways, good deposition efficiency, ease of administration and formulation stability [10]. The main advantage of DPIs over pMDIs is the fact that is not necessary to have hand-breath coordination between the device actuation and patient inhalation [11]. DPIs overcome some disadvantages associated with nebulizers, by lowering the total treatment time, involving easier operational procedures, and lowering overall treatment costs due to better patient compliance, minimal residual drug volumes and better efficiency of drug delivery to the lung [11]. However, one of the limitations of DPI formulations is that the patient inspiratory flow rate determines, to a large extent, the efficiency of inhalation and the drug deposition to the lung [6]. Hence, drugs might not be delivered successfully in patients suffering from severe fungal or parasitic pulmonary infections with a highly decreased pulmonary capacity. In this respect, a versatile DPI formulation that could be both administrated as a DPI or easily reconstituted in water followed by nebulization would be of great advantage, especially for pediatric and geriatric population or other patients with difficulties in achieving a deep inspiration [12]. The latter strategy based on powder reconstitution in water for nebulization, could be useful in those patients that require dose adjustment, such as for example, in the case of prophylactic treatments or severe infections [13, 14].

The hypothesis underpinning this work is that the development of a DPI formulation containing AmB could deliver the drug directly to the site of action, in particular for the treatment and prophylaxis of fungal lung infections such as those caused by aspergillosis, but also to target the alveolar macrophages and hence, act as an alternative treatment for disseminated leishmaniasis. Patient compliance would be greatly improved as hospitalization would not be necessary. For this reason, the aim of this work was to develop a DPI that is able to deliver AmB along all regions of the RT (high, medium and low), which is a necessity for the complete eradication of fungal pulmonary infections, but also specifically towards the alveolar macrophages if used in patients with disseminated leishmaniasis.

QbD and DoE was implemented to optimise the flow properties and particle size of the formulations, to ensure optimal lung deposition. Comprehensive physicochemical characterization was carried out including: XRD, FTIR, DSC, MMAD, FPF_{<5} and 3 μ m, DVS, surface area and stability studies. *In vitro* macrophage uptake and antifungal and antileishmanial activity were tested as well as *in vivo* pharmacokinetic pulmonary bioavailability.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Amphotericin B (AmB) was purchased from Azelis (Barcelona, Spain). Salbutamol sulphate (99.5% purity) was bought from Fluka BioChemika (Wicklow, Ireland). D-(+)-Mannose and D-(+)-Raffinose with a purity $\geq 99\%$, were purchased from Sigma Aldrich (Dublin, Ireland). L-Leucine reagent grade with purity $\geq 98\%$, was purchased from Sigma Aldrich (Dublin, Ireland). γ -Cyclodextrin (CD) Cavamax W8, ISP, with a purity $\geq 99\%$ was a gift from Ashland Industries Europe GmbH (Schaffhausen Switzerland). Sodium deoxycholate was purchased from Fluka Chemie A.G. Buch, Switzerland. Phosphoric acid (85%) (H₃PO₄) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Panreac S.A. (Barcelona, Spain). Solvents of HPLC grade were used. All other chemicals were of reagent grade and were used without further purification.

2.2 Methods

2 2.2.1 Design of experiments

Defining the target product profile (TPP) and identifying the critical quality attributes (CQAs)

The TPP is based on the summary of the characteristics of the drug product, as it relates to quality, efficacy and safety. Among the TPP elements that define the key quality characteristics of a pulmonary DPI formulation are: dosage form, route of administration and important attributes of this route, dosage type, pharmacokinetics, packaging and stability requirements. Considering that the drug is poorly water soluble, a solubilising excipient is desirable to be incorporated in the formulation. For chemotactic purposes and with the aim of potentially targeting AmB towards macrophages [15], a carbohydrate excipient such as raffinose or mannose was employed. To improve flow properties, leucine was incorporated [16]. In order to establish the TPP, various CQAs were identified as critical, such as the yield of the manufacturing process (spray drying), AmB loading, encapsulation efficiency, geometric and aerodynamic particle size and degree of crystallinity (DC) [17, 18].

Preliminary screening studies

A seven-factor eight-run Taguchi design ($L2^7$) was employed for factor screening in order to identify the formulation and process variables that critically influence the product quality. To select the most influential variables, an Ishikawa fish-bone diagram (Figure S1, Supplementary material) was designed to structure the risk operation for determining the causes and sub-causes affecting the CQAs.

The software Design Expert[®] version 10.0 (M/s Stat-Ease, Minneapolis, USA) was used to develop polynomial models which were analysed to outline the main effects for each CQA through Pareto charts [17]. Seven factors and two levels of each factor affecting the development of the AmB DPI formulation were selected (Table S1, Supplementary material) [17]. Five factors were numerical (i - v) and two categorical (vi-vii):

- i) Gas flow rate: 500 or 800 (NL/h);
- ii) Aspirator settings: 85 or 100 %;
- iii) Solution feed rate: 5 or 15 %; equivalent to 2 or 6 ml/min;
- iv) Inlet temperature: 130 or 175 °C;

- v) AmB concentration in the sprayed solution: 0.0625 or 0.125 %;
- vi) Type of solubilising excipient: γ -Cyclodextrin (γ -CD) or Sodium Deoxycholate (DOC);
- vii) Type of carbohydrate excipient acting as chemotactic agent: raffinose or mannose.

A total of eight formulations were prepared. γ -CD and DOC were selected as their ability to solubilise AmB in aqueous media has been demonstrated [19]. Based on previous studies, a weight ratio of 1:100 AmB: γ -CD (W:W) was required to solubilise the drug [5]. For this reason, the maximum AmB concentration selected was 0.125%. The same concentration was used for DOC. The concentration of the carbohydrate excipient (raffinose or mannose) was fixed to be the same as that of AmB.

The solution for spray drying was prepared as follow: the solubilizing excipient (6.25 or 12.5 g) was dispersed in 200 mL of deionized water and AmB (0.125 or 0.250 g) was added to the aqueous solution. A 2 N aqueous solution of NaOH (5 ml) was required to adjust the pH to 12. Once the drug was homogeneously dissolved, H_3PO_4 (diluted in water at 27%) was added until a physiological pH of 7.4 was reached. In the final step, the carbohydrate excipient (0.125 or 0.25 g) was solubilized. The solution was mixed in a magnetic stirrer for 10 min until was visually homogeneous [5, 20].

The final aqueous solution was spray dried in a Büchi B191 Mini Spray Dryer (Büchi Labortechnik AG, Switzerland) using a high-efficiency cyclone in an open mode. The process parameters were as follow: 130-175°C inlet temperature, 2 or 6 ml/min solution feed rate (5 or 15%), 500 or 800 NL/h nitrogen flow rate and 85 or 100% aspirator force.

Once the aqueous solution was spray dried, the particles were collected inside the collection vessel and the following five responses were evaluated: yield, AmB loading efficiency, water residual content, geometric particle size and DC.

The yield was calculated taking into account the difference in weight between the dry powder collected after the spray drying process and the total weight of excipients and API introduced into the feed solution, using equation 1.

$$Yield(\%) = \frac{\text{Weight of collected spray dried formulation}}{\text{Initial mass of API+excipients}} * 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

For AmB loading efficiency (LE) quantification, a known amount of powder formulation (≈ 10 mg) of each formulations of the DoE was weighed, dispersed in water (100 ml), diluted in methanol (1/10) and analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) using an Alliance HPLC with Waters 2695 Separations module system and Waters 2996 photodiode array detector. The mobile phase consisted of 52% HPLC grade acetonitrile, 43.7% deionized water and 4.3% acetic acid glacial. The mobile phase was degassed and filtered using a 0.45 μm polypropylene Whatman[®] filter. Separation was performed on a Thermo Hypersil BDS C18 reverse-phase column with a length of 200 mm, an internal diameter of 4.6 mm and a particle size of 5 μm . Samples were analyzed by UV detection at a wavelength of 406 nm. An injection volume of 100 μl was used. The elution was carried out isocratically with a flow rate of 1 ml/min. Empower Software v3 was used for peak evaluation [6].

The DC was calculated by Powder X-Ray Diffraction which was performed using a wide angle Miniflex II Rigaku[™] diffractometer with Ni-filtered Cu K α radiation (1.54 Å). The tube voltage and tube current used were 30 kV and 15 mA, respectively. The PXRD patterns were recorded (n = 3) for 2 thetas ranging from 5° to 40° at a step scan rate of 0.05°/second. The percentage of crystallinity was calculated by comparing the intensity of the Bragg peaks at 13.55 and 14.5, 2 θ of the PXRD spectrum of each formulation against AmB raw material (which was considered as 100% crystalline). Rigaku Peak Integral software was used to determine peak intensity for each sample using the Sonneveld-Visser background edit procedure. Equation 2 was used to determine DC (%):

$$DC (\%) = \frac{\text{Peak Area of the spray dried formulation} * \left(\frac{LE}{100}\right)}{\text{Peak Area of AmB raw}} * 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

The residual water content was analyzed by Thermogravimetric Analysis (TGA) performed using a Mettler TG 50 module (Greifensee, Switzerland). Samples were placed in open aluminum pans (3-5 mg) and analyzed at a constant heating rate of 10°C/min between a temperature range of 25 °C and 250 °C [21].

The geometric particle size distribution was determined by laser diffraction using a Malvern[®]-Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). AmB- DPI powder formulations were dispersed using a Scirocco dry feeder instrument with 3 bar pressure and a vibration feed rate of 75 % to get an obscuration of 0.5– 3%. The results were reported as the median particle size (D₅₀).

QbD- based formulations optimization studies

Based on the preliminary studies, the critical excipient attributes affecting the spray drying process were identified. A Box Behnken experimental design was employed for systematic optimization using Design Expert[®] software [17]. The central point (0, 0, 0) was studied in quintuplicate. Three factors and three levels of each factor affecting the final DPI formulation responses were selected: i) AmB: CD weight ratio (1, 50.5 and 100), ii) AmB: mannose weight ratio (0.2, 0.6 and 1) and iii) the amount of leucine used to improve the flow properties (5%, 10%, and 15%). The spray drying parameters were kept constant, as follows: 10% (4 ml/min) solution feed rate, 742 Nl/h nitrogen flow rate, 150 °C inlet temperature and 90% aspirator rate. Regarding the formulation parameters, after the preliminary screening, the following were kept constant: i) CD as solubilizing excipient instead of DOC, considering that the latter can be more irritant to the RT and ii) mannose as chemotactic carbohydrate excipient as its efficacy has been demonstrated due to the presence of mannose receptors on the surface of macrophages [22]. Seven responses were evaluated: DC, LE, residual water content, yield, mass median aerodynamic diameter (MMAD), fine particle fractions (FPF) <3µm and (FPF) <5µm. Table S2, (Supplementary material) summarizes the experimental design matrix of the seventeen experimental runs and their factor combinations and responses.

Optimisation of AmB DPI formulations and validation studies

Mathematical modelling was carried out by multiple linear regression analysis (MLRA). The polynomial equations were based on the statistically significant coefficients ($p < 0.05$). Correlation coefficient (R^2) and predicted residual sum of squares (PRESS) were used to evaluate the models. Response surface analysis was carried out employing 2D and 3D plots to understand the relationship among the different factors and the responses. The prediction of the optimum formulations was carried out by numerical optimization and desirability function. Two optimised formulations (F1 and F2) were developed with good flow properties and the DC of the drug switching from amorphous (F2) to crystalline (F1). Validation of the QbD methodology was achieved by comparing the predicted responses with the experimental ones with linear correlation and residual plots as support [17].

3 2.2.2 Physicochemical characterization of the optimised formulations

Scanning electron microscopy (SEM)

The surface morphology of DPIs formulations, previously coated with gold/palladium, was evaluated by scanning electron microscopy (SEM) using a Zeiss Supra Variable Pressure Field Emission Scanning Electron Microscope (Germany) equipped with a secondary electron detector at 5 KV [11].

Fourier transforms infrared spectroscopy (FTIR)

Measurements were carried out with a PerkinElmer Spectrum 1 FT-IR Spectrometer equipped with a UATR and a ZnSe crystal accessory. Infrared spectra were scanned in the range of 650-400 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} . Data was evaluated using Spectrum V.5.0.1 software. Four scans of each sample were taken [23].

Modulated temperature DSC (MTDSC)

Optimised DPI powders ($n=3$) were weighed (4-6 mg) in aluminum pans with one pin-hole. MTDSC scans of the samples were recorded on a QA-200 TA instrument (TA instruments, Elstree, United Kingdom) calorimeter using nitrogen as the purge gas. A scanning rate of 5°C/min, an amplitude of modulation of 0.796°C and a modulation frequency of 1/60 Hz were employed [24]. The temperature range was from 10 to 210 °C [25]. Calibration of the instrument was carried out using indium as standard [21].

Dynamic Vapour Sorption (DVS)

Vapour sorption experiments were carried out on a DVS Advantage-1 automated gravimetric sorption analyzer (Surface Measurement Systems, Alperton, UK) at 25.0 ± 0.1 °C. Water was used as the probe vapor. A mass of 15 - 20 mg of powder was loaded on to the sample basket. Samples were dried at 0% relative humidity (RH) for 1 h and then subjected to step changes of 10% RH up to 90% RH, and the reverse for desorption. The sample mass was allowed to reach equilibrium, defined as $dm/dt \leq 0.002$ mg/min over 10 min before the RH was changed [26, 27]. Two cycles of sorption and desorption were performed for each sample, after which samples were recovered and analyzed by PXRD.

Surface area

To determine the specific surface area by the Brunauer, Emmett, Teller (BET) isotherm method, a Micromeritics Gemini VI (Micromeritics, Norcross, GA, USA) surface area analyzer was used. The specific surface area of the samples was determined by the N_2 adsorption BET

multipoint method, with 6 points in the relative pressure range of 0.05-0.3 mm Hg. Each average result was calculated on the basis of three measurements [27]. Samples were prepared by purging under N₂ overnight at 25 °C.

Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) and Fine Particle Fraction (FPF)

MMAD and FPF were assessed to determine the *in vitro* lung deposition of the optimized DPI AmB formulations. In accordance with the specifications for apparatus E of the European Pharmacopoeia 10.0 - Preparations for Inhalation: testing was performed using a Next Generation Impactor™ (NGI™, MSP Corporation, Shoreview, MN). The NGI™ was equipped with a stainless-steel induction port (throat adaptor) attachment and seven stainless steel compartments (stages) and one Micro-Orifice Collector (MOC) kept in a support tray. A filter paper (Whatmann™ n°1) wetted with 1 ml of acetonitrile: water (1:1, V: V) mixture was placed in each stage to facilitate sample collection and avoid particle bouncing. Aerodynamic cut off diameters (ECD) for each impactor stage at 60 L/min were calibrated by the manufacturer and stated to be: 8.06 µm, 4.46 µm, 2.82 µm, 1.66 µm, 0.94 µm, 0.55 µm and 0.34 µm for stage 1 to stage 7 respectively [28].

The NGI™ was coupled with a Copley TPK 2000 critical flow controller, which was connected to a Copley HCP5 vacuum pump (Copley Scientific, United Kingdom). To achieve a constant airflow rate (Q) through the system, the volumetric flow output (Q_{out}) should be ± 5% which was measured using a flowmeter and adjusted prior to each experiment. Q_{out} can be also calculated by the ideal gas law (Eq.3) [28].

$$Q_{out} = \frac{Q_{inx} \times P_o}{P_o \times \Delta P} \quad (Eq. 3)$$

Once the airflow was set at 60 L/min, the flowmeter connected to the mouthpiece was replaced by the inhaler device and the pressures were checked to verify that: $P_3/P_2 \leq 0.5$ and $P_1 \geq 4$ Kpa.

AmB DPI formulations and Ambisome® powder (25 mg) were weighed and loaded into size 3 hard gelatin capsules, which were individually placed in a Handihaler® device (Boehringer Ingelheim) and connected to the NGI mouthpiece via a custom-made mouthpiece adapter Copley Scientific, United Kingdom). The capsule content was released by being needle-pierced opened by the Handihaler® and the system was vacuumed to produce air streams of 60 L/min

for 4 s. The collecting solvent used was acetonitrile: H₂O, 1:1 (v/v). The collected samples were diluted as appropriate and analyzed by HPLC as previously described [29].

The emitted dose of one capsule (i.e. the percentage of emitted AmB), was determined from the various depositions in the NGI, from the first to the last stage, excluding the amount remaining in the device. The MMAD and the FPF < 5 μm and < 3 μm were calculated based on the AmB deposited fraction on each NGI stage, as previously described [29]. All the experiments were performed in triplicate.

In further studies, *in vitro* lung deposition of optimised AmB DPI formulations was studied at different flow rates simulating a reduced inspiration breath characteristic in patients suffering from pulmonary infections: 30 L/min for 8 s as a DPI and nebulization at 25 L/min for 15 min for formulations dispersed in 5 ml of H₂O (at 5 mg/ml) using a NB-810B ultrasonic mesh nebulizer (140 KHz and 0.3 ml/min nebulization rate).

4 2.2.3 Investigation of fixed-dose combination DPI containing AmB and Salbutamol Sulfate (SS)

A salbutamol sulfate (SS)–AmB fixed-dose formulation was developed as a combination to treat fungal pulmonary infections which are commonly associated with low breathing capacity [30]. The SS-AmB DPI formulation was prepared following the same manufacturing method as for the F2 optimised formulation which will be later described in the result section 3.1. Briefly, in this fixed-dose combination, 39.7% AmB was formulated with 0.8% SS, 39.7% γ-cyclodextrin, 7.3% mannose and 12.5% leucine. The rationale behind this combination is that in the final capsule intended for inhalation as a DPI (with a total weight of 25 mg), the amount of AmB and SS is 10 mg and 200 μg respectively which is equivalent to the current dose utilized in the treatment of bronchospasm [31].

The fixed-dose SS-AmB DPI formulation was characterised by scanning electron microscopy (SEM) and aerodynamic flow properties (MMAD and FPF < 5 μm and FPF < 3 μm) by NGI™ following the same method previously described in 2.2.2. section.

5 2.2.4 *In vitro* Release Studies

In vitro release studies were performed on F1 and F2 optimised AmB DPI powder formulations and compared to unprocessed AmB. Formulations were weighed (a mass equivalent to 5 mg

of AmB) and diluted with 2 ml of Hanks Buffered Salt Solution (HBBS), which is a simulated epithelial lining fluid (ELF), consisting of potassium chloride (7 mg/ml), potassium phosphate monobasic (400 mg/ml), sodium bicarbonate (60 mg/ml), sodium chloride (350 mg/ml), sodium phosphate dibasic (8 g/ml), D-glucose (dextrose) (48 mg/ml) adjusted to pH 7.4 in H₂O [32]. Dispersed formulations were filled inside dialysis membranes in which 0.5 mm glass beads were added to avoid floating. Filled dialysis bags were introduced into 100 ml of HBBS and maintained at 37 °C in a bath with constant shaking. Samples (1 ml) were withdrawn at different time points: 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 min and 20 and 24 h. Media was replaced with fresh buffer at each sampling time point. Samples were centrifuged at 5000 rpm and the supernatant was analysed by HPLC using the method described above. The assay was performed in triplicate.

6 2.2.5 *In vitro* antimicrobial activity- Disk diffusion halo assay

The antifungal activity of the optimised AmB DPI formulations was tested against three different strains of *Candida* (*Candida albicans*; CECT 1394, *Candida Glabrata* 60750 and *Candida Parassilopsis* 57744). These three species have been selected due to their higher incidence rate and prevalence compared to other *Candida spp.* Antifungal activity was tested by an agar diffusion assay, according to the European Pharmacopoeia 10.0 and as previously described by Ruiz et al. [5]. Prior to the beginning of the study, yeast isolates were cultured in Sabouraud dextrose agar at 30 °C for 72 h to ensure viability and absence of contamination. Antifungal sensibility was assayed in Müeller Hinton agar (MHA) supplemented with glucose (2% w/w) and 0.5 µg/mL methylene blue. The MHA (200 ml) was sterilized at 121 °C and once attemperated, 3 ml of yeast suspension, prepared in sterile saline (NaCl 0.9%) and adjusted to 0.1 Abs at 600 nm, was inoculated. The MHA with the inoculated *Candida* was placed onto Petri dishes [6]. Optimised AmB-DPI formulations (F1 and F2) were weighed and dispersed in deionized water resulting in a final AmB concentration of 500 µg/ml. As a control, AmB dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at the same concentration and AmB NeoSensitab[®] disks (containing 10 µg of AmB) were used. Paper disks (6 mm) were embedded with 20 µl of each sample. The amount of drug inoculated per disk was 10 µg (which is equivalent to the amount of AmB contained in each NeoSensitab[®] disk). Once the disks were dried and the agar solidified, the disks were placed onto the inoculated agar plates. The plates

were kept at 5° C for 2 h followed by 48 h at 30° C and then the diameter of the growth inhibition halos was measured. The study was performed in triplicate.

2.2.6 *Ex-vivo* red blood cell (RBC) haemolytic studies

Venous blood was obtained from a healthy volunteer and collected into an EDTA-coated Vacutainer tube to prevent coagulation. The blood was centrifuged at 1000 rpm for 5 min and the haematocrit and plasma levels were marked on the tube. The supernatant was discarded. The tube was filled to the plasma level marked line with 150 mM NaCl solution and the tube was gently mixed. The tube was centrifuged (5 min at 1000 rpm) and the supernatant was discarded again. The RBCs were washed twice with 150 mM NaCl solution as previously described. After the last wash, the supernatant was discarded, and the RBCs were diluted with PBS at pH 7.4 to 4% final concentration (4.81×10^5 RBC /ml). The diluted RBCs were then added into a 96 well plate (180 μ l/well) [33]. Two types of experiments were performed, in triplicate as below described.

In the first set of experiments, the aim was to evaluate the haemolytic effect of the optimized AmB-DPI formulations. Stock solutions of the optimised AmB DPI formulations (1 mg/ml) were prepared. As a comparison, a standard solution of AmB in DMSO at the same concentration was prepared. Formulations were diluted using deionised water at different concentrations (250 – 3.9 μ g/ml) and 20 μ l of each sample concentration were loaded into the wells. As a positive control, a 20% solution of Triton X-100 (20 μ l) was added. As a negative control, PBS pH 7.4 (20 μ l) was incorporated. Plates were incubated at 37 °C for 1 h. Subsequently, plates were centrifuged at 2500 rpm for 5 min to pellet intact erythrocytes. Supernatants (50 μ l) were transferred into a clear, flat-bottomed 96-well plate. The absorbance of the supernatants was measured using a plate reader (BioTek, ELx808) at 595 nm. The percentage of haemolysis was calculated using the following equation:

$$\text{Haemolysis (\%)} = (\text{ABS}_{\text{sample}} - \text{ABS}_{\text{PBS}}) / (\text{ABS}_{\text{Triton}} - \text{ABS}_{\text{PBS}}) \times 100 \quad (\text{Eq 4})$$

where ABS_{PBS} is the average of the absorbance from the negative control and the $\text{ABS}_{\text{Triton}}$ is the average of the absorbance from the positive control. The concentration of AmB-DPI formulation that produces 50% haemolysis at the tested concentration (HC_{50}) was calculated using CompusynTM software.

In the second set of experiments, the aim was to investigate the effect of leucine and mannose on the different AmB aggregate states. AmB in water, and depending on the excipients, can be found in a monomeric state or aggregated, forming oligoaggregates (known as dimers) or polyaggregates [19]. The second haemolytic study was performed using the same method as described above in order to determine any protective effect of leucine or mannose incorporated in AmB DPI formulations when tested against red blood cells. An equilibrium between the dimeric and monomeric forms was found in the AmB DPI formulations. Dimeric and monomeric AmB solutions were prepared using AmB:DOC (50:41, w:w ratio) and AmB:CD (1:100, w:w ratio) respectively, as previously described [33]. Leucine and mannose were dissolved in water. Each of the compounds was tested separately with dimeric or monomeric AmB solutions at a weight ratio of 1:1. In addition, mannose and leucine were tested together at the weight ratio 0.5:0.5:1 (mannose:leucine:AmB) with each of the aggregation states of AmB.

7 2.2.7 *In vitro* activity against *Leishmania*

The optimised AmB DPI formulations and unprocessed AmB were tested at different concentrations (100 µg/ml to 0.19 µg/ml) against *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* promastigotes (provided from Centro Nacional de Microbiología of the Instituto de Salud Carlos III (Madrid- Spain) [34, 35]. Parasites were cultured in Schneider's insect medium at 26 °C and supplemented with heat-inactivated foetal bovine serum, penicillin, and streptomycin at a concentration of 100 IU/ml and 100 µg/ml, respectively. Log-phase promastigotes were cultured in 96-well plates and 2.5×10^6 parasites were added per well (100 µl). F1 and F2 DPI formulations were dissolved in deionised water at different concentrations (100 µg/ml to 0.19 µg/ml) and were also added to the wells (100 µl). After 48 hours of incubation at 26 °C, a resazurin solution (20 µl, 2.5 mM) was added to each well and, 3 hours later, the fluorescence intensity (535 nm excitation wavelength, 590 nm emission wavelength) was measured using a Tecan® Infinite 200 fluorimeter. The efficacy of each formulation was estimated by calculating the IC₅₀ (concentration needed to kill 50% of the parasites) by Probit analysis using Minitab (Coventry, UK) [35].

8 2.2.8 Cytotoxicity Study

The *in vitro* cytotoxicity studies were carried out in a J774 murine macrophage cell line. The macrophages were maintained in RPMI-1641 supplemented medium with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) (30 min at 56 °C), 100 U/ mL of penicillin G and 100 µg/mL streptomycin. In this phase, cells were gathered with 0.03% EDTA-0.05% Trypsin in PBS in a 96 well plate and incubated at 37° C and 5% CO₂ humidity chamber. Macrophages were placed in 96-well plates (5 x 10⁴ cells/well) with 100 µl of RPMI-1640 medium and incubated for 24 hours at 30 °C, 5 % CO₂. Later, medium was discarded and replaced with 200 µl of formulation and incubated again for 24 hours. Optimised AmB DPI formulations, F1 and F2 and unprocessed AmB were tested at different concentrations in each well (250 µg/ml to 0.078 µg/ml) in triplicate. After the 24 h incubation period, resazurin (20 µl, 1 mM) was added and the plates were incubated for another 3 h. Then, the fluorescence intensity was measured (535 nm excitation wavelength, 590 nm emission wavelength) [35, 36]. The cytotoxicity of each formulation was estimated by calculating the CC₅₀ (concentration needed to kill 50% of the macrophages) by Probit analysis. The selectivity index (SI) was calculated as expressed in Equation 5 [36]:

$$SI = \frac{CC_{50}}{IC_{50}} \quad (\text{Eq.5})$$

9 2.2.9 Macrophages uptake assay

J774 cell lines (murine monocyte-like cell line) were grown in Minimum Essential Medium Eagle supplemented with FBS, 100 UI/ mL of penicillin G and 100 µg/mL streptomycin in 25 mL flasks at 37°C and a humidified 5% CO₂/air atmosphere. The J77A cells (100 µl equivalent to 5 x 10⁵ cell/ml) were incubated at 37° C with 100 µl of each of the optimised AmB DPI formulations after being reconstituted with deionized water and diluted at different concentrations (25 to 0.195 µg/ml). Dimeric AmB, prepared as described above, was tested as a control at the same concentrations. After several incubation times (1, 4 and 24 h), the supernatant was discarded, and all the plate was washed with cold macrophage medium (RPMI). The cellular lysis was performed with 250 µl of Triton 1% in PBS followed by 30 minutes under mild stirring. Afterwards, 100 µl were transferred to another 96 well plate and 100 µl of MeOH was incorporated to solubilize the AmB and precipitate the cell debris [15]. The plate was centrifuged for 10 min at 2500 rpm. After that, the supernatant was collected and analyzed by HPLC as above described.

10 2.2.10 Pharmacokinetic Studies

All experiments were performed in the INSERM U1070 laboratory at the University of Poitiers using rats OFA 250/275gr bought from Charles River (production area B7). Animal work was carried out in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (26a) and with EC Directive 2010/63/EU. They were approved by the local ethics committee (COMETHEA) and registered by the French Ministry of Higher Education and Research (n°2015042117101247). Animals were acclimatized in wire cages in a 12-h light-dark cycle for a minimum of 5 days before the beginning of the experiment. During this period, they had free access to food and water. They were randomly split into three groups (n = 21).

In the first group (G1) Ambisome[®] (purchased from Gilead Sciences S.L.) was intravenously administered at 5 mg/kg. Group 2 (G2) and Group 3 (G3) received F1 and F2 optimised AmB DPI formulations intratracheally administered using a MicroSprayer IA-1B system (Penn Century Inc, Philadelphia, USA). Animals received a dose equivalent to 5 mg/kg of AmB. Previous to drug administration, isoflurane (3% air at 550 ml/min) was administered to all the rats for a short sedation period. Rats were maintained by the upper incisors on a rodent work stand inclined at an angle of 45° (Tem, Lormont, France). Vocal cords were visualized with the help of an otoscope. The tube of the MicroSprayer IA-1B system was inserted between the vocal cords, and the AmB DPI formulations were nebulized into the lung. Rats were still asleep approximately during 5 min post-dosing. Arterial blood was collected at 1, 3, 6, 18, 30, 48 and 72 h post-administration via intracardiac puncture. Plasma was separated by centrifugation (1,000 g, 15 min) and frozen at -80°C until analysis. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid collection was performed at the same times by instilling a catheter at 50 mm depth into the trachea. The highest possible volume was collected in order to estimate epithelial lining fluid (ELF) drug concentration. BAL fluid was centrifuged (1,000 g, 15 min) and AmB was quantified. AmB concentration was analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) validated method under ISO 9001 certification. Intraday and between-day variability were characterized with a precision and bias of <20%. Concentrations of ELF were calculated using the urea dilution method [37].

2.2.11 Stability Studies

Accelerated Stability Studies

The optimised AmB DPI formulations and unprocessed AmB (≈ 5 mg) were placed in uncapped HPLC vials and introduced into test chambers where they were exposed to different conditions of temperature and humidity: 40/65, 50/85, 50/10, 60/30, 60/65, 70/10 ($^{\circ}\text{C}/\%$ RH). The relevant humidity capsules (Amebis Ltd. Dublin, Ireland) were introduced in the stability chambers which were put inside ovens at the selected temperature in order to ensure that the RH equilibrium was reached prior to aging of the formulations. A sensor cap with a data logger on it was used to seal the test chamber, and to collect and transmit the temperature and humidity test conditions to the Amebis Control Software. Amebis Software was used to calculate the mean kinetic temperature and relative humidity for every condition. Samples were collected and analysed by the HPLC method previously described for chemical degradation at different time points (1, 3, 6 and 14 days). The stability modelling was performed using ASAPprime[®] software. The effect of temperature and RH on degradation rates was estimated by a humidity-corrected Arrhenius equation [38, 39] (Eq.3):

$$\ln K = \ln A - \frac{E_a}{RT} + B (RH) \quad (\text{Eq. 6})$$

Where K is the degradation constant (% AmB /day), A is the collision frequency, E_a is the activation energy, B is the humidity sensitivity factor, T is the absolute temperature and R is the gas constant. The method used was “potency with RH” based on the amount remaining of AmB, at different time points, dependant on variations in temperature and RH. The parameter selected for modelling was 2500 Montecarlo simulations and 90% specification limit. Different fitting methods were assessed: Avrami, diffusion, first order, second order and zero order. The one with the highest R^2 was selected for shelf-life prediction at the following conditions of temperature ($^{\circ}\text{C}$) and relative humidity (RH): 25/60, 25/10, 4/10.

Long Term Stability Studies

F1 and F2 and the unprocessed AmB were placed in uncapped HPLC vials and introduced in stability chambers at ICH conditions (25 $^{\circ}$ C, 60% RH; 25 $^{\circ}$ C, 10% RH and 4 $^{\circ}$ C, 10% RH). The samples were analysed by HPLC to determine the AmB potency (%) in the formulation at different times (3, 12 and 24 months) [6]. The estimated shelf-life values were compared to those obtained from experimental data.

2.2.12 Statistical analysis

Statistical analysis was performed via one-way ANOVA test using Minitab 17 (Minitab Ltd, Coventry, UK) followed by Tukey's test considering p-values for statistical significance <0.05 [40].

3. Results

11 3.1 Preliminary screening

A Taguchi design was employed to perform the screening of several process and formulation parameters, in total seven factors at two levels each. This design has the specific advantage of requiring a minimal number of experimental runs (n=8) including a large number of independent variables (Table S1, Supplementary material) [41].

Pareto charts showed that the variables/responses that were most subject to change during the spray drying process were yield and particle size (represented by D_{50}) (Fig. 1). All the formulations exhibited a particle size between 1-5 μm . The higher the gas flow rate, the lower was the median geometric particle size, D_{50} . Regarding the solubilising excipient, the greater the amount of DOC, the lower was the particle size and the yield. The aspirator setting and inlet temperature had opposite effects on the yield. A higher yield was obtained at lower aspirator rates and higher inlet temperatures. Based on these results, the gas flow rate and inlet temperature were fixed at 742 NL/h and 150 °C respectively while a 90% aspirator setting was selected for the second DoE (Box-Behnken). No statistically significant differences were observed for the DC and the spray drying rate in the Taguchi DoE. To avoid clogging of the nozzle, a 10% solution feed rate (equivalent to 4 ml/min) was selected for further studies.

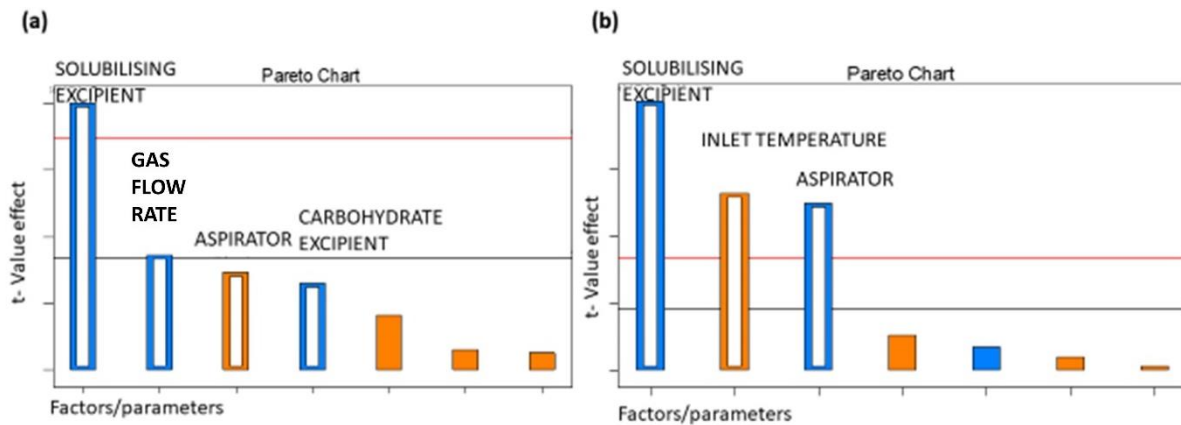


Figure 1. Pareto charts depicting the influence of the seven factors assessed on the Taguchi design. Key: a) Particle size (D_{50}) b) Yield. Orange bars represent a positive effect of the factor on the response while blue bars represent a negative effect.

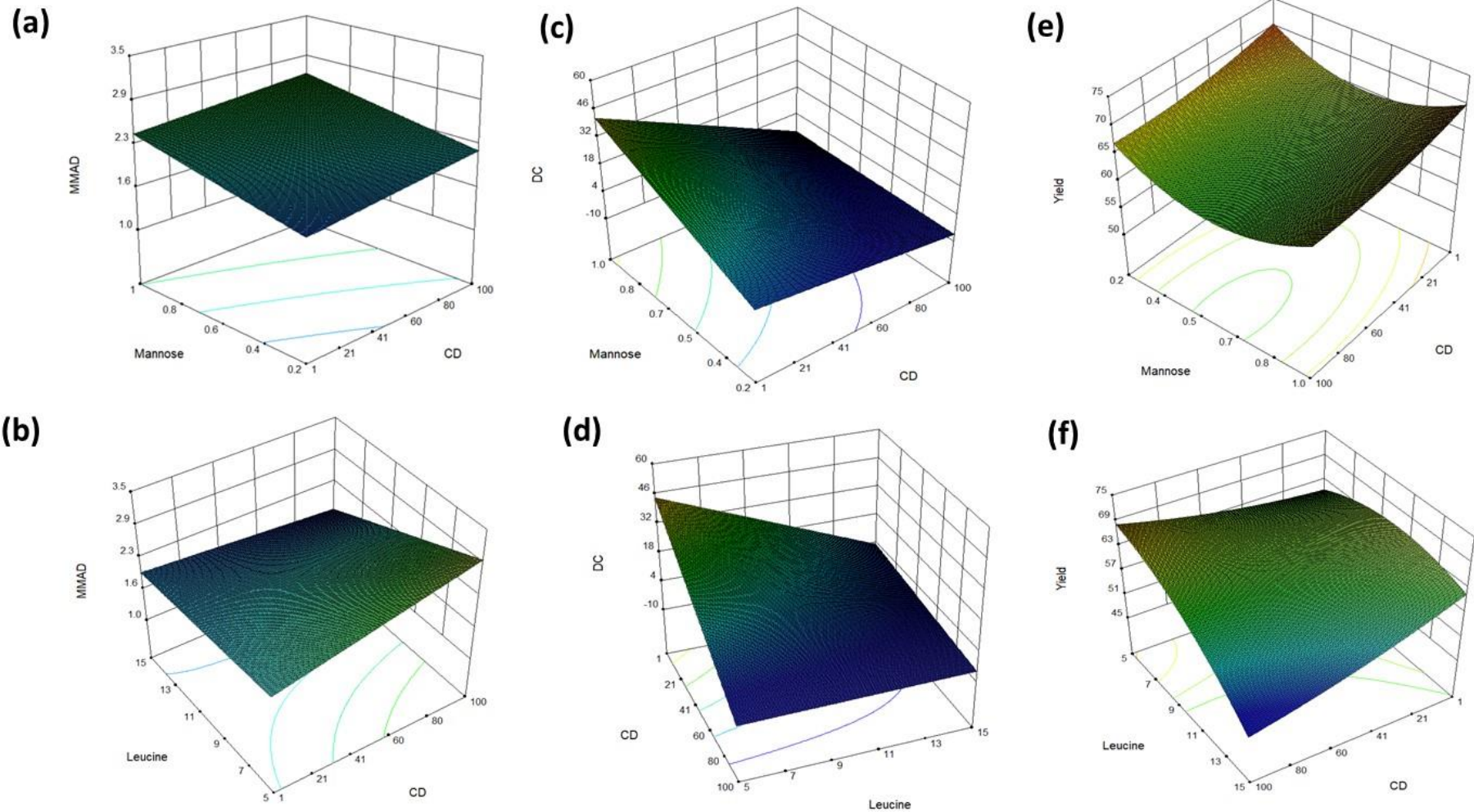
In the second DOE, the effect of three factors (weight ratio of CD:AmB, weight ratio of mannose:AmB and percentage of leucine) at three levels was investigated in more detail. CD was chosen as the solubilising excipient instead of DOC due to the fact that the DOC may be more irritant to the lung than CD [22], and also because the use of CD led to higher yield and loading efficiency in the preliminary screening studies. The three levels of AmB: CD evaluated were 1:1, 1:50 and 1:100 (w:w). Even though, no significant differences were found between the use of raffinose and mannose in the preliminary screening studies, the latter was selected as its efficacy as chemotactic agent for macrophages has been previously demonstrated [22, 42] and this could potentially be beneficial in the treatment of intracellular parasites such as disseminated leishmaniasis. Three different AmB: mannose ratios were used: 1:1; 1:3 and 1:5 (w:w). The impact of leucine on the flow properties of the formulations was studied in more detail in this second DoE. The effect of three different levels, 5, 10 and 15% of leucine, was investigated.

QbD-based model development and response surface analysis

Polynomial analysis was carried out by a multilinear regression analysis method, which indicated that the linear and two factor interaction models were the best fit for the parameters assessed, except for the yield response for which a quadratic model showed a better fit. The coefficients of the model equations generated for each CQA revealed goodness of fit of the experimental data to the selected model (with high values of R^2 and low p-values < 0.05) for

three of the responses: MMAD, DC and yield. No significant differences were observed in the percentage of water content and encapsulation efficiency ($p > 0.05$).

The MMAD 3D-response surface plot revealed a higher influence of the amount of leucine, mannose and CD. Lower MMAD results were obtained when greater amounts of leucine, lower AmB: mannose and AmB: CD ratios were spray dried (Fig. 2a-b).



1

2 **Figure 2. 3D response surface showing the influence of the formulation excipients on the MMAD (μm) (a,b), the DC (%) (c, d) and the yield (%) (e, f) respectively.**

3 Key: Leucine is expressed in %; CD is expressed as AmB:CD weight ratio (from 1 to 100, w:w) and Mannose is expressed as AmB:Mannose weight ratio (from 0.2 to 1

4 w:w).

Regarding the DC, the most influential variables were the ratio between AmB and CD and mannose. A higher DC was obtained when larger amounts of mannose were used, but with lower amounts of CD and leucine, thus, 1:1 AmB:CD ratio, 5% of leucine and 1:1 AmB:mannose ratio (Fig 2c-d) provided the highest DC value. Similar effects were observed for the yield (Fig. 2e-f). Yield increased significantly when 5% leucine and 1:1 AmB: CD ratio were used in the formulation. In the case of the AmB: mannose ratio, the yield was lower at the central point but increased at the extremes (1:0.2 and 1:1).

Search for the optimum formulation and QbD validation

The search for an optimum formulation was carried out by trading-off various CQAs to attain the desired objectives, giving priority to the minimisation of the MMAD and the enhancement of the yield. Two formulations were optimised in the Box-Behnken design (denominated as F1 and F2) based on different DC values (Table S2, Supplementary material) in which the DC was maximised in F1 and minimised in F2 (Table 2).

Based on the aforesaid objectives, the optimised formulation parameters for F1 were: 1:1 AmB:CD weight ratio, 1:1 AmB:mannose weight ratio and 10.4% leucine, while for F2, the optimised formulation consisted of: 1:1 AmB:CD weight ratio, 1:0.2 AmB:mannose weight ratio and 12.6% leucine. Validation of the QbD methodology revealed close proximity between the predicted values of the responses with those observed for the prepared checkpoint formulations (Table 2). The percent prediction error for the CQAs varied between 0.41 and 3.37%, indicating excellent goodness of fit for the predictive models.

Table 2. Experimental and predicted values based on QbD methodology for optimised AmB DPI formulations (F1 and F2). Key: BQL, below the quantification limit by PXRD established as <1% crystalline AmB.

Response	Value	F1	F2
		AmB-CD-Mannose (1:1:1, w:w:w) 10.4% Leucine	AmB-CD-Mannose (1:1:0.2, w:w:w) 12.5% Leucine
Yield (%)	Predicted (Mean Value)	65.03	69.57
	Experimental (Mean Value)	69.80	70.25
	Prediction Error	3.37	0.48
DC (%)	Predicted	43.23	0.00
	Experimental	45.00	BQL
	Prediction Error	1.25	BQL
MMAD (μm)	Predicted	3.11	2.43
	Experimental	2.53	1.93
	Prediction Error	0.41	0.35

12 3.2 Physicochemical characterization

Quasi-spherical collapsed particles with rough surfaces were observed in the SEM micrographs of F1 and F2. Collapsed particles can be the result of combining high gas flow rate and low feed rate, leading to fast water evaporation. Also, rough surfaces can be attributed to the presence of deposited leucine [16]. In the F1 formulation, small, unencapsulated crystals, close to 1 μm in size, were observed which can explain the greater DC determined for this formulation (Fig. 3a-b).

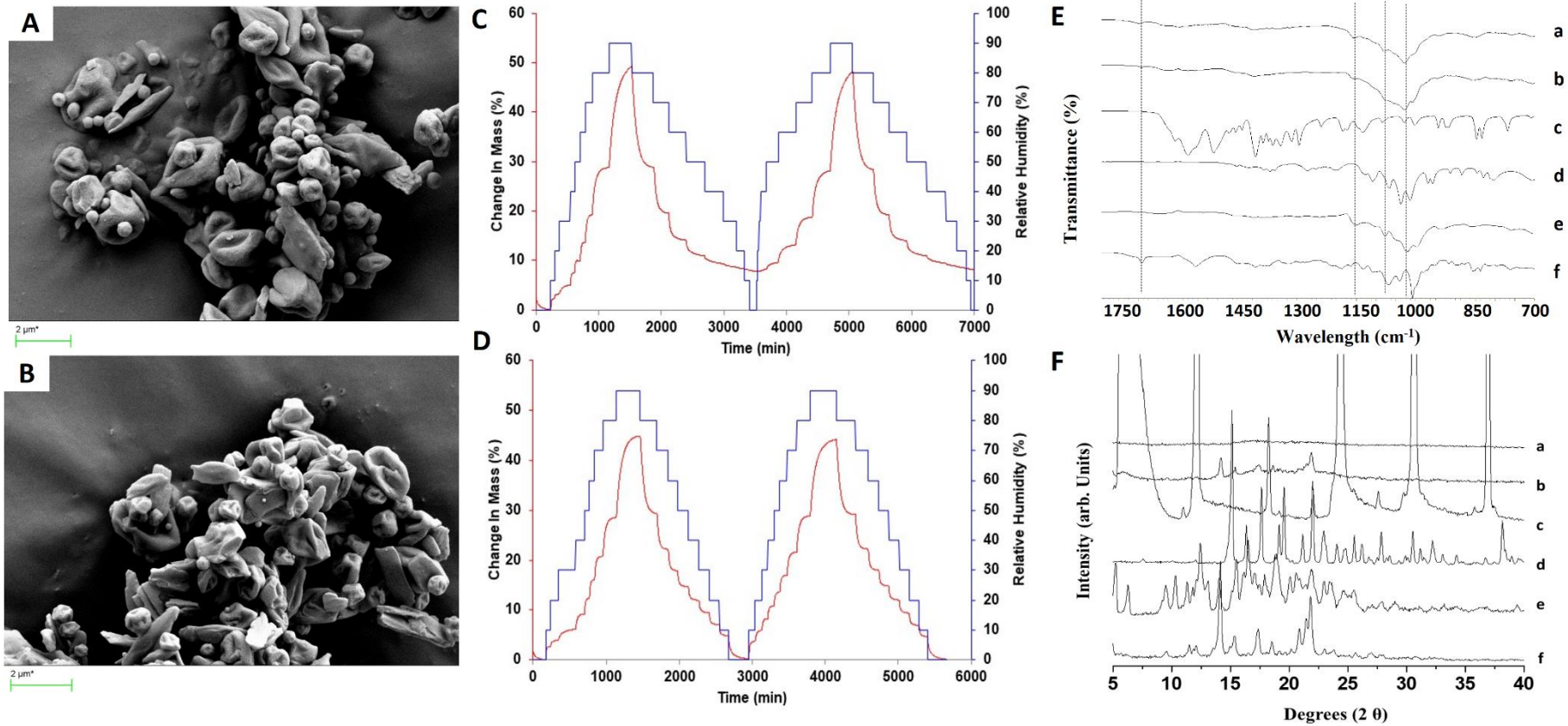
The DVS sorption profiles for both F1 and F2 formulations showed high water uptake (49.7 % and 50.7% respectively) between 70 to 90% relative humidity (Fig. 3c-d) which is a common behaviour for spray dried formulations. No mass loss associated with solid state changes (such as amorphous to crystalline transition) was observed in the first or second sorption cycles for either of the formulations, indicating good physical stability.

In FT-IR, broader bands were observed for both optimised formulations due to the amorphous nature of the excipient matrix (Fig. 3e). A shift was observed in the C=O at 1691 cm^{-1} of the AmB and the C-O stretching band at $1116\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ of the γ -CD, which may be attributed to H-bond interactions between both components. This shift was more pronounced in the F2 amorphous formulation than in the semi-crystalline F1 material. PXRD diffractograms showed characteristic Bragg peaks for all unprocessed excipients and AmB raw material. After spray

drying, an amorphous halo was observed only for the F2 formulation (Fig. 3Fa), while Bragg peaks attributed to AmB were found in the F1 formulation (Fig. 3Fb).

The surface area of F1 and F2 ($5.06 \pm 0.21 \text{ m}^2/\text{g}$ and $4.98 \pm 0.19 \text{ m}^2/\text{g}$ respectively) was 8-fold greater than the γ -CD raw material ($0.63 \pm 0.11 \text{ m}^2/\text{g}$) but lower than unprocessed AmB ($11.18 \pm 0.48 \text{ m}^2/\text{g}$), which can be related to the fact that AmB raw material is a micronized powder with lower geometric particle size ($< 3 \mu\text{m}$).

In the DSC thermograms, no T_g in the reversing heat flow signal was found for either of the DPI formulations, which can be explained by interference from other excipients (Fig. S2, Supplementary material). The F2 thermogram showed: i) a broader dehydration peak than F1, ii) an absence of endothermic peak of mannose at $135.8 \text{ }^\circ\text{C}$ which is clearly observed in the physical mixture of F2 and ii) a less pronounced dehydration peak of AmB at $94.7 \text{ }^\circ\text{C}$ than F1, with all three observations being associated with the difference in amorphous content between F1 and F2. AmB decomposes at temperatures above $160 \text{ }^\circ\text{C}$ and hence, the DC could not be quantified based on the heat of fusion.



1
 2 **Figure 3. Physicochemical characterisation of F1 and F2 AmB DPIs. Key:** **A)** SEM of F1; **B)** SEM of F2; **C)** DVS profile of F1; **D)** DVS profile of F2; **E)** FT-IR spectra:
 3 a) F2, b) F1, c) Leucine, d) Mannose, e) CD, f) Unprocessed AmB; **F)** XRD patterns: a) F2, b) F1, c) Leucine, d) Mannose, e) CD, f) Unprocessed AmB.

4 Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) and Fine Particle Fraction (FPF)

5 MMAD and FPF values for F1 and F2 DPI formulations were evaluated at two different
6 conditions (60 L/min for 4 s and 30 L/min for 8 s). Formulations were also reconstituted in
7 deionized water at 5 mg/ml to test lung deposition on nebulization for 15 min at 25 L/min.
8 AmBisome[®], the liposomal lyophilised intravenous formulation, was also tested as a dry
9 powder at 60 L/min for 4 s and nebulized at 25 L/min for 15 min after being reconstituted in
10 deionized water at the same concentration. F1 and F2 DPI formulations showed good *in vitro*
11 deposition at 60 L/min with FPF < 5 µm close to 80% and a MMAD below 3 µm (Table 3).
12 When comparing deposition characteristics at different air flow rates, F1 showed a more
13 consistent profile, while F2 was more sensitive to air flow changes exhibiting a significant
14 reduction of 25% in the FPF < 5 µm from the DPI at 30 L/min and by nebulization at 25 L/min
15 (Figure 4, Figures S3-S5 in Supplementary material). Overall, F2 showed a greater mass loss
16 in the Handihaler and the upper parts of the respiratory tract (mouthpiece adaptor and induction
17 port) ca. 50% (Fig. 4). The marketed AmB parenteral formulation (AmBisome[®]) showed a
18 markedly different profile when delivered via the DPI at 60 L/min compared to the
19 reconstituted liquid nebulized at 25 L/min. In clinical practice, AmBisome[®] is a lyophilised
20 powder that is reconstituted in water and administered by nebulisation to patients. The
21 nebulisation resulted in greater lung deposition (FPF < 5 µm of 95%) (Table 3). However, more
22 than 30% of the lyophilized powder formulation was retained in the Handihaler, probably
23 because it is a formulation intended for parenteral use, and the powder has not been engineered
24 with a view to DPI delivery (Fig. 4).

25

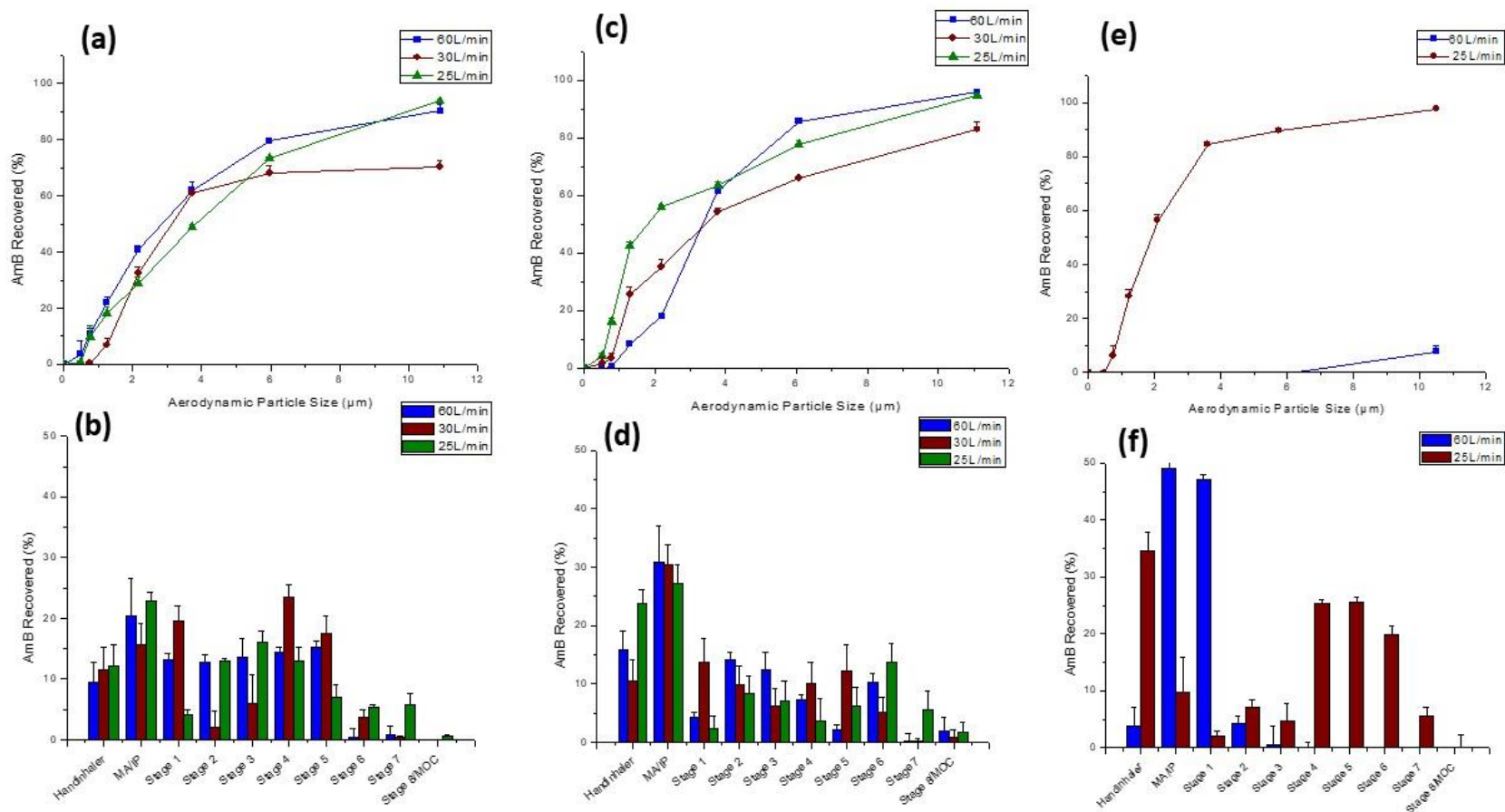
26 **Table 3. FPF below 5 and 3 µm and MMAD for F1, F2 and AmBisome[®] at the three different conditions:**
27 **DPI at 60 L/min for 4 s, DPI at 30 L/min for 8 s and nebulization at 25 L/min for 15 min.** Key: NT, not
28 tested.

29

Conditions	F1			F2			Ambisome [®]		
	FPF < 5 µm (%)	FPF < 3 µm (%)	MMAD (µm)	FPF < 5 µm (%)	FPF < 3 µm (%)	MMAD (µm)	FPF < 5 µm (%)	FPF < 3 µm (%)	MMAD (µm)
60 L/min 4 s	81.45	67.16	1.66	79.32	53.27	2.42	4.26	0.43	4.46
SD	3.75	3.39	0.56	3.13	0.91	0.89	0.25	0.17	0.94
30 L/min for 8 s	68.95	52.47	3.48	53.98	42.12	3.28	NT	NT	NT
SD	0.91	2.78	1.23	2.32	5.07	1.42	NT	NT	NT
25 L/min for 15 min	63.84	46.06	3.85	55.11	47.13	4.14	95.80	74.38	2.50
SD	1.12	1.18	2.36	3.92	3.25	1.01	1.32	1.54	1.16

30

31



32

33 **Figure 4. In vitro deposition characteristics of F1, F2 and AmBisome® at different conditions in the NGI: dry powder using 60 L/min for 4 s, dry powder using 30 L/min for 8 s and**
 34 **nebulisation after reconstitution in deionized water at 25 L/min for 15 min.** Key: a) Cumulative drug deposition of F1; b) Percentage of AmB recovered in different stages from F1; c)
 35 Cumulative drug deposition of F2; d) Percentage of AmB recovered in different stages from F2; e) Cumulative drug deposition of AmBisome® at 60 L/min and 25 L/min; f) Percentage of AmB
 36 recovered in different stages from AmBisome® tested at 60 and 25 L/min

13 3.3 Fixed-dose combination DPI containing AmB and Salbutamol Sulfate (SS)

Using the same process and formulation parameters as were used to prepare F2, a fixed-dose combination DPI combining AmB and SS was developed to treat fungal lung infections associated with bronchoconstriction. The incorporation of SS resulted in more spherical particles with rough surfaces. The presence of unencapsulated crystals was not observed (Fig. 5). The aerodynamic performance of the formulation was excellent, with high FPF below 5 and 3 μm (75.9 and 73.8 % respectively, from the Handihaler device at 60 L/min for 4 s), an MMAD of 2.43 μm and a homogeneous deposition of AmB and SS (Fig. 5). The main difference observed in the deposition pattern between the two APIs was the greater percentage recovered of SS in stage 7 compared to AmB which may be advantageous bearing in mind that SS should reach the bronchi to be effective, while AmB should be distributed along the entire respiratory tract where fungal cells are located (Fig S6 in supplementary material).

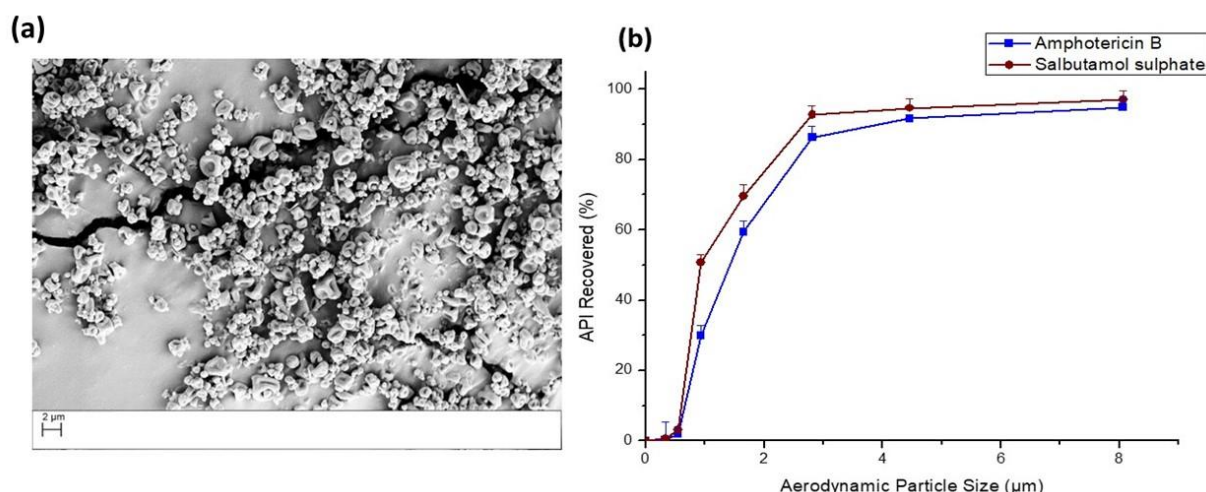


Figure 5. AMB-SS DPI formulation. A) SEM micrographs and (b) Percentage recovered of SS and AmB recovered at 60 L/min for 4 s.

14 3.4 *In vitro* release studies

From 4 h onwards, the dissolution rates for AmB from the F1 and F2 formulations were 2 and 3-fold higher respectively than the unprocessed AmB. The F1 formulation exhibited a supersaturation state at earlier time points, which may be related to the easier wettability of the powder but also the combination of amorphous and crystalline domains (Fig.6).

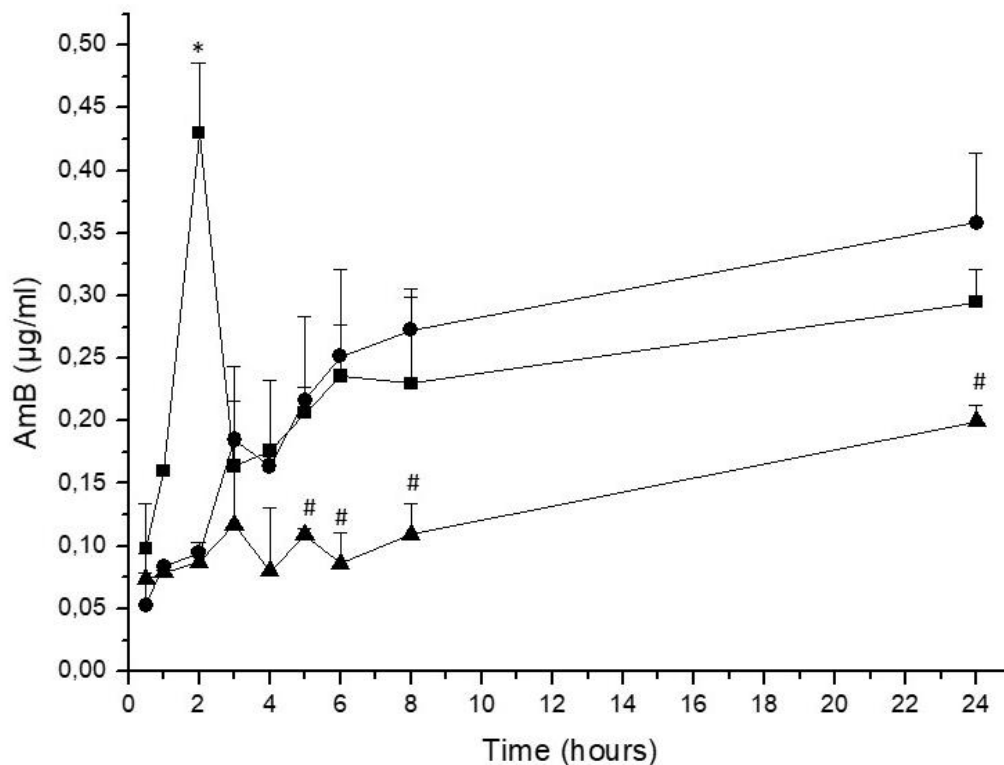


Figure 6 *In vitro* release profile of F1, F2 and unprocessed AmB. Key: -■- F1; -●- F2 and -▲- raw AmB. Statistical differences are represented by * $p < 0.05$ F1 versus F2 and raw AmB; # $p < 0.05$ F1 and F2 versus raw AmB.

15 3.5 *In vitro* antifungal activity

The inhibition zone diameters were measured at points where there was a complete inhibition of yeast growth. The isolates were classified as susceptible (S) to AmB when the inhibition zone was >15 mm, resistant (R) when it was <10 mm and intermediate (I) or susceptible-dose dependent when the inhibition zone was between 11 and 14 mm [5]. The three strains of *Candida* tested were susceptible to the AmB released from F1 and F2 formulations, with an inhibition halo larger than 15 mm. F1 and F2 showed a significantly higher efficacy ($p < 0.05$) than the commercial AmB disks (Neo-Sensitabs®) against *C.albicans* and *C.parapsilopsis* (Fig.7).

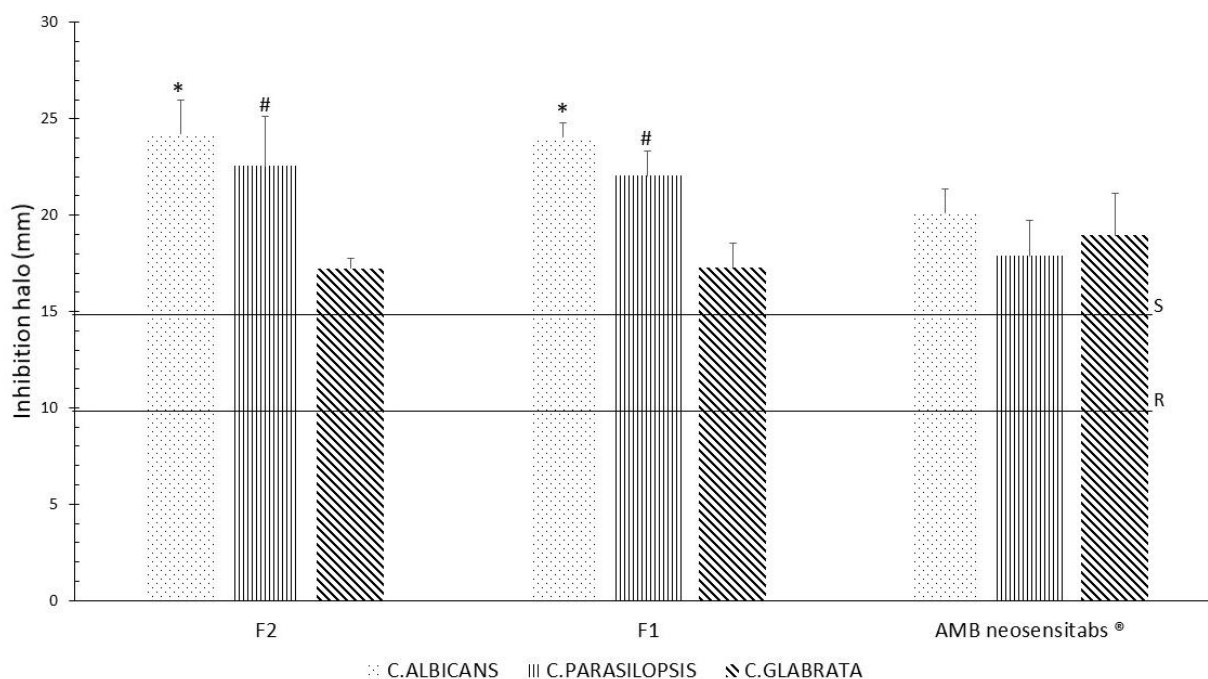


Figure 7. *In vitro* antifungal activity against *Candida* spp. Key: statistical differences ($p < 0.05$) in *C. albicans* and *C. parasilopsis* are represented by * and # respectively compared to commercial AmB Neo-Sensitabs® disks.

16 3.6 *Ex- vivo* red blood cell (RBC)-Haemolysis Studies

In the first study, the haemolytic activity (HC_{50}) of AmB DPI optimised formulations, F1 and F2 was 13.9 $\mu\text{g/ml}$ and 11.3 $\mu\text{g/ml}$ respectively. Both formulations were 2 and 1.6-fold less haemolytic than AmB alone dissolved in DMSO. It is well-known that AmB is a very haemolytic drug, especially in its dimeric or monomeric states [43]. The effect of the excipients (leucine and mannose) on the AmB haemolytic toxicity was studied in more detail in a second experiment. Interestingly, the second study revealed that leucine and mannose had a protective effect on red blood cells only when used in combination at a 1:1 (w:w) ratio, but not separately, both for monomeric and dimeric AmB (Fig. 8). This could explain why the F1 and F2 formulations exhibited a lower haemolytic toxicity compared to AmB dissolved in DMSO (monomeric state).

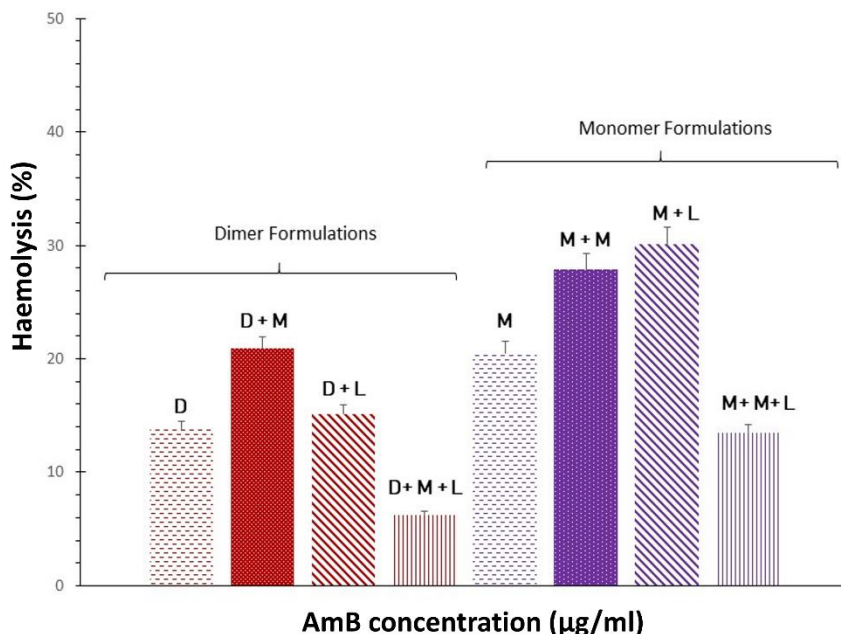


Figure 8. *In vitro* haemolysis of dimeric AmB formulations (tested at 62.5 µg/ml) and monomeric formulations tested at 25 µg/ml. Key: dimer (D); dimer + mannose (D+M); dimer + leucine (D+L); dimer+ leucine+ mannose (D+M+L); monomer (M); monomer + mannose (M+M); monomer+ leucine (M+L) and monomer +mannose and leucine (M+M+L).

17 3.7 *In vitro* activity against *Leishmania* promastigotes and cytotoxicity against macrophages

F1 and F2 exhibited a similar activity against *Leishmania infantum* with IC_{50} values of 0.534 ± 0.076 µg/ml and 0.312 ± 0.036 µg/ml respectively. However, F2 exhibited 3-fold greater *in vitro* activity against *Leishmania donovani* (IC_{50} of 0.84 ± 0.51 µg/ml versus 2.62 ± 0.54 µg/ml of F1). Both F1 and F2 formulations showed very low cytotoxicity against murine macrophages with a CC_{50} of 191.30 ± 12.38 µg/ml and 230.23 ± 71.85 µg/ml respectively, resulting in a very promising selectivity index against both *Leishmania* spp. (higher than 73 for F1 and higher than 273 for F2).

18 3.8 Macrophages uptake studies

The *in vitro* uptake profile of AmB-DPI optimised formulations in differentiated J77A cells was markedly different from dimeric AmB. F1 exhibited a 5 and 8-fold higher uptake than F2 at 4 and 24 h ($p < 0.05$) and 5 and 14-fold higher than dimeric AmB at the same time points ($p < 0.05$). F2 uptake was similar to dimeric AmB except at longer time points (24 h) ($p < 0, 05$) (Fig. 9a). At 1 h, no statistically significant differences were observed amongst the three formulations when tested at intermediate concentrations (0.4- 1.56 µg/ml). However, differences between the formulations were clearly noticeable at low (0.2 µg/ml) and high

concentrations (3.125 $\mu\text{g/ml}$). F1 showed a prominent faster uptake at low concentrations compared to F2 and dimeric AmB, which may be related to its larger particle size in dispersion (20-fold greater), making the F1 formulation more attractive for macrophage uptake (Fig. S7, Supplementary material). Dimeric AmB showed a sharp decrease in uptake at high concentrations. This may be the result of a saturation process. However, both F1 and F2 formulations contain mannose which can bind to the receptors located on the surface of the macrophages and overall, enhance macrophage uptake even at higher concentrations.

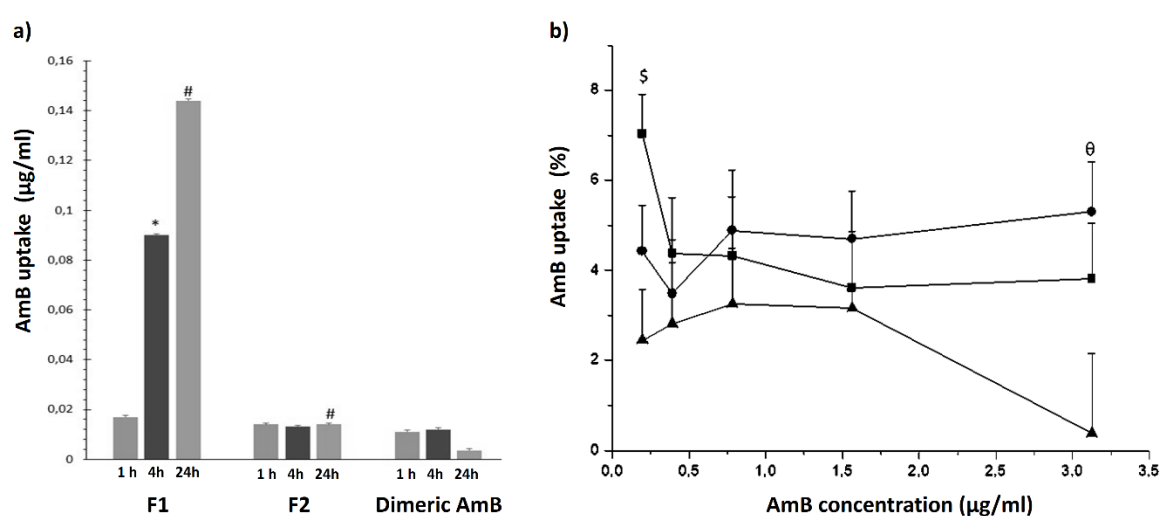


Figure 9. *In vitro* macrophage uptake. (a) Uptake in macrophages using an AmB concentration of 1.56 $\mu\text{g/ml}$ AmB at 1, 4 and 24 h. Key: Statistical differences * $p < 0.05$ versus F2 and dimeric AmB, # $p < 0.05$ versus dimeric AmB. (b) Uptake at different AmB concentrations after 1 h of incubation. Key: -■- F1; -●- F2 and -▲- Dimeric AmB. § $p < 0.05$ F1 versus F2 and dimeric AmB; θ $p < 0.05$ F2 versus dimeric AmB.

3.9. Pharmacokinetic profile

The pharmacokinetic profile of F1 and F2 after intratracheal administration at 5 mg/kg is illustrated in Fig 10. Greater concentrations of AmB remained for prolonged periods of time in the ELF after F1 administration compared to F2 which can be attributed to the semicrystalline nature of the F1 material and larger particle size in liquid dispersion. In contrast, F2 due to its amorphous nature is more water soluble being more permeable across the pulmonary epithelial cells and hence, getting eliminated faster. In both formulations, total plasma concentrations above 1 $\mu\text{g/ml}$ were maintained for at least 24 h, indicating that a single daily pulmonary administration would be enough to elicit a prophylactic or therapeutic effect against *Aspergillus* spp. [44, 45].

In contrast, AmB total plasma levels dropped quickly after the intravenous administration of AmBisome® (<1 µg/ml at 4 h) explaining the lack of efficacy of this medicine when parenterally administered in critical ill patients (Fig. 10). This may explain why initial therapy with voriconazole is preferred over AmBisome®, as the former has led to better responses and improved survival rates, and is associated with fewer severe side effects [46].

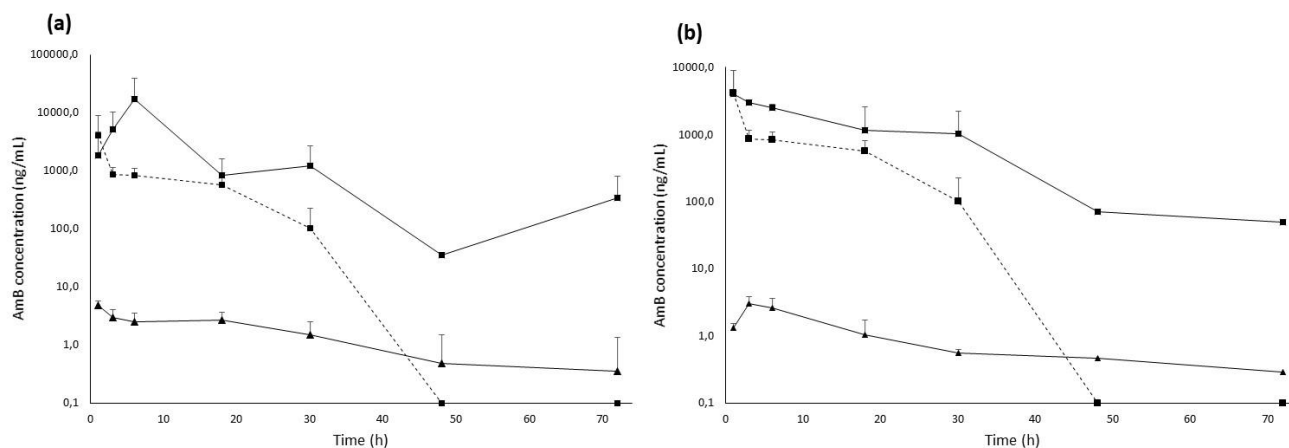


Figure 10. Pharmacokinetic profile after intratracheal administration of F1 and F2 at 5 mg/kg in OFA-rats (a) F1 and (b) F2 compared with the iv administration of AmBisome® (5 mg/kg). Key: --■-- AmBisome®, -■- AmB concentration in ELF, -▲- AmB concentration in total plasma.

19 3.10 Stability Studies

According to the modified Arrhenius equation, unprocessed crystalline AmB had an activation energy of 34.3 ± 5.4 kcal/mol. In contrast, F1 had a higher activation energy (44.4 ± 5.4 Kcal/mol), indicating that greater energy is required to promote its chemical degradation while F2's activation energy was lower (13.6 ± 1.9 kcal/mol) and indicated poorer chemical stability over time. Experimental data demonstrated that both F1 and F2 formulations were stable over two years (> 90% drug content) under refrigerated and relatively dry conditions (10% RH). However, F1 was significantly more stable over time compared to F2 at room temperature (Fig. 11). In all cases, both formulations were sensitive to moisture (data not shown) and hence, a moisture protective packaging would be required to prolong their shelf-life. The different degradation kinetic models that best fit the data for F1 and F2 can explain the differences observed in terms of long-term stability. AmB in F2 is degraded following a first order degradation. However, the degradation of AmB in F1 is better explained by an Avrami kinetic model which is pseudo-first order kinetics, consisting of a period of no degradation followed by a quick degradation process (Table S3 in Supplementary material). This may be attributed

to the more crystalline nature of F1 which allows the drug to be stabilised in the crystalline domains before the degradation process starts.

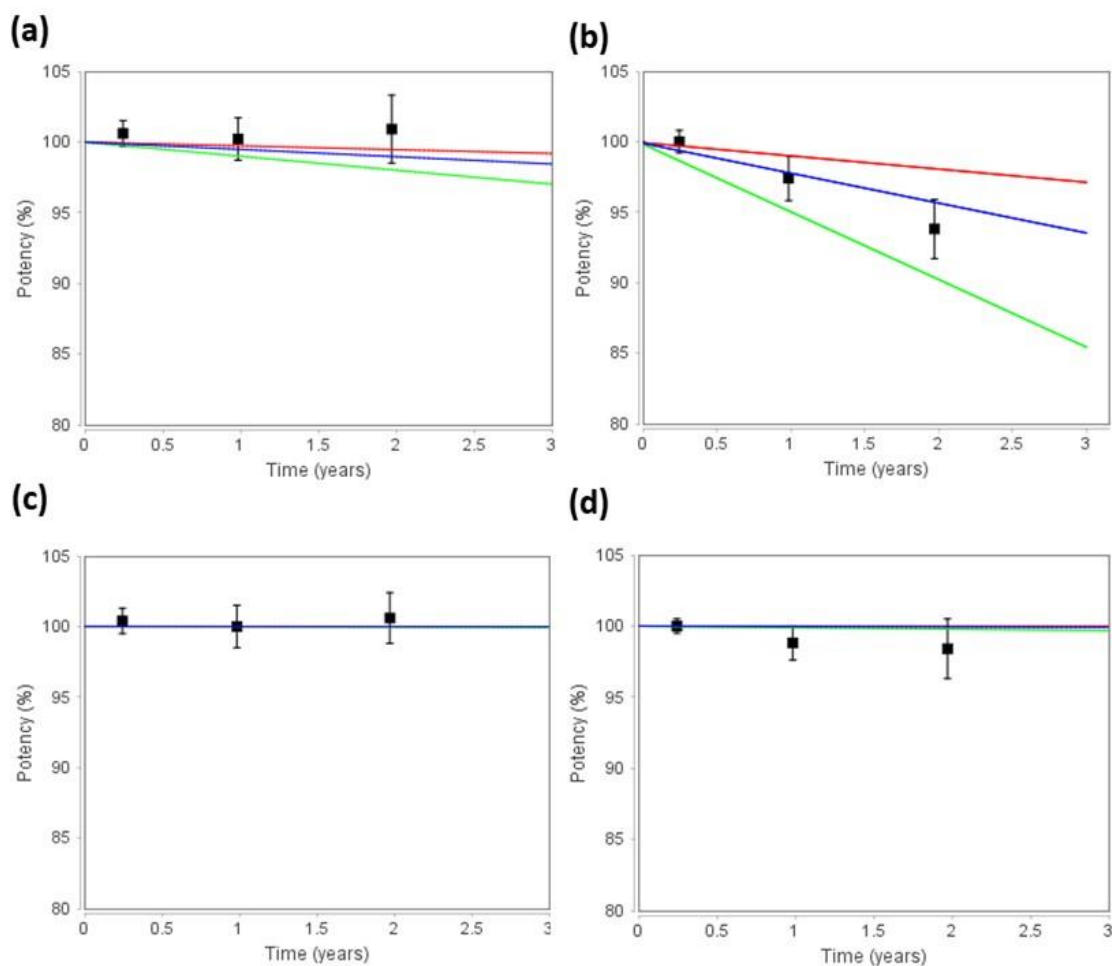


Figure 11. Predicted vs experimental long term stability results (over 3, 12 and 24 months) of F1 and F2 DPIs. Key: (a) F1 at 25°C/10% RH, (b) F2 at 25°C/10% RH (c) F1 at 4°C/10% RH and (d) F2 at 4°C/10% RH. Key: -■- Experimental data points. Blue line represents the predicted mean stability at a certain condition and the red and green lines display 95% confident intervals.

4. Discussion

The application of QbD and DoE to the development of a pulmonary AmB formulation has resulted in F1 and F2 optimised AmB DPI formulations, manufactured from Generally Regarded as Safe (GRAS) excipients with suitable aerodynamic particle size for lung deposition. Both formulations were prepared by spray drying and contain a 1:1 AmB:CD

weight ratio, a similar content of leucine (10-13 %), but a markedly different amount of mannose (5-fold greater for F1 compared to F2).

The excipients were carefully chosen for the preparation of these AmB DPI formulations. CD was selected preferentially over DOC due to its safety profile and also to because of its ability to solubilise and diffuse across mucus, which can act as a barrier hampering drug efficacy in pulmonary infections [47]. Also, CD possesses the ability to remove the biofilm formed by bacteria/fungal cells [48]. Cyclodextrins, at high doses, can increase drug permeability by a direct action on mucosal membranes, can enhance drug bioavailability due to the formation of hydrophilic complexes with AmB and can cause perturbation of membrane integrity. Unlike detergents, cyclodextrins solubilise membrane components without entering into the membrane, and therefore their perturbing effects are mild and reversible [49]. In spite of their low absorption via mucosal membranes, cyclodextrins may also facilitate their own absorption at high concentrations. Therefore, it is not advisable to administer doses above 20 mg/kg [50]. Based on this fact and the results from previous solubility studies with AmB in which at least a 1:50 AmB:CD ratio was required to keep the drug solubilised in aqueous media [5], three different levels of AmB:CD were tested. 1:1, 1:50 and 1:100. DoE studies showed a better performance of the formulation when the lowest AmB:CD weight ratio (1:1) was used. In this condition, in the liquid state, the AmB will be partially solubilised within the CD. This promotes a dynamic equilibrium between aggregated and solubilised AmB by forming inclusion complexes and interplanar H-bonding interactions [51]. The partial solubilisation of the AmB can result in a fast action derived from the solubilised drug and a controlled release and prolonged retention in the respiratory tract from the unsolubilised fraction. In our opinion, this equilibrium is preferred for longer efficacy over having the drug totally solubilised. In light of this equilibrium, linked to the fact that lower doses of CD are required to avoid toxicity, the 1:1 AmB:CD weight ratio was considered the most suitable for the development of a pulmonary AmB formulation.

In order to improve the flowability and aerosolisation performance, L-leucine was incorporated in the formulation. Previous studies have demonstrated the anti-adherent properties conferred by leucine which can be associated to the formation of particles with appropriate corrugation during spray drying [52, 53]. Corrugated particles were observed in the SEM micrographs for both F1 and F2. However, it was critical to know the percentage required within the formulation to obtain easy-flowing particles but at the same time, not to dilute the overall AmB load, taking

into account that doses required to treat pulmonary aspergillosis can be high. The percentage of leucine required to keep optimal aerodynamic flow properties in F1 and F2 DPI powder formulations ranged from 10 to 13%, which is low considering the amounts previously reported by other authors (up to 60% of the total formulation weight) [54, 55]. Apart from improving the flow properties, leucine was introduced into the DPI formulations to overcome hygroscopicity issues and to protect the formulations against moisture-induced changes [56]. In fact, F2, which contains 2% more leucine than F1 showed a less pronounced water uptake in the DVS isotherm profile. Leucine is a hydrophobic amino acid, considered to be safe for use as an excipient in pulmonary formulations. The reason behind its ability to reduce moisture uptake is due to its enrichment at the particle surface of particles during the spray drying process, providing a shell or barrier to moisture ingress [57, 58].

The third key excipient incorporated in the DPI formulations was mannose, a hexose carbohydrate, due to its chemotactic behaviour. It is well-known that glycoproteins influence T cell immune responses to a wide variety of antigens. The polysaccharide-rich cell wall in fungi is the main source of pathogen-associated molecular patterns which are recognised by carbohydrate-binding receptors (CBR), highly expressed on front-line immune cells, mainly macrophages (macrophage mannose receptor) and dendritic cells [59]. Recognition of fungal-surface polysaccharides initiates immediate responses such as phagocytosis, production of antimicrobial compounds and induction of pro-inflammatory cytokines that recruit other immune cells [60]. CBR affinity for sugars is diverse, but mannose is the most common monosaccharide recognized by this receptor [61], and for this reason was chosen as an excipient bearing in mind that, to clear a fungal respiratory infection, a combined action between the drug and the immune system is necessary.

An additional advantage of incorporating mannose into the formulation relates to its potential use for the treatment of visceral leishmaniasis. *Leishmania* is an intracellular parasite which accumulates inside macrophages, leading to a mortal disease if left untreated. This disease affects people from low-income countries in particular, and its effective treatment currently relies on parenterally administered medicines as well as miltefosine, a teratogenic oral formulation [36]. The lack of non-parenteral effective and safer treatments indicates a major clinical need exists. Several novel oral formulations are under development [6]; however, there are still in preclinical or clinical status. The current work, represents the first time the

pulmonary co-administration of AmB, a highly potent drug against *Leishmania* [62] and mannose (a chemotactic molecule for macrophages) has been proposed for the treatment of leishmaniasis. Further studies need to be performed to investigate accumulation in the main target organs, liver and spleen. However, the pulmonary administration of AmB could be of great therapeutic advantage to patients with post Kala azar leishmaniasis in which case parasites are disseminated in the body reaching pulmonary septa, alveoli and bronchoalveolar fluid [63, 64].

From a pharmacotechnical point of view, mannose acted as a switch from amorphous to semi-crystalline AmB powder formulations. In fact, the main difference between the composition of F1 and F2 is the percentage of mannose. The use of a low percentage of mannose in F2 (AmB:mannose, 1:0.2, W:W) resulted in an AmB composite material that was amorphous in nature, while greater ratios of mannose employed in F1 (1:1, AmB:mannose) triggered partial AmB crystallisation leading to a semi-crystalline formulation. The difference in amorphous or semi-crystalline solid state between F1 and F2 was demonstrated to have a large impact on the physicochemical properties of the DPI powder. It is worth highlighting that F1 is a less cohesive powder with easier wettability, higher supersaturation at earlier time points in aqueous medium, greater chemical stability (> 2 years at room temperature) and a more robust lung deposition at different air flow rates, compared to F2. In contrast, F2, due to its amorphous nature, is more sensitive under storage to chemical degradation and aggregation. This can explain the differences observed in the lung deposition at the different air flow rates and the higher retention in the Handihaler device and upper regions of the impactor apparatus such as the mouthpiece adaptor and the induction port.

Overall, a robust lung deposition pattern with small differences at different air flow rates is key for the success of an AmB pulmonary DPI formulation, taking into account that most patients would suffer from respiratory infections and in many cases their breathing capacity may be compromised. For this reason, a fixed-dose combination DPI powder containing AmB and SS was also developed, designed, in particular, for those patients in critical care that may require both an antifungal and a bronchodilator drug.

The particle size of F1 when dispersed in aqueous medium is much larger than F2 which explains the greater retention in the ELF after intratracheal administration and the enhanced macrophage uptake. However, F2 has a smaller particle size upon reconstitution which facilitates permeability across the epithelial lung cells, providing a faster decrease in AmB

levels in the ELF after pulmonary administration. Nevertheless, the AmB levels in the respiratory tract for both formulations were much greater than those achieved by parenterally administered AmBisome[®]. This shows the need to tailor drug formulations for the required administration route, especially in the case of AmB where the off-targeted side effects on tissues such as kidneys can lead to the suppression of the therapy. The dual combination of mannose and leucine resulted in a reduction in the second more severe adverse effect caused by AmB, haemolysis. The reduced haemolytic toxicity of F1 and F2 along with prolonged retention time (> 24 h) in the respiratory tract with concentrations above the IC₅₀ against *Aspergillus* [45] are a great therapeutic advantage compared to other current treatments employed in clinical practice for pulmonary fungal infections.

To date, most clinical trials concerning AmB pulmonary administration have been focused on the safety and efficacy of inhaled lipidic marketed AmB formulations (AmBisome[®] and Abelcet[®]). These formulations are intended for parenteral use and they are employed off-label after reconstitution, by nebulisation for the prevention or treatment of pulmonary aspergillosis colonisation [65]. However, experience with inhaled antibiotics designed for parenteral administration showed that these formulations can cause significant bronchial irritation due to the use of non-pulmonary physiological excipients in their composition such as high content of dextrose required for lyophilisation [66]. Previous studies have pointed to the fact that manufacturing of AmB liposomes by reverse-phase evaporation using organic solvents may be responsible for the potential toxicity of the inhaled powder, due to residual solvents in the formulation, and that furthermore, the low AmB loading capacity of such liposome formulations may make them ineffective in the treatment of fungal lung infections [67].

Not only is there a clinical need for antifungal DPI formulations, but there also exists a need for combined DPI formulations for the treatment of fungal pulmonary infections and bronchoconstriction. This need is demonstrated by the clinical trials that are currently ongoing. For maintenance of remission in allergic broncho-pulmonary aspergillosis, a randomized controlled trial of inhaled nebulized AmB (10 mg) and nebulized budesonide (1 mg) administered twice a day, three times a week over 4 months has been approved [68]. Even though, clinical results have not been published yet, this proves the clinical need for an inhaled combined therapy, as there is currently no marketed fixed dose combination DPI product for this purpose.

5. Conclusions

The combination of AmB-CD-leucine and mannose in appropriate amounts has led to the development of effective and safer DPI formulations for the treatment of pulmonary fungal infections. The F1 optimised semicrystalline formulation, consisting of 29.8% AmB, 29.8% γ -CD, 29.8% mannose and 10.4% leucine, showed a greater FPF below 5 and 3 μm at different air flow rates, longer stability at refrigerated and room temperature conditions and higher retention times after intratracheal *in vivo* administration compared to the F2 amorphous formulation. Also, the F1 formulation exhibited a larger macrophage uptake, which could be of great benefit in the treatment of disseminated visceral leishmaniasis affecting the lung. Both optimised formulations are versatile and easily adapted to patients' needs as they have shown good *in vitro* deposition patterns from both a DPI and, after reconstitution, a nebuliser. The development of the fixed dose AmB-SS combination DPI formulation is an interesting approach for the treatment of fungal pulmonary infections that cause or co-exist with bronchoconstriction.

Acknowledges

This study was partially supported by the Complutense University of Madrid and Science Foundation Ireland grants co-funded under the European Regional Development Fund (SFI/12/RC/2275 and SFI/12/RC/2275_P2) awarded to Prof. A. M. Healy. This work has benefited from the facilities and expertise of PREBIOS platform (University of Poitiers).

Supplementary data**Design of an Amphotericin B dry powder inhaler formulation for the treatment of pulmonary fungal infections and leishmaniasis - Manipulating solid state form to alter lung deposition and macrophage uptake**

E. de Pablo ^a, P. O'Connell ^b, R. Fernández-García ^a, S. Marchand ^{c,d}, A. Chauzy ^c, M.A. Dea-Ayuela ^e, Dinehs Kumar ^f, F. Bolás ^g, M.P. Ballesteros ^{a,h}, J.J. Torrado ^{a,h}, A.M. Healy ^b, D.R. Serrano ^{a,h*}

^a Pharmaceutics and Food Technology Department, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

^b School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland.

^c UMR 1070, Université de Poitiers Pôle Biologie Santé, 1 Rue Georges Bonnet, 86073 Poitiers, France.

^d Laboratoire de Toxicologie-Pharmacocinétique. CHU de Poitiers. 2 Rue de la milétrie, 86021 Poitiers, France.

^e Pharmacy Department, School of Life Sciences, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Moncada, 46113 Valencia, Spain.

^f Department of Pharmaceutical Engineering & Technology, Indian Institute of Technology (Banaras Hindu University), Varanasi, India.

^g Parasitology Department, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

^h Instituto Universitario de Farmacia Industrial. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain

*Corresponding author:

Pharmaceutics and Food Technology Department
School of Pharmacy
Universidad Complutense de Madrid
Plaza Ramon y Cajal s/n
28040-Madrid, Spain.
Email: drserran@ucm.es

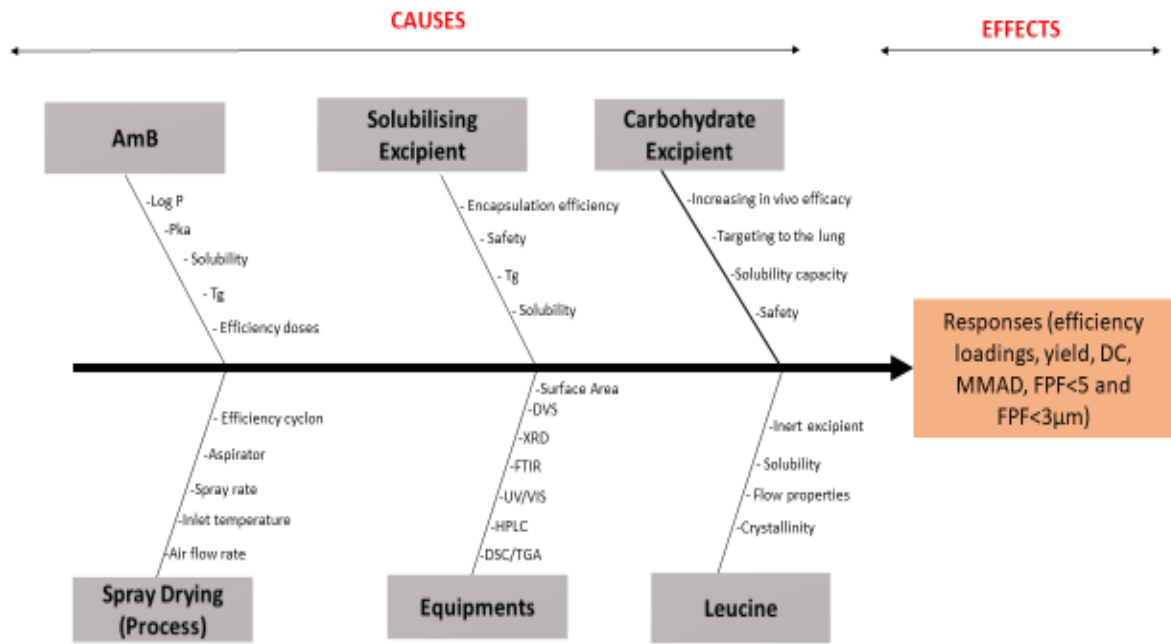


Figure S1. Fish bone diagram. Structured risk operation for determining the causes and sub-causes affecting the CQAs.

Table S1. Design matrix for AmB pulmonary dry powder as per the Taguchi design. Key: CD, γ -cyclodextrin, DOC, sodium deoxycholate.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Response 1	Response 2	Response 3	Response 4	Response 5
Run	Air flow (NI/h)	Aspirator (%)	Spray rate (%)	Inlet Temperature (°C)	AmB concentration (%)	Type of solubilising excipient	Type carbohydrate excipient	Medium size D50 (μ m)	Yield (%)	Water residual (%)	Encapsulation efficiency (%)	Degree of crystallinity (%)
1	400	85	15	110	0.0625	CD	Raffinose	6.687	42	8.703	104.38	2.12
2	400	100	40	110	0.0625	DOC	Mannose	3.528	0.38	8.928	0.3728	3.17
3	800	85	40	110	0.125	CD	Mannose	4.506	58	8.931	108.85	1.56
4	800	100	15	175	0.0625	CD	Mannose	6.030	73	8.78	99.75	1.95
5	400	100	40	175	0.125	CD	Raffinose	9.191	42	10.119	111.04	1.73
6	800	85	40	175	0.0625	DOC	Raffinose	2.589	12.32	8.836	83.32	1.87
7	800	100	15	110	0.125	DOC	Raffinose	3.192	0.40	7.975	0.2927	4.56
8	400	85	15	175	0.125	DOC	Mannose	2.998	26.02	9.491	67.28	2.31

Table S2. Box-Behnken design matrix for dried powder formulations.

Run	Factor 1 AmB:CD ratio	Factor 2 AmB:Mannose ratio	Factor 3 AmB:Leucine (%)	Response 1 Yield (%)	Response 2 MMAD µm	Response 3 Water residual (%)	Response 4 Encapsulation efficiency (%)	Response 5 Crystallinity (%)
1	1	1	10	72	2.422	6.8	88.63	43.55
2	50.5	0.6	10	59	1.892	8.3	67.60	0
3	50.5	1	5	70	3.420	9.3	69.73	0
4	50.5	0.6	10	62	2.339	8.3	40.20	0
5	50.5	0.6	10	59	2.103	8.5	58.3	0
6	1	0.6	5	58	2.230	6.9	75.25	54.38
7	100	0.6	15	50	1.950	8.1	62.82	0
8	50.5	0.6	10	66	2.003	8.1	62.69	0
9	100	0.6	5	68	3.073	8.7	84.64	0
10	100	0.2	10	65	2.146	7.5	86.84	0
11	50.5	0.6	10	65	2.202	6.6	63.4	0
12	50.5	0.2	5	70	2.304	7.0	51.75	0
13	50.5	0.2	15	59	1.784	6.8	80.59	0
14	100	1	10	66	2.540	7.9	84.97	0
15	1	0.2	10	71	1.937	8.2	75.16	8.24
16	50.5	1	15	55	1.737	6.0	51.55	0
17	1	0.6	15	62	2.136	6.7	84.7	12.45

Equations S1. The Anova predicted equations for each DOE final responses: MMAD, Yield and DC.

$$\begin{aligned} MMAD = & 1.19317 + 0.013568 \times CD + 2.12053 \times Mannose + 0.054214 \times Leucine \\ & - 1.14899e^{-003} - 1.0393e^{-003} \times CD \times Leucine - 0.14537 \times Mannose \\ & \times Leucine \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Yield = & 57.5257 + 0.013947 \times CD - 34.25000 \times Mannose + 3.50222 \times Leucine \\ & - 9.03027e^{-017} \times CD \times Leucine - 0.022222 \times CD \times Leucine \\ & + 4.69340e^{-004} \times CD^2 + 32.18750 \times Mannose^2 - 0.15400 \times Leucine^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} DC = & 11.03323 - 0.45558 \times CD + 91.24079 \times Mannose - 1.41522 \times Leucine - \\ & 0.44583 \times CD \times Mannose + 0.042354 \times CD \times Leucine - 4.56231 \times \\ & Mannose \times Leucine. \end{aligned}$$

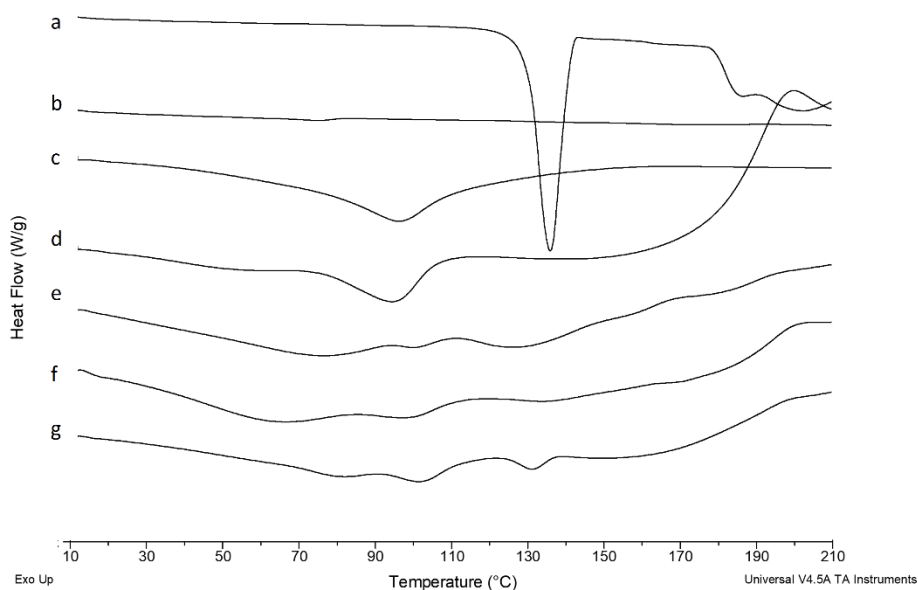


Figure S2. DSC Thermograms of unprocessed raw materials, F1 and F2 DPIs. Key: a) unprocessed mannose, b) unprocessed L-leucine, c) unprocessed γ -cyclodextrin, d) unprocessed AmB, e) F1 DPI formulation, f) F2 DPI formulation and g) physical mixture of F2 formulation.

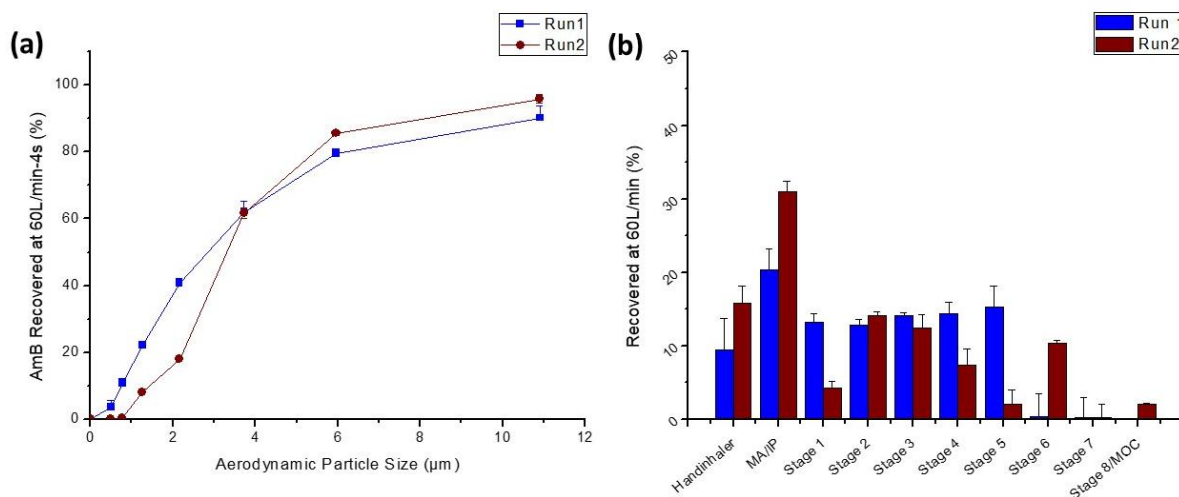


Figure S3: MMAD of optimized F1 (run 1) and F2 (run 2) at 60 L/min for 4 seconds.

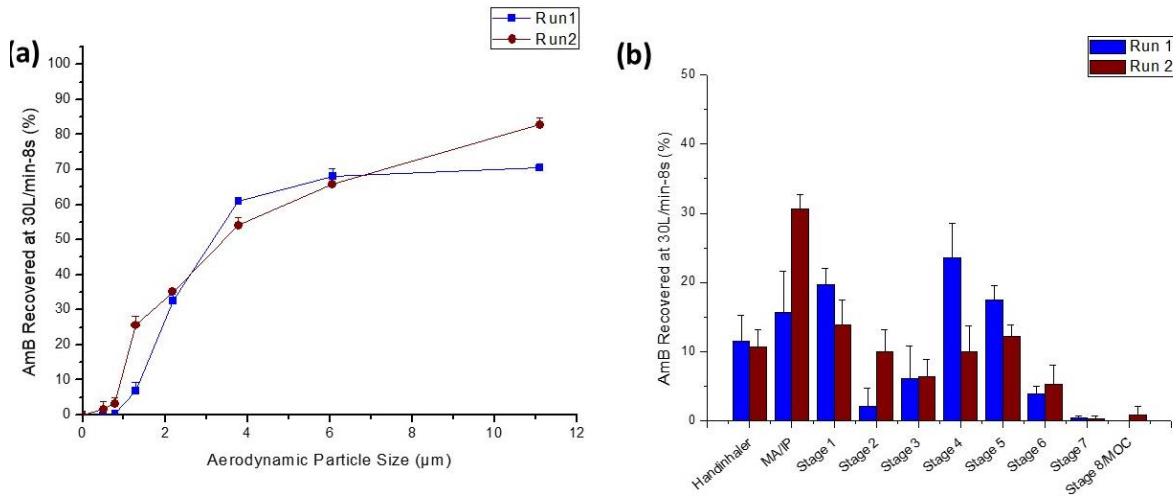


Figure S4: MMAD of optimized F1 (run 1) and F2 (run 2) at 30L/min for 8 seconds.

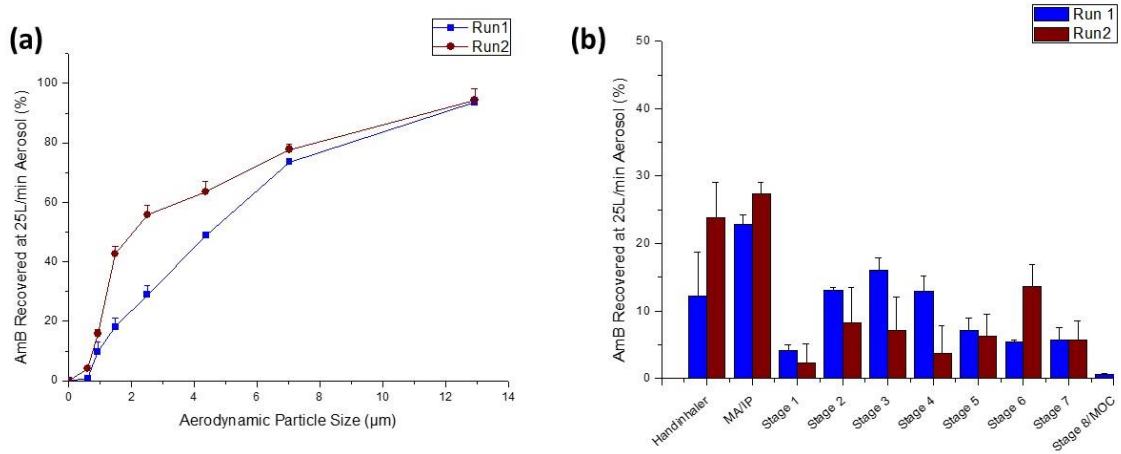


Figure S5: MMAD of optimized F1 (run 1) and F2 (run 2) at 25 L/min by nebulization.

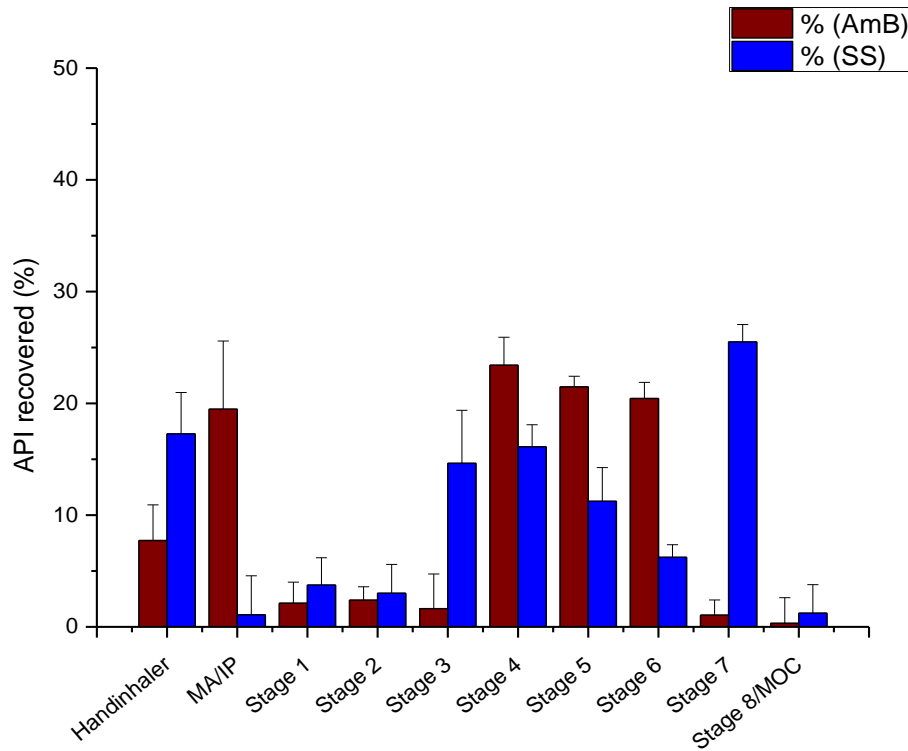


Figure S6: Percentage of AmB and SS recovered in different stages after *in vitro* lung deposition at 60 L/min for 4 s.

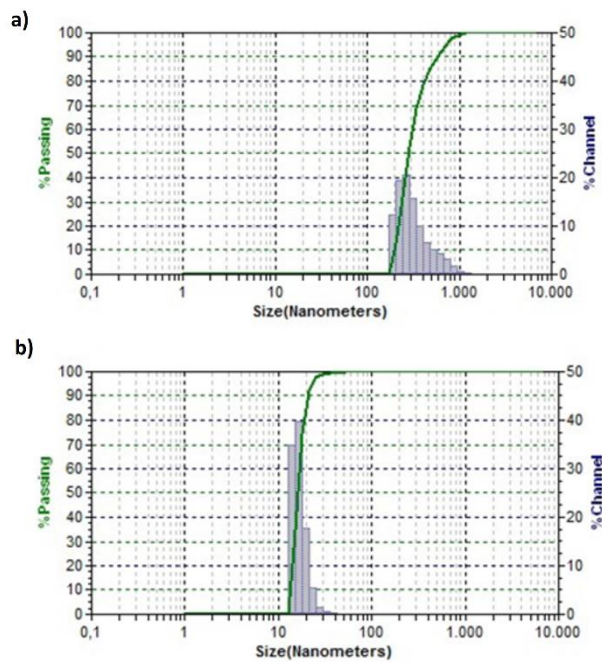


Figure S7: Particle size of F1 (a) and F2 (b) after reconstitution in deionised water at 25 µg/ml AmB concentration. Particle size was analysed by DLS with a Zetatrac Ultra (microtrac Inc, uSA). Mean size (nm) was determined based on size distribution in number. Five runs of 60 s per sample were carried out.

Table S3. Shelf-life prediction from accelerated stability studies. Shelf-life prediction was calculated considering a mean temperature of 4 °C and 10% relative humidity. Key: Ea, activation energy and B, humidity sensitivity factor.

Chemical Stability - Arrhenius equation parameters			
	AmB raw material (Crystalline AmB)	AmB Sample 1 (Crystalline AmB)	AmB Sample 2 (Amorphous AmB)
LnA	52.2 ± 6.5	71.8 ± 7.9	19.2 ± 2.7
Ea (Kcal/mol)	34.3 ± 4.4	44.5 ± 5.4	13.1 ± 1.9
B	0.042 ± 0.012	0.038 ± 0.008	0.034 ± 0.004
R ²	0.89	0.998	0.891
Kinetic Model	First order	Avrami	First order
Self-life at 4°C/ 10% RH	> 2 years	> 2 years	> 2 years

References

1. de Pablo, E., et al., *Nebulised antibiotherapy: conventional versus nanotechnology-based approaches, is targeting at a nano scale a difficult subject?* Ann Transl Med, 2017. **5**(22): p. 448.
2. *Orphan designation: Amphotericin B (for inhalation use) for: Prevention of pulmonary fungal infection in patients deemed at risk.* EMA 28/08/2006 updated [cited <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu306391>].
3. Chenoweth, C.E., et al., *Acquired immunodeficiency syndrome-related visceral leishmaniasis presenting in a pleural effusion.* Chest, 1993. **103**(2): p. 648-9.
4. Ordonez-Gutierrez, L., et al., *In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of Leishmania infantum.* Int J Antimicrob Agents, 2007. **30**(4): p. 325-9.
5. Ruiz, H.K., et al., *New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and Leishmania spp.* Int J Pharm, 2014. **473**(1-2): p. 148-57.
6. Serrano, D.R., et al., *Oral particle uptake and organ targeting drives the activity of amphotericin B nanoparticles.* Mol Pharm, 2015. **12**(2): p. 420-31.
7. DrugPatentWatch, *Drug Patent Expirations and Intelligent Drug Patent Watch.* <http://www.drugpatentwatch.com>, 27/09/2010.
8. EMA., I.M.A.a., https://www.ema.europa.eu/en/medicines?search_api_views_fulltext=INHALED+MEDICINES. Accessed date: 29/04/2018.
9. Berkenfeld, K., A. Lamprecht, and J.T. McConville, *Devices for dry powder drug delivery to the lung.* AAPS PharmSciTech, 2015. **16**(3): p. 479-90.
10. Sosnowski, T.R., *Selected Engineering and Physicochemical Aspects of Systemic Drug Delivery by Inhalation.* Curr Pharm Des, 2016. **22**(17): p. 2453-62.
11. Dickinson, P.A., S.W. Howells, and I.W. Kellaway, *Novel nanoparticles for pulmonary drug administration.* J Drug Target, 2001. **9**(4): p. 295-302.
12. Vartiainen, V., et al., *Pulmonary administration of a dry powder formulation of the antifibrotic drug tilorone reduces silica-induced lung fibrosis in mice.* Int J Pharm, 2018. **544**(1): p. 121-128.
13. Rijnders, B.J., et al., *Aerosolized liposomal amphotericin B for the prevention of invasive pulmonary aspergillosis during prolonged neutropenia: a randomized, placebo-controlled trial.* Clin Infect Dis, 2008. **46**(9): p. 1401-8.
14. Paranjpe, M. and C.C. Muller-Goymann, *Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review.* Int J Mol Sci, 2014. **15**(4): p. 5852-73.
15. Chono, S., et al., *Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes.* J Drug Target, 2006. **14**(8): p. 557-66.
16. B. Lamy, D.R.S., P. O'Connell, W. Couet, S. Marchand, A. M Healy F.Tewes, *Use of leucine to improve aerodynamic properties of ciprofloxacin-loaded maltose microparticles for inhalation* European Journal of Pharmaceutical Research, 2019. **1**(1): p. 2-11.
17. B. Guebitz, H.S., J.G. Khinast, *A risk management ontology for Quality-by-Design based on a new development approach according GAMP 5.0.* Expert Syst Appl 2012. **39**: p. 7291-7301.

18. Walsh, D., et al., *Engineering of pharmaceutical cocrystals in an excipient matrix: Spray drying versus hot melt extrusion*. Int J Pharm, 2018. **551**(1-2): p. 241-256.
19. Fernandez-Garcia, R., et al., *Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: The role of amphotericin B and drug targeting*. Int J Pharm, 2017. **525**(1): p. 139-148.
20. Salzano, G., et al., *Cyclodextrin-based nanocarriers containing a synergic drug combination: A potential formulation for pulmonary administration of antitubercular drugs*. Int J Pharm, 2017. **531**(2): p. 577-587.
21. Serrano, D.R., et al., *Modelling and shadowgraph imaging of cocrystal dissolution and assessment of in vitro antimicrobial activity for sulfadimidine/4-aminosalicylic acid cocrystals*. Eur J Pharm Sci, 2016. **89**: p. 125-36.
22. Antony J. Cutler, K.A.D., *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*. 1998.
23. Rojek, B. and M. Wesolowski, *FTIR and TG analyses coupled with factor analysis in a compatibility study of acetazolamide with excipients*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2019. **208**: p. 285-293.
24. Serrano, D.R., et al., *Designing Fast-Dissolving Orodispersible Films of Amphotericin B for Oropharyngeal Candidiasis*. Pharmaceutics, 2019. **11**(8).
25. Rolon, M., et al., *Engineering Oral and Parenteral Amorphous Amphotericin B Formulations against Experimental Trypanosoma cruzi Infections*. Mol Pharm, 2017. **14**(4): p. 1095-1106.
26. Curtin, V., et al., *Reducing mechanical activation-induced amorphisation of salbutamol sulphate by co-processing with selected carboxylic acids*. Int J Pharm, 2013. **456**(2): p. 508-16.
27. Grossjohann, C., et al., *Polymorphism in sulfadimidine/4-aminosalicylic acid cocrystals: solid-state characterization and physicochemical properties*. J Pharm Sci, 2015. **104**(4): p. 1385-98.
28. Park, C.W., et al., *Advanced spray-dried design, physicochemical characterization, and aerosol dispersion performance of vancomycin and clarithromycin multifunctional controlled release particles for targeted respiratory delivery as dry powder inhalation aerosols*. Int J Pharm, 2013. **455**(1-2): p. 374-92.
29. Corrigan, D.O., A.M. Healy, and O.I. Corrigan, *Preparation and release of salbutamol from chitosan and chitosan co-spray dried compacts and multiparticulates*. Eur J Pharm Biopharm, 2006. **62**(3): p. 295-305.
30. Ader, F., et al., *Invasive pulmonary aspergillosis in chronic obstructive pulmonary disease: an emerging fungal pathogen*. Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(6): p. 427-9.
31. Broeders, M.E., et al., *Salbutamol pMDI gives less protection to methacholine induced airway obstruction than salbutamol via spacer or DPI*. Eur J Clin Pharmacol, 2005. **60**(12): p. 837-41.
32. Tewes, F., et al., *Ciprofloxacin-Loaded Inorganic-Organic Composite Microparticles To Treat Bacterial Lung Infection*. Mol Pharm, 2016. **13**(1): p. 100-12.
33. Serrano, D.R., et al., *Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations*. Int J Pharm, 2013. **447**(1-2): p. 38-46.
34. Dea-Ayuela, M.A., et al., *In vivo and in vitro anti-leishmanial activities of 4-nitro-N-pyrimidin- and N-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and N2-(4-*

- nitrophenyl)-N1-propylglycinamide*. *Bioorg Med Chem*, 2009. **17**(21): p. 7449-56.
35. Bilbao-Ramos, P., et al., *A fluorometric method for evaluation of pharmacological activity against intracellular Leishmania amastigotes*. *J Microbiol Methods*, 2012. **89**(1): p. 8-11.
 36. Smith, L., et al., *Orally Bioavailable and Effective Buparvaquone Lipid-Based Nanomedicines for Visceral Leishmaniasis*. *Mol Pharm*, 2018. **15**(7): p. 2570-2583.
 37. Lamy, B., et al., *New aerosol formulation to control ciprofloxacin pulmonary concentration*. *J Control Release*, 2018. **271**: p. 118-126.
 38. Serrano, D.R., et al., *Optimising the in vitro and in vivo performance of oral cocrystal formulations via spray coating*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018. **124**: p. 13-27.
 39. Waterman, K.C., J.T. Swanson, and B.L. Lippold, *A scientific and statistical analysis of accelerated aging for pharmaceuticals. Part I: accuracy of fitting methods*. *J Pharm Sci*, 2014. **103**(10): p. 3000-6.
 40. Serrano, D.R., et al., *Cocrystal habit engineering to improve drug dissolution and alter derived powder properties*. *J Pharm Pharmacol*, 2016. **68**(5): p. 665-77.
 41. Shukla, A., et al., *Alginate coated chitosan microparticles mediated oral delivery of diphtheria toxoid. Part A. Systematic optimization, development and characterization*. *Int J Pharm*, 2015. **495**(1): p. 220-233.
 42. Suzuki, Y., et al., *Macrophage mannose receptor, CD206, predict prognosis in patients with pulmonary tuberculosis*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 13129.
 43. Espada, R., et al., *Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations*. *Int J Pharm*, 2008. **361**(1-2): p. 64-9.
 44. Elefanti, A., et al., *Amphotericin B- and voriconazole-echinocandin combinations against Aspergillus spp.: Effect of serum on inhibitory and fungicidal interactions*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. **57**(10): p. 4656-63.
 45. Elefanti, A., et al., *Inhibitory and fungicidal effects of antifungal drugs against Aspergillus species in the presence of serum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. **57**(4): p. 1625-31.
 46. Herbrecht, R., et al., *Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(6): p. 408-15.
 47. Loftsson, T., *Drug permeation through biomembranes: cyclodextrins and the unstirred water layer*. *Pharmazie*, 2012. **67**(5): p. 363-70.
 48. Alayande, A.B., L.H. Kim, and I.S. Kim, *Cleaning efficacy of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin for biofouling reduction on reverse osmosis membranes*. *Biofouling*, 2016. **32**(4): p. 359-70.
 49. Challa, R., et al., *Cyclodextrins in drug delivery: an updated review*. *AAPS PharmSciTech*, 2005. **6**(2): p. E329-57.
 50. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-cyclodextrins-used-excipients-medicinal-products-human-use_en.pdf. 2017; Cyclodextrins used as excipients].
 51. Fernandez-Garcia, R., et al., *Self-assembling, supramolecular chemistry and pharmacology of amphotericin B: Poly-aggregates, oligomers and monomers*. *J Control Release*, 2022. **341**: p. 716-732.

52. Focaroli, S., et al., *A Design of Experiment (DoE) approach to optimise spray drying process conditions for the production of trehalose/leucine formulations with application in pulmonary delivery*. Int J Pharm, 2019. **562**: p. 228-240.
53. Molina, C., et al., *Agglomerated novel spray-dried lactose-leucine tailored as a carrier to enhance the aerosolization performance of salbutamol sulfate from DPI formulations*. Drug Deliv Transl Res, 2018. **8**(6): p. 1769-1780.
54. Mangal, S., et al., *Physico-Chemical Properties, Aerosolization and Dissolution of Co-Spray Dried Azithromycin Particles with L-Leucine for Inhalation*. Pharm Res, 2018. **35**(2): p. 28.
55. Yang, Y., et al., *Effects of formulation and operating variables on zanamivir dry powder inhalation characteristics and aerosolization performance*. Drug Deliv, 2014. **21**(6): p. 480-6.
56. Mah, P.T., et al., *The use of hydrophobic amino acids in protecting spray dried trehalose formulations against moisture-induced changes*. Eur J Pharm Biopharm, 2019. **144**: p. 139-153.
57. Otake, H., et al., *Inhalable Spray-Freeze-Dried Powder with L-Leucine that Delivers Particles Independent of Inspiratory Flow Pattern and Inhalation Device*. Pharm Res, 2016. **33**(4): p. 922-31.
58. Cui, Y., et al., *Moisture-Resistant Co-Spray-Dried Netilmicin with l-Leucine as Dry Powder Inhalation for the Treatment of Respiratory Infections*. Pharmaceutics, 2018. **10**(4).
59. Brown, G.D., *Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 33-43.
60. Pinto, M.R., E. Barreto-Bergter, and C.P. Taborda, *Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system*. Braz J Microbiol, 2008. **39**(2): p. 195-208.
61. Stahl, P.D. and R.A. Ezekowitz, *The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(1): p. 50-5.
62. Corral, M.J., et al., *Efficacy of low doses of amphotericin B plus allicin against experimental visceral leishmaniasis*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(12): p. 3268-74.
63. Cheepsattayakorn, A. and R. Cheepsattayakorn, *Parasitic pneumonia and lung involvement*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 874021.
64. Russo, R., et al., *Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections*. Ann Trop Med Parasitol, 2003. **97 Suppl 1**: p. 99-105.
65. ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=amphotericin+B+inhalation&term=&cntry=&state=&city=&dist=>. 2019.
66. Quon, B.S., C.H. Goss, and B.W. Ramsey, *Inhaled antibiotics for lower airway infections*. Ann Am Thorac Soc, 2014. **11**(3): p. 425-34.
67. Shah, S.P. and A. Misra, *Development of liposomal amphotericin B dry powder inhaler formulation*. Drug Deliv, 2004. **11**(4): p. 247-53.
68. ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01857479>. 2021.

Resumen del Capítulo 2:

El objetivo de este trabajo fue desarrollar formulaciones de AmB que reuniesen las características adecuadas para ser administradas por vía pulmonar y garantizaran la eficacia del fármaco en el TR, que depende fundamentalmente del tamaño aerodinámico de las partículas y de su perfil farmacodinámico y farmacocinético. Además, estas formulaciones deben ser seguras y eficaces.

En la actualidad, para el tratamiento y/o profilaxis de infecciones fúngicas pulmonares se administra una formulación líquida en forma de aerosoles que se prepara en los servicios de farmacia hospitalaria. Esta formulación se elabora a partir de los medicamentos comercializados de AmB IV que son reconstituidos, lo cual puede provocar una toxicidad local, tal como la irritación del TR superior, debido a los excipientes de estas formulaciones de administración parenteral. Otra limitación es el corto periodo de tiempo de estabilidad de estas preparaciones extemporáneas.

En este trabajo se ha utilizado QbD y DoE con el fin de conseguir formulaciones DPI de AmB optimizadas. Se han tenido en cuenta, tanto las variables del proceso de atomización por el que se obtiene el DPI, como las variables de la propia formulación líquida de AmB (tipo y cantidad de los excipientes que contienen). Estos estudios están recogidos en las tablas S1 y S2 de este capítulo (páginas 167 y 168).

Los resultados de los estudios preliminares demostraron que todas las formulaciones estudiadas presentaban un tamaño de partícula óptimo para su deposición pulmonar: entre 1 y 5 μm . El flujo de aire utilizado en la atomización resultó ser parámetro del proceso que afectaba, de forma directamente proporcional, al tamaño geométrico de las partículas obtenidas.

La fuerza de aspiración y la temperatura de entrada en el equipo de atomización tienen efectos opuestos sobre el rendimiento, consiguiéndose un mayor rendimiento cuanto mayor sea la temperatura de entrada de aire y cuanto menor la fuerza de aspiración.

En relación con los excipientes de la formulación líquida de AmB, en la primera etapa de desarrollo se ha descartado el uso de NaDoc como excipiente solubilizante, ya que ha demostrado influir de manera negativa en el rendimiento del proceso y en el tamaño de partícula de la formulación final. Asimismo, el NaDoc administrado en forma de DPI podría resultar irritante para el TR [22]. Se ha seleccionado el uso de manosa para futuras fases de desarrollo gracias a su eficacia demostrada como agente quimiotáctico para macrófagos [22, 41], lo que podría traducirse en su potencial uso en el tratamiento de VL.

Se ha demostrado la exactitud del ajuste de los modelos seleccionados por el DoE con los resultados experimentales de las respuestas estudiadas. De tal forma que las ecuaciones generadas para cada atributo crítico de calidad (CQA) se han ajustado a los resultados experimentales, siendo el porcentaje de error de la predicción para cada CQA de entre 0.41 y 3.37%.

Tras analizar los resultados del DoE, se ha llevado a cabo el desarrollo de dos formulaciones optimizadas, que mejoran al máximo los resultados obtenidos de diámetro aerodinámico medio de las partículas (MMAD) y del rendimiento de la formulación. Como resultado, se han obtenido dos formulaciones con distinto grado de cristalinidad, que han sido objeto de caracterización y estudio (Fig. 1).



Figura 1: Aspecto de las formulaciones DPI optimizadas 2 y 1

Ambas formulaciones se caracterizan por presentar partículas colapsadas esféricas con superficies rugosas. Estas partículas colapsadas pueden ser resultado de la combinación del uso de un flujo alto de aire y una velocidad de atomización lenta, lo que conduce a una evaporación rápida del agua de la formulación. Las superficies rugosas se pueden atribuir a la presencia de una pequeña proporción de leucina depositada de forma irregular.

Los altos valores de adsorción de agua experimentados en los estudios de sorción dinámica de vapor (DVS) se deben a la naturaleza de las partículas de DPI y su proceso de obtención por secado. Sin embargo, no se ha detectado pérdida de masa asociada a los cambios de estado sólido, tras un segundo ciclo de adsorción, lo que representa una buena estabilidad física de estas formulaciones F1 y F2.

Los principales estudios de caracterización *in vitro* de estas partículas destinadas a su administración pulmonar, se han realizado mediante el Next Generation Impactor (NGI) calibrado a 60L/min, de acuerdo con las especificaciones del aparato E de la Farmacopea Europea 10.0. Los diámetros aerodinámicos de corte de cada etapa del impactador vienen determinados por el fabricante y son los siguientes: 8,06 μm , 4,46 μm , 2,82 μm , 1,66 μm , 0,94 μm , 0,55 μm y 0,34 μm para las etapas 1 a 7 respectivamente. Se ha determinado el MMAD y la distribución de la fracción de finos (FPF) $< 3\mu\text{m}$ y $< 5\mu\text{m}$, demostrando que ambas formulaciones presentan una deposición eficaz del fármaco en el TR (Figura 2).

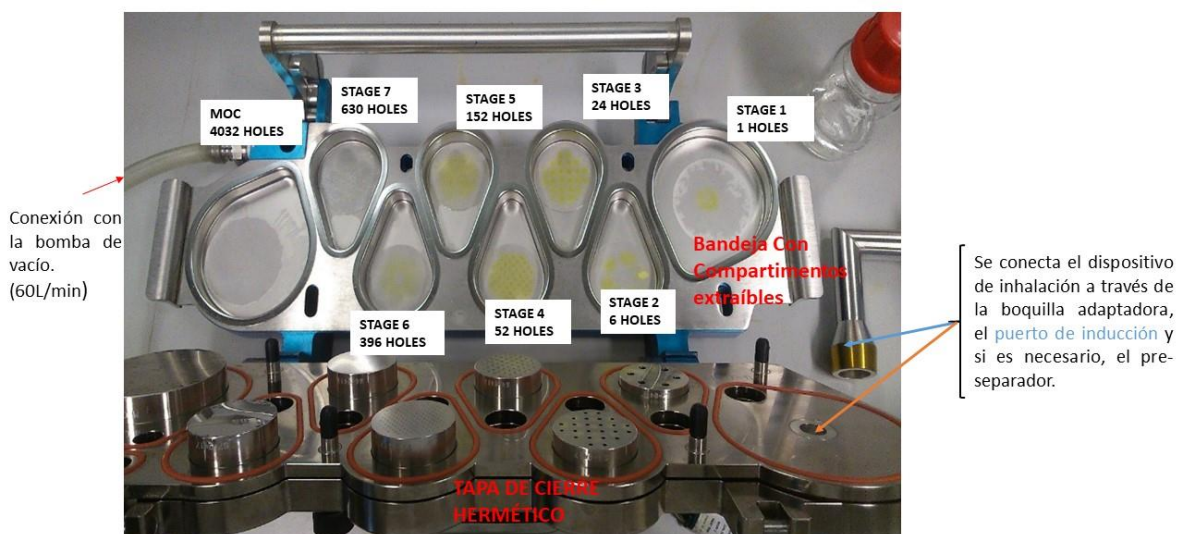


Figura 2. Esquema del funcionamiento del Next Generation Impactor (NGI) para la determinación del MMAD y la FPF $< 5 \mu\text{m}$ y FPF $< 3 \mu\text{m}$ de las formulaciones optimizadas F1 y F2.

Al comparar el perfil de deposición *in vitro* de ambas formulaciones, se ha determinado que el perfil de deposición de F1 es más eficaz que el de F2 a un flujo de aire normal (inspiración de 60L/min), e incluso a distintos flujos de aire (30L/min y 25L/min en aerosoles). Esto significa que la formulación F1 exhibe mayor cantidad de FPF $< 5 \mu\text{m}$ y FPF $< 3 \mu\text{m}$, que son capaces de dirigir el fármaco a los órganos diana. No obstante, ambas formulaciones presentan un perfil de deposición óptimo en comparación con los resultados de la formulación de referencia (AmBisome®). Al estudiar la deposición pulmonar de AmBisome® tras su reconstitución en agua y administración en forma de aerosol (25L/min), mejoran los resultados de la deposición de fármaco respecto a los anteriores. Sin embargo, sigue experimentando una desventaja frente a las formulaciones DPI, ya que existe una pérdida del 30% de la formulación en el dispositivo de nebulización (Figura 3).



Figura 3: Dispositivo de nebulización que se conecta al NGI para los ensayos de determinación de MMAD y FPF a un flujo de aire de 25L/min.

La principal diferencia entre ambas formulaciones optimizadas radica en su grado de cristalinidad, siendo F1 parcialmente cristalina y F2 amorfa. Esto puede atribuirse a la proporción de manosa y la cantidad de leucina utilizada en su formulación y que determinará el resto de las características estudiadas de la formulación final, que se resumen a continuación:

- Los ensayos de liberación del principio activo en solución han demostrado que la formulación parcialmente cristalina presenta un estado de sobresaturación más rápido que la formulación F2, probablemente debido a la facilidad de humectación que tienen las partículas de esta formulación. Además, ambas formulaciones F1 y F2 experimentan una velocidad de disolución del orden de 2 a 3 veces mayor que la de la AmB de referencia después de 24h.
- En relación con los estudios de actividad antifúngica *in vitro* de las formulaciones optimizadas F1 y F2, han resultado ser eficaces frente a las 3 cepas estudiadas de *Candida spp.* (*Candida albicans*; CECT 1394, *Candida Glabrata* 60750 and *Candida Parassilopsis* 57744), mostrando halos de inhibición superiores a 15 mm.

- Otros estudios de actividad *in vitro* realizados fueron los estudios de actividad frente a distintas especies de *Leishmania spp.* No se han identificado diferencias significativas entre ambas formulaciones en los valores de IC50 frente a *Leishmania infantum*. Sin embargo, la formulación F2 ha resultado más activa frente a *Leishmania donovani*. No obstante, ambas formulaciones F1 y F2 han demostrado una citotoxicidad muy baja frente a macrófagos murinos, lo que las convierte en unas formulaciones con un índice de selectividad adecuado para el tratamiento de infecciones causadas por *Leishmania spp.*
- Los estudios de toxicidad hemolítica *ex vivo* han demostrado que las formulaciones optimizadas F1 y F2 provocan una menor toxicidad en los glóbulos rojos que la AmB convencional, entre 1,61 y 2 veces menos. En un segundo estudio de toxicidad se ha evaluado con detalle el efecto protector sobre los hematíes que han demostrado ejercer la leucina y la manosa, componentes de la formulación DPI y en qué proporciones exhiben el citado efecto.
- El estudio *in vitro* de la captación por macrófagos (células J77A diferenciadas) ha demostrado que gracias a la presencia de manosa en la composición de ambas formulaciones, se consigue mejorar los resultados de absorción por macrófagos respecto a la AmB convencional. En particular, la formulación F1 presenta un tamaño de partícula en solución mayor que el tamaño de F2, lo que favorece su absorción por macrófagos.
- Tras la administración intratraqueal de ambas formulaciones a 3 grupos randomizados de 21 ratas OFA de 250/275gr cada uno, los niveles de AmB en el fluido de revestimiento epitelial ELF $> 1 \mu\text{g} / \text{ml}$ se mantienen constantes durante al menos 24 h, lo que indica que una administración diaria sería suficiente para provocar un efecto profiláctico o terapéutico frente a *Aspergillus*.

Por el contrario, tras la administración intravenosa de AmBisome® (<1 µg / ml a las 4 h), los niveles de AmB en ELF disminuyen rápidamente, lo que podría relacionarse con una posible falta de eficacia del tratamiento en pacientes si no se repite la administración de manera frecuente.

- La diferencia en la estabilidad a largo plazo entre las formulaciones F1 y F2 está relacionada con las cinéticas de degradación que experimentan cada una de ellas (Avrami y primer orden, respectivamente). La AmB de F1 ha experimentado un modelo Avrami, una cinética pseudo primer orden que consiste en un periodo sin degradación seguido de un proceso de degradación intensa. De nuevo, esta diferencia está relacionada con el grado de cristalinidad que presentan cada una de ellas y, que conduce a la formulación más cristalina (F1) a ser una formulación potencialmente más estable. Pese a la diferencia existente en las cinéticas de degradación, los datos experimentales han reflejado que ambas formulaciones F1 y F2 son estables durante dos años (> 95% del contenido de principio activo) en condiciones de almacenamiento en nevera (4°C).

Por último, se ha desarrollado una formulación combinada de dosis fijas de AmB-Salbutamol sulfato (SS) DPI que supone una importante perspectiva de futuro en el tratamiento concomitante de infecciones pulmonares fúngicas que cursan con broncoconstricción. Esta formulación ha demostrado una deposición homogénea de ambos principios activos y unos valores de FPF <5µm y <3µm adecuados para ejercer su acción esperada tanto en los bronquios como a lo largo de todo el TR.

A continuación, se resumen los principales resultados de este capítulo:

Las formulaciones desarrolladas de AmB en DPI están destinadas al tratamiento de infecciones fúngicas pulmonares y sistémicas que reúnen las características adecuadas para su administración pulmonar, incluso en pacientes con capacidad pulmonar comprometida ya que podrían ser reconstituidas en agua y administradas en forma de

aerosol. Esto supone una ventaja adicional ya que facilitaría el acceso al tratamiento a niños, ancianos y/o pacientes con dificultades para la utilización de los dispositivos DPI. Además, estas formulaciones presentan una estabilidad química superior a 2 años en nevera.

El empleo de γ -CD como excipiente pulmonar permite a la AmB de la formulación encontrarse tanto solubilizada en el interior del anillo de CD como fuera del mismo, lo cual, permite aumentar la dosis de AmB en la formulación final. Esto es fundamental para lograr una dosificación eficaz del principio activo. La incorporación de leucina y manosa en las proporciones seleccionadas a través del DoE, consiguen mejorar las propiedades de flujo de la formulación, el tamaño de partícula, la velocidad de cesión del fármaco en medios alcalinos y la captación de la formulación por parte de los macrófagos pulmonares. Los tres excipientes están considerados como excipientes seguros para su administración pulmonar.

Los estudios *in vitro* del diámetro aerodinámico medio de las partículas y la fracción de partículas finas $< 5\mu\text{m}$ y $< 3\mu\text{m}$ demuestran una deposición eficiente de ambas formulaciones en TR.

La principal diferencia fisicoquímica detectada entre las formulaciones optimizadas F1 y F2 es el grado de cristalinidad, que afecta al resto de características estudiadas en este trabajo. F1 es una formulación parcialmente cristalina y F2 es una formulación amorfa.

Ambas formulaciones F1 y F2 han demostrado seguridad *ex vivo* y eficacia *in vitro* frente a distintas especies de *Candida spp* y *Leishmania spp*.

En los estudios farmacocinéticos ambas formulaciones han demostrado una alta retención de AmB en el ELF, lo que pone de manifiesto el beneficio que ejerce la administración pulmonar de AmB en el tratamiento de infecciones pulmonares, como es la aspergilosis pulmonar, reduciendo los efectos adversos no deseados a nivel sistémico.

Por último, el desarrollo de una formulación de dosis fijas combinada AmB- SS supone un nuevo enfoque importante para el tratamiento de infecciones pulmonares fúngicas que cursan con broncoconstricción.

Anfotericina características fisicoquímica
s formulaciones orales de AmB AmBisome F
ungizona anfotericina B pellet estabilidad
acelerada **DISCUSIÓN** formulaciones
administración pulmonar tamaño aerodi
námico de las partículas CD manos aleucin
a distribución RT retículo endotelial toxici
dad hemolítica macrófagos Leishmania A
mB Beagle shipotensión ciclodextrinas chi
tosán modificado anfotericina poliagrega
da tamaño de partícula absorción oral toxi
cidad hemolítica biodistribución prolong
ada circulación plasmática combinación c
on SS distinta capacidad respiratorias A
mBD Plynebulización estabilidad eficaz

DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo principal sobre el que se ha basado esta tesis doctoral ha sido el desarrollo de nuevas formulaciones de administración oral y pulmonar de AmB que tengan un balance favorable coste-eficacia y que sean seguras para el tratamiento de infecciones fúngicas y parasitarias.

Para lograr este objetivo, se ha procedido al estudio y diseño de las formas farmacéuticas tecnológicamente más adecuadas para la vía de administración destinada y el uso previsto.

En primer lugar, se han desarrollado formulaciones orales de pellets de AmB mediante el recubrimiento de los núcleos con formulaciones líquidas micelares de AmB. Estas formulaciones se han diseñado para conseguir una absorción oral adecuada del fármaco, así como, una mejora en la estabilidad de las formulaciones líquidas de AmB.

Para poder mejorar la absorción oral de la AmB, es necesario desarrollar un sistema que permita mejorar la solubilidad del principio activo en los fluidos gastrointestinales, al mismo tiempo que incremente la permeabilidad a través del TGI [195-197].

La solubilidad de la AmB (< 1 mg/L a pH fisiológico entre 6 y 7), es el principal factor limitante en la formulación de este principio activo para administración oral.

En base a la regla de Lipinski, se han establecido una serie de criterios que permiten estimar la biodisponibilidad oral de un fármaco en base a ciertas características fisicoquímicas del mismo [185, 186]. Se considera que un fármaco no es un buen candidato para la VO cuando no cumple alguno de los siguientes criterios:

- a) el número de grupos hidroxilo y amino capaces de donar átomos de hidrógeno para formar puentes de hidrógeno debe ser menor de 5.
- b) el número de átomos de nitrógeno, oxígeno o flúor capaces de aceptar átomos de hidrógeno para formar puentes de hidrógeno debe ser menor de 10.
- c) debe tener un peso molecular inferior a 500 Da.

d) debe poseer un logP inferior a 5.

La AmB incumple 3 de los 4 criterios descritos y, por lo tanto, no se considera un principio activo adecuado para ser administrado por VO, al poseer 12 grupos donadores de hidrógeno, 18 grupos aceptores de hidrógeno, un peso molecular de 924 g/mol y un logP de 0,95. Todo ello da lugar a una biodisponibilidad oral estimada de entre 0,2 – 0,9% [30, 187].

Los niveles bajos de biodisponibilidad oral de AmB se deben a su baja solubilidad, su tendencia a agregarse en medios acuoso y su baja permeabilidad [182-184].

Tanto el proceso de formulación como la selección y combinación adecuada de los excipientes (aglutinante, solubilizante y polímero de recubrimiento), han sido fundamentales para mejorar el perfil de disolución del fármaco y conseguir una liberación eficaz del mismo a nivel GI. Además, se han mantenido las propiedades deseadas de actividad y seguridad de las formulaciones de AmB.

Otro factor limitante a tener en cuenta en el desarrollo de formulaciones de AmB para administración oral es la estabilidad de las mismas. La AmB es un principio activo termolábil, sensible a los factores ambientales y, por lo tanto, las formulaciones de AmB requieren condiciones de almacenamiento estrictas y controladas (temperatura de 2-8 °C, protegidas de la humedad, del aire y de la luz) [188]. Esta inestabilidad es debida a su estructura química, que se ha detallado en la introducción de esta tesis, que supone una tendencia a la auto oxidación de la cadena de dobles enlaces carbono-carbono, a la hidrólisis del anillo lactónico y/ o la hidrólisis del resto de grupos funcionales del amino-azúcar [2].

Los estudios de estabilidad son de gran importancia, especialmente en el caso de la AmB, para determinar si las formulaciones cumplen con las especificaciones y criterios de calidad de farmacopea. Además, los estudios de estabilidad ayudan a especificar la vida útil del medicamento, las características del acondicionamiento primario y

secundario y las condiciones de almacenamiento para su puesta en el mercado [189, 190].

Gracias al desarrollo de estas formulaciones de pellets de AmB, se han logrado las siguientes ventajas para la administración oral de AmB:

- Se ha conseguido una administración oral de AmB eficaz para infecciones fúngicas locales y sistémicas, así como asegurar una correcta dosificación debido a la posibilidad de administrar una dosis exacta del principio activo.
- Se asegura la estabilidad del medicamento durante el tiempo estudiado y establecido (tiempo de validez o caducidad).
- Se han mejorado las características organolépticas del fármaco que facilitarán la administración y disminuirán la posible sensación desagradable, favoreciendo el mantenimiento de la pauta terapéutica.
- Se logra una administración segura del principio activo, reduciendo los posibles efectos adversos inherentes a la AmB.
- Se protege a la AmB de los agentes externos, tanto medio ambientales (oxígeno, humedad...) como de factores fisiológicos (fluido GI).
- Se controla la liberación y absorción del principio activo.
- El principio activo se dirige a los órganos o tejidos diana.

Las formulaciones líquidas micelares de AmB, son dispersiones amorfas muy sensibles a la recristalización, especialmente en condiciones de alta humedad relativa y altas temperaturas. Teniendo en cuenta que la recristalización afecta significativamente al perfil de disolución, ha sido necesario estudiar las formulaciones finales de pellets recubiertos en condiciones extremas de temperatura y humedad relativa, para comprobar que no afectaba a la estabilidad física de la formulación y, en consecuencia, a la disolución. Gracias a la formulación de pellets se evita el riesgo de recristalización de las formulaciones líquidas de AmB.

Además, la tecnología del recubrimiento de pellets en lecho fluido ha sido el método seleccionado para la obtención de sistemas coamorfos que ayudan a mejorar el perfil de disolución de AmB [109]. Los sistemas coamorfos está compuesto de un API (AmB) y otras moléculas o polímeros, que están conectados entre sí por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas de Van der Waals, fácilmente dissociables en disolución.

Se ha establecido que el estado de agregación de AmB y los excipientes utilizados en la formulación final exhiben un papel importante en el perfil de toxicidad del fármaco [201, 203]. En las formulaciones líquidas micelares, la AmB se encuentra en estado dimérico, originado por la interacción en medios acuosos de la AmB y el NaDoc. El hecho de haber conseguido una reducción en la toxicidad hemolítica inherente a la AmB en estado dimérico, se atribuye a la liberación más lenta de las micelas de AmB- NaDoc de los núcleos sólidos que el resto de formulaciones. Asimismo, las interacciones secundarias con otros polímeros de la formulación, especialmente el Eudragit L-100, dificulta el contacto con los glóbulos rojos y reduce el efecto hemolítico del dímero AmB.

En definitiva, las formulaciones de AmB en pellets para administración oral podrían ser una alternativa al AmBisome® en el tratamiento de infecciones fúngicas locales y sistémicas y en el tratamiento de la VL, ya que han demostrado tener un buen perfil de seguridad y eficacia *in vitro*. Esta ventaja terapéutica sería especialmente útil en los países con menos recursos sanitarios y económicos, en los cuales la prevalencia de este tipo de infecciones es mayor y el precio de los medicamentos y las instalaciones sanitarias son los principales factores limitantes en este tipo de terapias. El coste de los pellets de AmB sería muy inferior al precio del AmBisome®. Además, estas formulaciones ofrecen una administración más cómoda por parte del paciente, sin necesidad de disponer de centros sanitarios y/o hospitalización del paciente.

Existen medicamentos comercializados en determinados países que contienen AmB para administración oral. Sin embargo, están destinados al tratamiento de infecciones fúngicas locales, orofaríngeas y gastrointestinales, debido a la falta de absorción oral del fármaco, se consiguen concentraciones subterapéuticas del principio activo [205].

Por lo tanto, se ha conseguido lograr el primer objetivo previamente descrito de esta tesis.

En segundo lugar, la alta incidencia de infecciones fúngicas pulmonares en todo el mundo y el vacío terapéutico existente relacionado con formulaciones adaptadas a esta vía de administración, han fundamentado el segundo objetivo de esta tesis, que ha consistido en el desarrollo de formulaciones de AmB para administración pulmonar. No existe ningún medicamento comercializado para la administración pulmonar de AmB. Sin embargo, el uso compasivo de AmBisome® en forma de aerosoles está aprobado como terapia antifúngica pulmonar [48,77, 135].

Además, las numerosas ventajas que ofrecen las formulaciones DPI frente a otras formulaciones de administración pulmonar, han motivado el desarrollo de este tipo de formulaciones de AmB. Estas ventajas son principalmente: la facilidad de uso y manejo del dispositivo y la liberación de tamaños de partículas eficaces para actuar a lo largo de todo el TR. Asimismo, estas formulaciones no utilizan propelentes que dañen la capa de ozono y el medio ambiente.

Para establecer una referencia con un medicamento comercializado, Tobi Podhaler® (tobramicina) es una formulación DPI autorizada para su comercialización en la Unión Europea en el tratamiento de la fibrosis quística causada por *Pseudomonas aeruginosa* en adultos y niños. Este medicamento está designado como medicamento huérfano que fue autorizado para su comercialización en toda la UE en 2011 por la Comisión Europea, tras dictamen favorable del Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) de la EMA. Esta designación fue motivada por el Comité de Medicamentos Huérfanos para cubrir una laguna terapéutica en las infecciones pulmonares de *Pseudomonas aeruginosa* que facilitase la administración de antibióticos, en forma de DPI [206].

Por otra parte, las directrices y requisitos de las autoridades reguladoras exigen a la industria farmacéutica un conocimiento integral de sus procesos de fabricación, así como, de la robustez y fiabilidad de los mismos. En concreto, esta metodología está

recogida en la directiva ICH Q8 (R2) sobre el desarrollo farmacéutico. El concepto de "Calidad por diseño" (QbD) indica que la calidad no debe probarse en los productos, sino que debe incorporarse al espacio de diseño de los procesos, incluyendo la combinación multidimensional de la interacción de las variables de los materiales de partida (características) y los parámetros del proceso de fabricación. De esta forma se garantiza la calidad del producto final. Además, la referida ICH indica que siempre y cuando el espacio de diseño esté definido correctamente, será un proceso fiable que no necesitará cambios regulatorios posteriores [207].

Por este motivo, se ha considerado necesaria la aplicación de QbD y DoE en el desarrollo de nuevas formulaciones pulmonares mediante el proceso de atomización para conseguir integrar las interacciones de las variables del proceso y de la formulación en un modelo multivariable. Mediante QbD y DoE se ha conseguido validar un proceso de fabricación robusto y obtener un producto final de calidad óptima. Además, los experimentos de validación se llevaron a cabo gracias a la información complementaria sobre la estadística predictiva del modelo.

Un factor limitante en la eficacia de las formulaciones de administración pulmonar es el tamaño aerodinámico de estas partículas, que debe estar comprendido entre 1 y 5 μm y que cumple una función primordial en la distribución del fármaco en el TR, asegurando su eficacia y evitando la toxicidad. Además, gracias al patrón de deposición pulmonar robusto, que no experimenta diferencias significativas a diferentes flujos de aire, se asegura la eficacia en el tratamiento de pacientes con infecciones respiratorias que presentan una disminución de la capacidad respiratoria.

Gracias al DoE se ha tenido conocimiento exhaustivo de la influencia de los excipientes de la formulación en el comportamiento aerodinámico de la formulación final y ha sido capaz de predecir los resultados de dicha actividad, tras efectuar distintos cambios en la proporción de los excipientes.

La elección de CD como excipiente solubilizante de AmB se debe, en primer lugar, a que su uso está considerado seguro y existen numerosos estudios que lo avalan. En segundo lugar, las CD poseen la capacidad de eliminar el complejo formador de biopelículas en las células bacterianas o fúngicas, por lo que podrían actuar como bacteriostático o fungistático *per se* [208].

En particular, se ha seleccionado la γ CD, ya que presenta una mayor solubilidad acuosa que el resto de CD y, en términos de citotoxicidad local, la γ CD es la más segura para la administración pulmonar.

En este trabajo se ha puesto de manifiesto que tras utilizar proporciones más bajas de AmB: CD se obtiene un mejor rendimiento de la formulación. En estas condiciones, la AmB se solubilizará parcialmente en la cavidad de la γ CD [145]. Esto promueve un equilibrio dinámico entre la AmB agregada y solubilizada, formando un complejo de inclusión con interacciones de tipo puentes de hidrógeno. Esta solubilización parcial de la AmB explica los resultados obtenidos relacionados con una liberación inicial rápida de fármaco y una retención prolongada en el tracto respiratorio, resultado de la fracción no solubilizada del fármaco. Por lo tanto, supone una ventaja respecto a la eficacia del tratamiento frente a una formulación que tenga AmB totalmente solubilizada.

En relación con la L- leucina, su inclusión en la formulación se ha basado en estudios que demuestran las propiedades antiadherentes de la leucina, favoreciendo la disgregación de las partículas para mejorar las propiedades de flujo y, de este modo, mejorar las propiedades de deposición pulmonar de la formulación [167, 211, 212]. Asimismo, la leucina es un aminoácido considerado como excipiente seguro para formulaciones pulmonares [213, 214].

Además, se ha podido comprobar en esta tesis que al incluir leucina en la formulación DPI, se mejoran los problemas de higroscopicidad inherentes a este tipo de formulaciones en polvo. Esto se debe a la presencia de los grupos hidrofóbicos de leucina que quedan recubriendo las partículas tras el proceso de atomización y que impiden la adsorción de moléculas de agua.

El tercer excipiente fundamental en la formulación DPI ha sido la manosa, monosacárido cuyo uso en formulaciones de administración pulmonar se considera seguro al tratarse de un hidrato de carbono que no presenta riesgo de toxicidad en el TR. La manosa ha sido seleccionada como componente de la formulación debido a su comportamiento quimiotáctico. Se conoce que las glicoproteínas influyen en las respuestas inmunitarias de las células T frente a una amplia variedad de antígenos. La pared celular de los hongos es rica en polisacáridos y es uno de los vectores moleculares fundamentales asociados a patógenos que son reconocidos por los receptores de unión a carbohidratos (CBR). Además, la manosa está altamente expresada en células inmunitarias de primera línea, principalmente en macrófagos (receptor de manosa de macrófagos) y en células dendríticas [214]. El reconocimiento de los polisacáridos de la superficie fúngica inicia las respuestas inmediatas como la fagocitosis, la producción de compuestos antimicrobianos y la inducción de citocinas proinflamatorias que reclutan otras células inmunes [202]. La afinidad de los CBR por los azúcares es muy variada, pero la manosa es el monosacárido más comúnmente reconocido por estos receptores [216, 217]. Por esta razón, el efecto sinérgico de la AmB y la activación del sistema inmunitario, supone una ventaja terapéutica que ofrecen estas formulaciones desarrolladas de DPI en el tratamiento de infecciones fúngicas pulmonares.

Una ventaja adicional de incorporar manosa en la formulación es su potencial uso en el tratamiento de la VL. La VL es una enfermedad causada por el parásito intracelular *Leishmania* que se acumula en el interior de los macrófagos y que puede resultar mortal para el paciente si no se recibe tratamiento. En la actualidad, la VL afecta especialmente a personas en países en vías de desarrollo y su tratamiento se basa en medicamentos administrados por vía parenteral y miltefosina por vía oral (cuyos estudios preclínicos de toxicidad demostraron efectos teratogénicos) [32].

Debido a la necesidad de obtener una alternativa eficaz y segura al tratamiento por vía parenteral de esta enfermedad, existen varias formulaciones orales en fase de estudio preclínico y clínico [101]. Sin embargo, esta es la primera vez que se propone una administración pulmonar conjunta de AmB, principio activo eficaz frente a *Leishmania spp*, y manosa, molécula quimiotáctica para macrófagos. Estas formulaciones han

demostrado eficacia *in vitro* frente a promastigotes de *Leishmania spp* y seguridad a nivel de citotoxicidad en los macrófagos celulares, lo que demuestra ser un potencial tratamiento de leishmaniasis *post-Kala-azar*, en la cual, el parásito se encuentra diseminado en los órganos del hospedador y puede alcanzar el líquido broncoalveolar o los alveolos [12].

Desde el punto de vista farmacotécnico, la manosa en las formulaciones DPI ha provocado el cambio de estado amorfo a cristalino de la formulación final, siendo la principal diferencia entre las formulaciones optimizadas objeto de este trabajo: F1 de naturaleza semicristalina y F2 de naturaleza amorfa, originada por la diferente proporción de AmB: manosa en cada una de ellas.

La diferencia entre la naturaleza amorfa o semicristalina de las formulaciones F1 y F2 ha demostrado tener un gran impacto en las propiedades fisicoquímicas de la formulación DPI. Es importante destacar el hecho de que F1 (semicristalina) es una formulación en polvo de aspecto menos cohesivo y con una mayor humectabilidad que la formulación F2 (amorfa). Esto explica las diferencias observadas en los perfiles de disolución de las formulaciones y la rápida saturación que experimenta la formulación F1 en medios acuosos. En relación con los estudios de estabilidad, F1 presenta una mayor estabilidad química a temperatura ambiente (> 2 años). Por el contrario, la naturaleza amorfa de F2, la convierte en una formulación más sensible a la degradación química y a formar aglomerados durante el almacenamiento. Sin embargo, ambas formulaciones se consideran estables durante más de 2 años, si se conservan en nevera. De acuerdo con los resultados de deposición pulmonar *in vitro*, F1 experimenta una deposición pulmonar más robusta a diferentes flujos de aire y una menor retención en el dispositivo Handihaler y los compartimentos superiores del impactador (NGI), como son: el adaptador de la boquilla y el puerto de inducción.

En general, el éxito en la deposición pulmonar de las formulaciones DPI de AmB se basa en conseguir un patrón de deposición pulmonar eficaz con mínimas diferencias a diferentes flujos de aire (inspiración) teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes que sufren infecciones respiratorias tienen comprometida su capacidad pulmonar. Por

este motivo, también se ha desarrollado una formulación DPI que combina AmB y SS, para aquellos pacientes que requieren un fármaco antifúngico con acción broncodilatadora.

El tamaño de partícula de F1 cuando se dispersa en medios acuosos, es mayor que el de F2 y, esto explica la mayor retención de AmB en el ELF tras la administración intratraqueal de la formulación DPI. Asimismo, el tamaño de las partículas en dispersión está relacionado con la facilidad para ser absorbidos por parte de los macrófagos. La formulación F2 presenta un tamaño de partícula más pequeño tras la reconstitución que F1, lo cual facilita la permeabilidad de las partículas a través de las células epiteliales del TR, disminuyendo los niveles de retención de AmB en el ELF después de la administración pulmonar.

Sin embargo, los niveles de AmB en el TR tras la administración intratraqueal de ambas formulaciones F1 y F2 fueron superiores a los alcanzados tras la administración parenteral de AmBisome®. Esto evidencia la necesidad de formular específicamente los medicamentos para la ruta de administración destinada, especialmente en el caso de AmB, cuyos efectos secundarios provocados en los tejidos a los que no va dirigida la formulación pueden derivar en la necesidad de supresión del tratamiento (p.e nefrotoxicidad).

La combinación dual de manosa y leucina en las formulaciones DPI ha conducido a una reducción de la actividad hemolítica de la AmB, siendo el segundo efecto adverso no deseado más grave causado por la AmB. La reducción de la toxicidad hemolítica junto con el tiempo de retención en el TR prolongado (más de 24 h), en concentraciones superiores a IC50 frente *Aspergillus* [39], constituyen la gran ventaja terapéutica ofrecida por estas formulaciones de AmB en comparación con los tratamientos actuales empleados en la práctica clínica para infecciones fúngicas pulmonares.

Hasta la fecha, la mayoría de los ensayos clínicos relacionados con la administración pulmonar de AmB se han centrado en la seguridad y eficacia de las formulaciones

lipídicas comercializadas (AmBisome® y Abelcet®) para la administración IV de AmB. Estas formulaciones son reconstituidas y administradas vía nebulización para el tratamiento y/o prevención de infecciones fúngicas pulmonares [101]. Bajo estas condiciones, los medicamentos están siendo utilizados fuera de indicación, para una vía de administración distinta a la autorizada y fuera de sus especificaciones aprobadas. La experiencia de la administración por vía inhalatoria de antibióticos aprobados para su administración parenteral, ha demostrado que estas formulaciones pueden causar irritación significativa a lo largo del TR, debido al uso de excipientes no fisiológicos con el TR como puede ser el alto contenido de dextrosa requerida para la liofilización de las formulaciones parenterales [179].

En base a estudios previos, se ha demostrado que la utilización de solventes orgánicos en la fabricación de liposomas de AmB por evaporación en fase reversa puede ser la causa principal de toxicidad de los DPI, debido a la presencia de solventes residuales en la formulación final [179]. Además, los liposomas tienen una capacidad de carga de AmB muy limitada, lo que las convertiría en formulaciones ineficaces en el tratamiento de infecciones pulmonares fúngicas [180].

No sólo existe una necesidad clínica de formulaciones de DPI antifúngicas, sino que también existe una necesidad de formulaciones de DPI combinadas para el tratamiento de infecciones pulmonares fúngicas y el tratamiento de la broncoconstricción. Esta necesidad está evidenciada por los ensayos clínicos que se encuentran actualmente en curso. En la terapia de episodios agudos y de mantenimiento de la aspergilosis broncopulmonar alérgica, se aprobó un ensayo clínico controlado y aleatorizado, que consistía en la administración de AmB nebulizada (10 mg) y budesonida nebulizada (1 mg) [181]. Pese a que no existen resultados publicados, esto demuestra la necesidad clínica de una terapia combinada, ya que no existe ningún medicamento DPI de combinación de dosis fijas, comercializado para este propósito.

Referencias:

1. *Catálogo de Medicamentos-Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos*. 2017.
2. Serrano, D.R., et al., *Oral particle uptake and organ targeting drives the activity of amphotericin B nanoparticles*. *Mol Pharm*, 2015. **12**(2): p. 420-31.
3. Torrado, J.J., D.R. Serrano, and I.F. Uchegbu, *The oral delivery of amphotericin B*. *Ther Deliv*, 2013. **4**(1): p. 9-12.
4. *USP45-NF24*. 2018.
5. Sasaki, J., et al., *Pharmacokinetics of a polyene antifungal agent, liposomal amphotericin B (L-AMB), in a severely burned patient*. *J Chemother*, 2014. **26**(5): p. 312-4.
6. Zielinska, J., et al., *Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 19109.
7. Kapoor, B., et al., *Application of liposomes in treatment of rheumatoid arthritis: quo vadis*. *ScientificWorldJournal*, 2014. **2014**: p. 978351.
8. Fernandez-Garcia, R., et al., *Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: The role of amphotericin B and drug targeting*. *Int J Pharm*, 2017. **525**(1): p. 139-148.
9. Iyama, S., et al., *[Evaluation of the efficacy of liposomal amphotericin B]*. *Kansenshogaku Zasshi*, 2010. **84**(2): p. 182-6.
10. Smith, L., et al., *Orally Bioavailable and Effective Buparvaquone Lipid-Based Nanomedicines for Visceral Leishmaniasis*. *Mol Pharm*, 2018. **15**(7): p. 2570-2583.
11. Rolon, M., et al., *Engineering Oral and Parenteral Amorphous Amphotericin B Formulations against Experimental Trypanosoma cruzi Infections*. *Mol Pharm*, 2017. **14**(4): p. 1095-1106.
12. Salih, N.A., et al., *Liposomal amphotericin B for complicated visceral leishmaniasis (kala-azar) in eastern Sudan: how effective is treatment for this neglected disease?* *Trop Med Int Health*, 2014. **19**(2): p. 146-52.
13. Comité Editorial de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, C., *[Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: New stage, new challenges]*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2017. **35**(1): p. 1-2.
14. Schaffner, A. and P.G. Frick, *The effect of ketoconazole on amphotericin B in a model of disseminated aspergillosis*. *J Infect Dis*, 1985. **151**(5): p. 902-10.
15. Cartwright, R.Y., *Antifungal drugs*. *J Antimicrob Chemother*, 1975. **1**(2): p. 141-62.
16. Simitsopoulou, M., et al., *Interaction of amphotericin B lipid formulations and triazoles with human polymorphonuclear leucocytes for antifungal activity against Zygomycetes*. *Mycoses*, 2008. **51**(2): p. 147-54.
17. Sud, I.J. and D.S. Feingold, *Effect of ketoconazole on the fungicidal action of amphotericin B in Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1983. **23**(1): p. 185-7.
18. Malewicz, B., M. Momsen, and H.M. Jenkin, *Combined effect of acyclovir and amphotericin B on the replication of pseudorabies virus in BHK-21 cells*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1983. **23**(1): p. 119-24.
19. Bickers, D.R., *Antifungal therapy: potential interactions with other classes of drugs*. *J Am Acad Dermatol*, 1994. **31**(3 Pt 2): p. S87-90.
20. Antoniskis, D. and R.A. Larsen, *Acute, rapidly progressive renal failure with simultaneous use of amphotericin B and pentamidine*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990. **34**(3): p. 470-2.

21. Mosimann, V., et al., *Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review*. Acta Trop, 2018. **182**: p. 246-250.
22. Katz, H.I., *Drug interactions of the newer oral antifungal agents*. Br J Dermatol, 1999. **141 Suppl 56**: p. 26-32.
23. Agarwal, P.K., et al., *Efficacy of topical and systemic itraconazole as a broad-spectrum antifungal agent in mycotic corneal ulcer. A preliminary study*. Indian J Ophthalmol, 2001. **49**(3): p. 173-6.
24. Rojas, F.D., et al., *Antifungal susceptibility of Malassezia furfur, Malassezia sympodialis, and Malassezia globosa to azole drugs and amphotericin B evaluated using a broth microdilution method*. Med Mycol, 2014. **52**(6): p. 641-6.
25. Maesaki, S., et al., *Effect of sequential combination of amphotericin B and azole antifungal agents against Aspergillus fumigatus*. J Infect Chemother, 1999. **5**(3): p. 125-129.
26. Cavalheiro, A.S., et al., *In vitro activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against Pythium insidiosum*. Vet Microbiol, 2009. **137**(3-4): p. 408-11.
27. Masia Canuto, M. and F. Gutierrez Rodero, *Antifungal drug resistance to azoles and polyenes*. Lancet Infect Dis, 2002. **2**(9): p. 550-63.
28. Verweij, P.E., et al., *Azole Resistance in Aspergillus fumigatus: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles?* Clin Infect Dis, 2016. **62**(3): p. 362-8.
29. Ibrahim, F., et al., *Efficacy of an oral and tropically stable lipid-based formulation of Amphotericin B (iCo-010) in an experimental mouse model of systemic candidiasis*. Lipids Health Dis, 2013. **12**: p. 158.
30. Ching, M.S., et al., *Absorption of orally administered amphotericin B lozenges*. Br J Clin Pharmacol, 1983. **16**(1): p. 106-8.
31. Halde, C., et al., *An evaluation of amphotericin B in vitro and in vivo in mice against Coccidioides immitis and Candida albicans, and preliminary observations concerning the administration of amphotericin B to man*. J Invest Dermatol, 1957. **28**(3): p. 217-31; discussion, 231-2.
32. Santangelo, R., et al., *Efficacy of oral cochleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(9): p. 2356-60.
33. Wasan, E.K., et al., *Development and characterization of oral lipid-based amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with Aspergillus fumigatus or Candida albicans*. Int J Pharm, 2009. **372**(1-2): p. 76-84.
34. Wasan, K.M., et al., *Highly effective oral amphotericin B formulation against murine visceral leishmaniasis*. J Infect Dis, 2009. **200**(3): p. 357-60.
35. Risovic, V., et al., *Assessing the antifungal activity of a new oral lipid-based amphotericin B formulation following administration to rats infected with Aspergillus fumigatus*. Drug Dev Ind Pharm, 2007. **33**(7): p. 703-7.
36. Lalatsa, D.R.S.A., *Oral amphotericin B: The journey from bench to market*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2017. **42**: p. 75-86.
37. Italia, J.L., et al., *Biodegradable nanoparticles improve oral bioavailability of amphotericin B and show reduced nephrotoxicity compared to intravenous Fungizone*. Pharm Res, 2009. **26**(6): p. 1324-31.
38. L. Zarif, T.J., I. Segarra, R. Mannino, *Novel hydrogel isolated cochleate formulations, process of preparation and their use for the delivery of biologically relevant molecules*. 2007: p. 27.
39. Sivak, O., et al., *Tropically stable novel oral lipid formulation of amphotericin B (iCo-010): biodistribution and toxicity in a mouse model*. Lipids Health Dis, 2011. **10**: p. 135.

40. Chaudhari, M.B., et al., *Solid lipid nanoparticles of amphotericin B (AmbiOnp): in vitro and in vivo assessment towards safe and effective oral treatment module*. Drug Deliv Transl Res, 2016. **6**(4): p. 354-64.
41. Weis, G., [*Physiology of the respiratory tract and cough*]. Pharm Unserer Zeit, 2008. **37**(6): p. 458-61.
42. O'Malley, F.K. and H.W. Magoun, *The first American-based Handbook of Physiology*. Physiologist, 1985. **28**(1): p. 35-9.
43. Moore, M., et al., *Predictors of Adverse Outcomes in Uncomplicated Lower Respiratory Tract Infections*. Ann Fam Med, 2019. **17**(3): p. 231-238.
44. Wijnands, W.J., *The metabolic function of the lung*. Pharm Weekbl Sci, 1987. **9**(2): p. 61-4.
45. de Pablo, E., et al., *Nebulised antibiotherapy: conventional versus nanotechnology-based approaches, is targeting at a nano scale a difficult subject?* Ann Transl Med, 2017. **5**(22): p. 448.
46. Kuzmov, A. and T. Minko, *Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases*. J Control Release, 2015. **219**: p. 500-18.
47. Coates, M.S., et al., *Effect of design on the performance of a dry powder inhaler using computational fluid dynamics. Part 2: Air inlet size*. J Pharm Sci, 2006. **95**(6): p. 1382-92.
48. *Centro de información online de medicamentos de la AEMPS - CIMA*
<https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html>. fecha de acceso 03/JUN/2019.
49. Pilcer, G. and K. Amighi, *Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery*. Int J Pharm, 2010. **392**(1-2): p. 1-19.
50. Islam, N. and E. Gladki, *Dry powder inhalers (DPIs)--a review of device reliability and innovation*. Int J Pharm, 2008. **360**(1-2): p. 1-11.
51. Telko, M.J. and A.J. Hickey, *Dry powder inhaler formulation*. Respir Care, 2005. **50**(9): p. 1209-27.
52. Begat, P., et al., *The cohesive-adhesive balances in dry powder inhaler formulations II: influence on fine particle delivery characteristics*. Pharm Res, 2004. **21**(10): p. 1826-33.
53. Price, R., et al., *The influence of relative humidity on particulate interactions in carrier-based dry powder inhaler formulations*. Int J Pharm, 2002. **246**(1-2): p. 47-59.
54. Young, P.M., et al., *Characterization of a surface modified dry powder inhalation carrier prepared by "particle smoothing"*. J Pharm Pharmacol, 2002. **54**(10): p. 1339-44.
55. Nuchuchua, O., et al., *Scalable organic solvent free supercritical fluid spray drying process for producing dry protein formulations*. Eur J Pharm Biopharm, 2014. **88**(3): p. 919-30.
56. Johnson, K.A., *Preparation of peptide and protein powders for inhalation*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. **26**(1): p. 3-15.
57. Steckel, H. and H.G. Brandes, *A novel spray-drying technique to produce low density particles for pulmonary delivery*. Int J Pharm, 2004. **278**(1): p. 187-95.
58. Pilcer, G., F. Vanderbist, and K. Amighi, *Preparation and characterization of spray-dried tobramycin powders containing nanoparticles for pulmonary delivery*. Int J Pharm, 2009. **365**(1-2): p. 162-9.
59. Ogain, O.N., et al., *Particle engineering of materials for oral inhalation by dry powder inhalers. I-Particles of sugar excipients (trehalose and raffinose) for protein delivery*. Int J Pharm, 2011. **405**(1-2): p. 23-35.
60. Suzuki, Y., et al., *Macrophage mannose receptor, CD206, predict prognosis in patients with pulmonary tuberculosis*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 13129.
61. Zhao, Z., et al., *Low density, good flowability cyclodextrin-raffinose binary carrier for dry powder inhaler: anti-hygroscopicity and aerosolization performance enhancement*. Expert Opin Drug Deliv, 2018. **15**(5): p. 443-457.

62. Chono, S., K. Togami, and S. Itagaki, *Aerosolized liposomes with dipalmitoyl phosphatidylcholine enhance pulmonary absorption of encapsulated insulin compared with co-administered insulin*. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017. **43**(11): p. 1892-1898.
63. Focaroli, S., et al., *A Design of Experiment (DoE) approach to optimise spray drying process conditions for the production of trehalose/leucine formulations with application in pulmonary delivery*. *Int J Pharm*, 2019. **562**: p. 228-240.
64. Lechuga-Ballesteros, D., et al., *Trileucine improves aerosol performance and stability of spray-dried powders for inhalation*. *J Pharm Sci*, 2008. **97**(1): p. 287-302.
65. Vaughn, J.M., et al., *Murine airway histology and intracellular uptake of inhaled amorphous itraconazole*. *Int J Pharm*, 2007. **338**(1-2): p. 219-24.
66. Hussain, A., et al., *Absorption enhancers in pulmonary protein delivery*. *J Control Release*, 2004. **94**(1): p. 15-24.
67. Matilainen, L., et al., *In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells*. *J Control Release*, 2008. **126**(1): p. 10-6.
68. Yamamoto, A., et al., *Improvement of the pulmonary absorption of (Asu1,7)-eel calcitonin by various absorption enhancers and their pulmonary toxicity in rats*. *J Pharm Sci*, 1997. **86**(10): p. 1144-7.
69. Huang, Y.C., et al., *Pulmonary inflammation caused by chitosan microparticles*. *J Biomed Mater Res A*, 2005. **75**(2): p. 283-7.
70. Devrim, B., A. Bozkir, and K. Canefe, *Preparation and evaluation of PLGA microparticles as carrier for the pulmonary delivery of rhlL-2 : I. Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics*. *J Microencapsul*, 2011. **28**(6): p. 582-94.
71. Healy, A.M., et al., *Dry powders for oral inhalation free of lactose carrier particles*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014. **75**: p. 32-52.
72. Scalia, S., et al., *Quercetin solid lipid microparticles: a flavonoid for inhalation lung delivery*. *Eur J Pharm Sci*, 2013. **49**(2): p. 278-85.
73. Seville, P.C., H.Y. Li, and T.P. Learoyd, *Spray-dried powders for pulmonary drug delivery*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2007. **24**(4): p. 307-60.
74. Chew, N.Y., et al., *Effect of amino acids on the dispersion of disodium cromoglycate powders*. *J Pharm Sci*, 2005. **94**(10): p. 2289-300.
75. Ungaro, F., et al., *Cyclodextrins in the production of large porous particles: development of dry powders for the sustained release of insulin to the lungs*. *Eur J Pharm Sci*, 2006. **28**(5): p. 423-32.
76. Zarb, P., et al., *Antifungal therapy in European hospitals: data from the ESAC point-prevalence surveys 2008 and 2009*. *Clin Microbiol Infect*, 2012. **18**(10): p. E389-95.
77. *Orphan designation: Amphotericin B (for inhalation use) for: Prevention of pulmonary fungal infection in patients deemed at risk*. EMA 28/08/2006 updated [cited <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu306391>].
78. Alsaadi, M., et al., *The efficacy of aerosol treatment with non-ionic surfactant vesicles containing amphotericin B in rodent models of leishmaniasis and pulmonary aspergillosis infection*. *J Control Release*, 2012. **160**(3): p. 685-91.
79. Xia, D., et al., *Aerosolized amphotericin B as prophylaxis for invasive pulmonary aspergillosis: a meta-analysis*. *Int J Infect Dis*, 2015. **30**: p. 78-84.
80. Zhou, Q.Y., W.J. Yang, and X.Q. Zhao, *Pulmonary aspergillosis treated with inhaled amphotericin B*. *Int J Infect Dis*, 2017. **54**: p. 92-94.
81. Ruijgrok, E.J., et al., *Nebulization of four commercially available amphotericin B formulations in persistently granulocytopenic rats with invasive pulmonary aspergillosis: evidence for long-term biological activity*. *J Pharm Pharmacol*, 2005. **57**(10): p. 1289-95.

82. Leenders, A.C., et al., *Liposomal amphotericin B (AmBisome) reduces dissemination of infection as compared with amphotericin B deoxycholate (Fungizone) in a rate model of pulmonary aspergillosis*. J Antimicrob Chemother, 1996. **38**(2): p. 215-25.
83. Furco, A., et al., [*Pulmonary mucormycosis: benefit of aerosol amphotericin B?*]. Rev Mal Respir, 2001. **18**(3): p. 309-13.
84. Kamalaporn, H., et al., *Aerosolized liposomal Amphotericin B: a potential prophylaxis of invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients*. Pediatr Pulmonol, 2014. **49**(6): p. 574-80.
85. Gilbert, B.E., P.R. Wyde, and S.Z. Wilson, *Aerosolized liposomal amphotericin B for treatment of pulmonary and systemic Cryptococcus neoformans infections in mice*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(7): p. 1466-71.
86. Safdar, A., S. O'Brien, and I.F. Kouri, *Efficacy and feasibility of aerosolized amphotericin B lipid complex therapy in caspofungin breakthrough pulmonary zygomycosis*. Bone Marrow Transplant, 2004. **34**(5): p. 467-8.
87. Gavalda, J., et al., *Efficacy of nebulized liposomal amphotericin B in treatment of experimental pulmonary aspergillosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(7): p. 3028-30.
88. Ruijgrok, E.J., et al., *Nebulized amphotericin B combined with intravenous amphotericin B in rats with severe invasive pulmonary aspergillosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(5): p. 1852-4.
89. Castagnola, E., et al., *Nebulized liposomal amphotericin B and combined systemic antifungal therapy for the treatment of severe pulmonary aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplant for a fatal mitochondrial disorder*. J Chemother, 2007. **19**(3): p. 339-42.
90. Rijnders, B.J., et al., *Aerosolized liposomal amphotericin B for the prevention of invasive pulmonary aspergillosis during prolonged neutropenia: a randomized, placebo-controlled trial*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(9): p. 1401-8.
91. Slobbe, L., E. Boersma, and B.J. Rijnders, *Tolerability of prophylactic aerosolized liposomal amphotericin-B and impact on pulmonary function: data from a randomized placebo-controlled trial*. Pulm Pharmacol Ther, 2008. **21**(6): p. 855-9.
92. Takazono, T., et al., *Efficacy of combination antifungal therapy with intraperitoneally administered micafungin and aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary aspergillosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(8): p. 3508-10.
93. Fujita, M., et al., [*A case report of pulmonary aspergillosis in lung transplant recipient successfully treated with inhalation administration of liposomal amphotericin B*]. Jpn J Antibiot, 2013. **66**(1): p. 37-43.
94. Monforte, V., et al., *Prophylaxis with nebulized liposomal amphotericin B for Aspergillus infection in lung transplant patients does not cause changes in the lipid content of pulmonary surfactant*. J Heart Lung Transplant, 2013. **32**(3): p. 313-9.
95. Mihara, T., et al., *Efficacy of aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary mucormycosis*. J Infect Chemother, 2014. **20**(2): p. 104-8.
96. Godet, C., et al., *Nebulized Liposomal Amphotericin B for Treatment of Pulmonary Infection Caused by Hormoglyphiella aspergillata: Case Report and Literature Review*. Mycopathologia, 2017. **182**(7-8): p. 709-713.
97. Venanzi, E., et al., *Aerosolized Lipid Amphotericin B for Complementary Therapy and/or Secondary Prophylaxis in Patients with Invasive Pulmonary Aspergillosis: A Single-Center Experience*. Mycopathologia, 2019. **184**(2): p. 239-250.
98. Canetti, D., et al., *Aerosolized amphotericin B lipid complex and invasive pulmonary aspergillosis: a case report*. Infez Med, 2015. **23**(1): p. 44-7.
99. Shah, S.P. and A. Misra, *Liposomal amphotericin B dry powder inhaler: effect of fines on in vitro performance*. Pharmazie, 2004. **59**(10): p. 812-3.

100. Kirkpatrick, W.R., et al., *Prophylactic efficacy of single dose pulmonary administration of amphotericin B inhalation powder in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(4): p. 970-6.
101. *ClinicalTrials.gov*
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Amphotericin+B+inhalation+&cntry=&state=&city=&dist=>. Accessed Date: 03/06/2019.
102. Torrado, J.J., et al., *Amphotericin B formulations and drug targeting*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(7): p. 2405-2425.
103. Tamargo, J., J.Y. Le Heuzey, and P. Mabo, *Narrow therapeutic index drugs: a clinical pharmacological consideration to flecainide*. Eur J Clin Pharmacol, 2015. **71**(5): p. 549-67.
104. Grazziotin, L.R., L.B. Moreira, and M.A.P. Ferreira, *Comparative effectiveness and safety between amphotericin b lipid-formulations: a systematic review*. International Journal of Technology Assessment in Health Care, 2018. **34**(3): p. 343-351.
105. Serrano, D.R., et al., *Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations*. Int J Pharm, 2013. **447**(1-2): p. 38-46.
106. Bolard, J., *Mechanism of Action of an Anti-Candida Drug: Amphotericin B and Its Derivatives*. 1991. p. 214-238.
107. Hamill, R.J., *Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity*. Drugs, 2013. **73**(9): p. 919-34.
108. Waterman, K.C., *The application of the Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) to quality by design (QbD) for drug product stability*. AAPS PharmSciTech, 2011. **12**(3): p. 932-7.
109. Serrano, D.R., et al., *Optimising the in vitro and in vivo performance of oral cocrystal formulations via spray coating*. Eur J Pharm Biopharm, 2018. **124**: p. 13-27.
110. Curtin, V., et al., *Reducing mechanical activation-induced amorphisation of salbutamol sulphate by co-processing with selected carboxylic acids*. Int J Pharm, 2013. **456**(2): p. 508-16.
111. Grossjohann, C., et al., *Polymorphism in sulfadimidine/4-aminosalicylic acid cocrystals: solid-state characterization and physicochemical properties*. J Pharm Sci, 2015. **104**(4): p. 1385-98.
112. Ruiz, H.K., et al., *New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and Leishmania spp.* Int J Pharm, 2014. **473**(1-2): p. 148-57.
113. Zelko, R., et al., *Effect of plasticizer on the dynamic surface tension and the free volume of Eudragit systems*. Int J Pharm, 2002. **244**(1-2): p. 81-6.
114. Serrano, D.R., et al., *Cocrystal habit engineering to improve drug dissolution and alter derived powder properties*. J Pharm Pharmacol, 2016. **68**(5): p. 665-77.
115. Jullien, S., et al., *Study of the effects of liposomal amphotericin B on Candida albicans, Cryptococcus neoformans, and erythrocytes by using small unilamellar vesicles prepared from saturated phospholipids*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1989. **33**(3): p. 345-349.
116. Pereira Damasceno Lima, M., et al., *Technological development of microemulsions with perspectives for pain treatment: a patent review*. Vol. 28. 2018.
117. Chang, Y., Y.-H. Wang, and C. Hu, *Simultaneous determination of purity and potency of amphotericin B by HPLC*. Vol. 64. 2011. 735-9.
118. Selvam, S. and A. Mishra, *Disaggregation of amphotericin B by sodium deoxycholate micellar aggregates*. Vol. 93. 2008. 66-70.
119. Yu, B.G., et al., *Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B*. J Control Release, 1998. **53**(1-3): p. 131-6.

120. Kagan, L., et al., *Physiologically based pharmacokinetic model of amphotericin B disposition in rats following administration of deoxycholate formulation (Fungizone(R)): pooled analysis of published data*. AAPS J, 2011. **13**(2): p. 255-64.
121. Serrano, D.R., et al., *Oral Particle Uptake and Organ Targeting Drives the Activity of Amphotericin B Nanoparticles*. Molecular Pharmaceutics, 2015. **12**(2): p. 420-431.
122. Moreno-Rodriguez, A.C., et al., *Efficacy and toxicity evaluation of new amphotericin B micelle systems for brain fungal infections*. Int J Pharm, 2015. **494**(1): p. 17-22.
123. Thomas, D.C. and S.D. Christian, *Micellar and surface behavior of sodium deoxycholate characterized by surface tension and ellipsometric methods*. Journal of Colloid and Interface Science, 1980. **78**(2): p. 466-478.
124. Sun, D.D. and P.I. Lee, *Evolution of Supersaturation of Amorphous Pharmaceuticals: The Effect of Rate of Supersaturation Generation*. Molecular Pharmaceutics, 2013. **10**(11): p. 4330-4346.
125. Umegawa, Y., et al., *Possible conformation of amphotericin B dimer in membrane-bound assembly as deduced from solid-state NMR*. Bioorg Med Chem, 2012. **20**(19): p. 5699-704.
126. Chudzik, B., et al., *Amphotericin B-copper(II) complex shows improved therapeutic index in vitro*. Vol. 97. 2016.
127. Fung, Y.C. and P. Tong, *Theory of the sphering of red blood cells*. Biophysical journal, 1968. **8**(2): p. 175-198.
128. Mukherjee, K., A. Barman, and R. Biswas, *Impact of the aggregation behaviour of sodium cholate and sodium deoxycholate on aqueous solution structure and dynamics: A combined time resolved fluorescence and dielectric relaxation spectroscopic study*. Journal of Molecular Liquids, 2016. **222**: p. 495-502.
129. Avranas, A. and V.V. Tasopoulos, *Aqueous Solutions of Sodium Deoxycholate and Hydroxypropylmethylcellulose: Dynamic Surface Tension Measurements*. J Colloid Interface Sci, 2000. **221**(2): p. 223-229.
130. Espada, R., et al., *Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations*. Int J Pharm, 2008. **361**(1-2): p. 64-9.
131. Gomez-Bombarelli, R., E. Calle, and J. Casado, *Mechanisms of lactone hydrolysis in neutral and alkaline conditions*. J Org Chem, 2013. **78**(14): p. 6868-79.
132. Chenoweth, C.E., et al., *Acquired immunodeficiency syndrome-related visceral leishmaniasis presenting in a pleural effusion*. Chest, 1993. **103**(2): p. 648-9.
133. Ordonez-Gutierrez, L., et al., *In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of Leishmania infantum*. Int J Antimicrob Agents, 2007. **30**(4): p. 325-9.
134. DrugPatentWatch, *Drug Patent Expirations and Intelligent Drug Patent Watch*. <http://www.drugpatentwatch.com>, 27/09/2010.
135. EMA., I.M.A.a., https://www.ema.europa.eu/en/medicines?search_api_views_fulltext=INHALED+MEDICINES. Accessed date: 29/04/2018.
136. Berkenfeld, K., A. Lamprecht, and J.T. McConville, *Devices for dry powder drug delivery to the lung*. AAPS PharmSciTech, 2015. **16**(3): p. 479-90.
137. Sosnowski, T.R., *Selected Engineering and Physicochemical Aspects of Systemic Drug Delivery by Inhalation*. Curr Pharm Des, 2016. **22**(17): p. 2453-62.
138. Dickinson, P.A., S.W. Howells, and I.W. Kellaway, *Novel nanoparticles for pulmonary drug administration*. J Drug Target, 2001. **9**(4): p. 295-302.
139. Vartiainen, V., et al., *Pulmonary administration of a dry powder formulation of the antifibrotic drug tilorone reduces silica-induced lung fibrosis in mice*. Int J Pharm, 2018. **544**(1): p. 121-128.
140. Paranjpe, M. and C.C. Muller-Goymann, *Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(4): p. 5852-73.

141. Chono, S., et al., *Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes*. J Drug Target, 2006. **14**(8): p. 557-66.
142. B. Lamy, D.R.S., P. O'Connell, W. Couet, S. Marchand, A. M Healy F.Tewes, *Use of leucine to improve aerodynamic properties of ciprofloxacin-loaded maltose microparticles for inhalation* European Journal of Pharmaceutical Research, 2019. **1**(1): p. 2-11.
143. B. Guebitz, H.S., J.G. Khinast,, *A risk management ontology for Quality-by Design based on a new development approach according GAMP 5.0*. Expert Syst Appl 2012. **39**: p. 7291-7301.
144. Walsh, D., et al., *Engineering of pharmaceutical cocrystals in an excipient matrix: Spray drying versus hot melt extrusion*. Int J Pharm, 2018. **551**(1-2): p. 241-256.
145. Salzano, G., et al., *Cyclodextrin-based nanocarriers containing a synergic drug combination: A potential formulation for pulmonary administration of antitubercular drugs*. Int J Pharm, 2017. **531**(2): p. 577-587.
146. Serrano, D.R., et al., *Modelling and shadowgraph imaging of cocrystal dissolution and assessment of in vitro antimicrobial activity for sulfadimidine/4-aminosalicylic acid cocrystals*. Eur J Pharm Sci, 2016. **89**: p. 125-36.
147. Antony J. Cutler, K.A.D., *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*. 1998.
148. Rojek, B. and M. Wesolowski, *FTIR and TG analyses coupled with factor analysis in a compatibility study of acetazolamide with excipients*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2019. **208**: p. 285-293.
149. Serrano, D.R., et al., *Designing Fast-Dissolving Orodispersible Films of Amphotericin B for Oropharyngeal Candidiasis*. Pharmaceutics, 2019. **11**(8).
150. Park, C.W., et al., *Advanced spray-dried design, physicochemical characterization, and aerosol dispersion performance of vancomycin and clarithromycin multifunctional controlled release particles for targeted respiratory delivery as dry powder inhalation aerosols*. Int J Pharm, 2013. **455**(1-2): p. 374-92.
151. Corrigan, D.O., A.M. Healy, and O.I. Corrigan, *Preparation and release of salbutamol from chitosan and chitosan co-spray dried compacts and multiparticulates*. Eur J Pharm Biopharm, 2006. **62**(3): p. 295-305.
152. Ader, F., et al., *Invasive pulmonary aspergillosis in chronic obstructive pulmonary disease: an emerging fungal pathogen*. Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(6): p. 427-9.
153. Broeders, M.E., et al., *Salbutamol pMDI gives less protection to methacholine induced airway obstruction than salbutamol via spacer or DPI*. Eur J Clin Pharmacol, 2005. **60**(12): p. 837-41.
154. Tewes, F., et al., *Ciprofloxacin-Loaded Inorganic-Organic Composite Microparticles To Treat Bacterial Lung Infection*. Mol Pharm, 2016. **13**(1): p. 100-12.
155. Dea-Ayuela, M.A., et al., *In vivo and in vitro anti-leishmanial activities of 4-nitro-N-pyrimidin- and N-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and N2-(4-nitrophenyl)-N1-propylglycinamide*. Bioorg Med Chem, 2009. **17**(21): p. 7449-56.
156. Bilbao-Ramos, P., et al., *A fluorometric method for evaluation of pharmacological activity against intracellular Leishmania amastigotes*. J Microbiol Methods, 2012. **89**(1): p. 8-11.
157. Waterman, K.C., J.T. Swanson, and B.L. Lippold, *A scientific and statistical analysis of accelerated aging for pharmaceuticals. Part 1: accuracy of fitting methods*. J Pharm Sci, 2014. **103**(10): p. 3000-6.
158. Shukla, A., et al., *Alginate coated chitosan microparticles mediated oral delivery of diphtheria toxoid. Part A. Systematic optimization, development and characterization*. Int J Pharm, 2015. **495**(1): p. 220-233.

159. Elefanti, A., et al., *Amphotericin B- and voriconazole-echinocandin combinations against Aspergillus spp.: Effect of serum on inhibitory and fungicidal interactions*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(10): p. 4656-63.
160. Elefanti, A., et al., *Inhibitory and fungicidal effects of antifungal drugs against Aspergillus species in the presence of serum*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(4): p. 1625-31.
161. Herbrecht, R., et al., *Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 408-15.
162. Loftsson, T., *Drug permeation through biomembranes: cyclodextrins and the unstirred water layer*. Pharmazie, 2012. **67**(5): p. 363-70.
163. Alayande, A.B., L.H. Kim, and I.S. Kim, *Cleaning efficacy of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin for biofouling reduction on reverse osmosis membranes*. Biofouling, 2016. **32**(4): p. 359-70.
164. Challa, R., et al., *Cyclodextrins in drug delivery: an updated review*. AAPS PharmSciTech, 2005. **6**(2): p. E329-57.
165. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-cyclodextrins-used-excipients-medicinal-products-human-use_en.pdf. 2017; [Cyclodextrins used as excipients].
166. Molina, C., et al., *Agglomerated novel spray-dried lactose-leucine tailored as a carrier to enhance the aerosolization performance of salbutamol sulfate from DPI formulations*. Drug Deliv Transl Res, 2018. **8**(6): p. 1769-1780.
167. Mangal, S., et al., *Physico-Chemical Properties, Aerosolization and Dissolution of Co-Spray Dried Azithromycin Particles with L-Leucine for Inhalation*. Pharm Res, 2018. **35**(2): p. 28.
168. Yang, Y., et al., *Effects of formulation and operating variables on zanamivir dry powder inhalation characteristics and aerosolization performance*. Drug Deliv, 2014. **21**(6): p. 480-6.
169. Mah, P.T., et al., *The use of hydrophobic amino acids in protecting spray dried trehalose formulations against moisture-induced changes*. Eur J Pharm Biopharm, 2019. **144**: p. 139-153.
170. Otake, H., et al., *Inhalable Spray-Freeze-Dried Powder with L-Leucine that Delivers Particles Independent of Inspiratory Flow Pattern and Inhalation Device*. Pharm Res, 2016. **33**(4): p. 922-31.
171. Cui, Y., et al., *Moisture-Resistant Co-Spray-Dried Netilmicin with L-Leucine as Dry Powder Inhalation for the Treatment of Respiratory Infections*. Pharmaceutics, 2018. **10**(4).
172. Brown, G.D., *Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 33-43.
173. Pinto, M.R., E. Barreto-Bergter, and C.P. Taborda, *Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system*. Braz J Microbiol, 2008. **39**(2): p. 195-208.
174. Stahl, P.D. and R.A. Ezekowitz, *The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(1): p. 50-5.
175. Corral, M.J., et al., *Efficacy of low doses of amphotericin B plus allicin against experimental visceral leishmaniasis*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(12): p. 3268-74.
176. Cheepsattayakorn, A. and R. Cheepsattayakorn, *Parasitic pneumonia and lung involvement*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 874021.
177. Russo, R., et al., *Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections*. Ann Trop Med Parasitol, 2003. **97** Suppl 1: p. 99-105.
178. ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=amphotericin+B+inhalation&term=&cntry=&state=&city=&dist=>. 2019.

179. Quon, B.S., C.H. Goss, and B.W. Ramsey, *Inhaled antibiotics for lower airway infections*. Ann Am Thorac Soc, 2014. **11**(3): p. 425-34.
180. Shah, S.P. and A. Misra, *Development of liposomal amphotericin B dry powder inhaler formulation*. Drug Deliv, 2004. **11**(4): p. 247-53.
181. ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01857479>. 2020.
182. Mazerski, J., J. Grzybowska, and E. Borowski, *Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media*. Eur Biophys J, 1990. **18**(3): p. 159-64.
183. Mazerski, J. and E. Borowski, *Molecular dynamics of amphotericin B. II. Dimer in water*. Biophys Chem, 1996. **57**(2-3): p. 205-17.
184. Bolard, J., et al., *One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium*. Biochemistry, 1991. **30**(23): p. 5707-15.
185. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **46**(1-3): p. 3-26.
186. Brajtburg, J. and J. Bolard, *Carrier effects on biological activity of amphotericin B*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(4): p. 512-31.
187. Torrado, J.J., et al., *Amphotericin B formulations and drug targeting*. J Pharm Sci, 2008. **97**(7): p. 2405-25.
188. Darole, P.S., D.D. Hegde, and H.A. Nair, *Formulation and evaluation of microemulsion based delivery system for amphotericin B*. AAPS PharmSciTech, 2008. **9**(1): p. 122-8.
189. H., W., *Predictive Stability Testing Utilizing Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) Studies*. Humana Press, New York, 2018. **Methods in Pharmacology and Toxicology**(In: Bajaj S., Singh S. (eds) Methods for Stability Testing of Pharmaceuticals.).
190. Baber, N., *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH)*. Br J Clin Pharmacol, 1994. **37**(5): p. 401-4.
191. Patel, R., *Amphotericin B colloidal dispersion*. Expert Opin Pharmacother, 2000. **1**(3): p. 475-88.
192. Heinemann, V., et al., *Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (Ambisome) in critically ill patients*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(6): p. 1275-80.
193. Dupont, B., *Overview of the lipid formulations of amphotericin B*. J Antimicrob Chemother, 2002. **49 Suppl 1**: p. 31-6.
194. Morgan, D.J., et al., *Elimination of amphotericin B in impaired renal function*. Clin Pharmacol Ther, 1983. **34**(2): p. 248-53.
195. Palacios, D.S., et al., *Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(17): p. 6733-8.
196. Harrell, E.R. and A.C. Curtis, *The treatment of North American blastomycosis with amphotericin B*. AMA Arch Derm, 1957. **76**(5): p. 561-8; discussion 568-9.
197. Hofstra, W., H.G. de Vries-Hospers, and D. van der Waaij, *Concentrations of amphotericin B in faeces and blood of healthy volunteers after the oral administration of various doses*. Infection, 1982. **10**(4): p. 223-7.
198. Malati, C.Y., et al., *Pursuing use of optimal formulations for paediatric HIV epidemic control - a look at the use of LPV/r oral pellets and oral granules*. J Int AIDS Soc, 2019. **22**(4): p. e25267.

199. Zheng, D., et al., *Decomposing properties of phosphogypsum with iron addition under two-step cycle multi-atmosphere control in fluidised bed*. Waste Manag Res, 2018. **36**(2): p. 183-193.
200. Diezi, T.A. and G. Kwon, *Amphotericin B/sterol co-loaded PEG-phospholipid micelles: effects of sterols on aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B*. Pharm Res, 2012. **29**(7): p. 1737-44.
201. Brajtburg, J., et al., *Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action*. Antimicrob Agents Chemother, 1990. **34**(2): p. 183-8.
202. Barwicz, J., S. Christian, and I. Gruda, *Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(10): p. 2310-5.
203. Yu, B.G., et al., *In vitro dissociation of antifungal efficacy and toxicity for amphotericin B-loaded poly(ethylene oxide)-block-poly(beta benzyl L aspartate) micelles*. J Control Release, 1998. **56**(1-3): p. 285-91.
204. Chattopadhyay, A. and M. Jafurulla, *A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **416**(1-2): p. 7-12.
205. Dolores R. Serrano, A.L., *Oral amphotericin B: The journey from bench to market*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2017. **42**(1773-2247): p. 75-83.
206. Podhaler, T. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tobi-podhaler#product-information-section>.
207. EMA., I.M.A.a., *ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development*. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q8-r2-pharmaceutical-development#current-effective-version-section>, 2017. EMA/CHMP/ICH/167068/2004 Committee for Human Medicinal Products.
208. Ruiz, H., *Tesis doctoral: Desarrollo y caracterización de una formulación tópica de anfotericina B con gamma-ciclodextrina*. Universidad Complutense de Madrid. **Madrid**.
209. Lambing, H.E., B.D. Wolf, and S.C. Hartsel, *Temperature effects on the aggregation state and activity of amphotericin B*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1152**(1): p. 185-8.
210. Gaboriau, F., et al., *Physico-chemical properties of the heat-induced 'superaggregates' of amphotericin B*. Biophys Chem, 1997. **66**(1): p. 1-12.
211. Gagos, M., et al., *Anomalous high aggregation level of the polyene antibiotic amphotericin B in acidic medium: implications for the biological action*. Biophys Chem, 2008. **136**(1): p. 44-9.
212. Barwicz, J. and P. Tancrede, *The effect of aggregation state of amphotericin-B on its interactions with cholesterol- or ergosterol-containing phosphatidylcholine monolayers*. Chem Phys Lipids, 1997. **85**(2): p. 145-55.
213. Ohtani, Y., et al., *Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes*. Eur J Biochem, 1989. **186**(1-2): p. 17-22.
214. Norred, W.P., et al., *Mechanism of dimethyl sulfoxide-induced hemolysis*. J Pharm Sci, 1970. **59**(5): p. 618-22.
215. Bennett, J.E., et al., *Correlation of Particle Size of Intravenous Amphotericin B with Toxic and Chemotherapeutic Effects*. Antimicrob Agents Chemother (Bethesda), 1963. **161**: p. 745-52.
216. Prajapati, V.K., et al., *An oral formulation of amphotericin B attached to functionalized carbon nanotubes is an effective treatment for experimental visceral leishmaniasis*. J Infect Dis, 2012. **205**(2): p. 333-6.
217. Sanchez-Brunete, J.A., et al., *Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(9): p. 3246-52.

Anfotericina características fisicoquímica
s formulaciones orales de AmB AmBisome F
ungizone anfotericina B pellet estabilidad
acelerada **CONCLUSIONES** formulac
iones administración pulmonar tamaño a
erodinámico de las partículas CD manos al
eucina distribución RT retículo endotelial t
oxicidad hemolítica macrófagos Leishma
nia AmB Beagle shipotensión ciclodextrin
aschitosán modificado anfotericina polia
gregada tamaño de partícula absorción or
al toxicidad hemolítica biodistribución pr
olonga circulación plasmática combina
ción con SS distinta capacidad respirator
ias AmB DPLY nebulización estabilidad

CONCLUSIONES

1. Se ha logrado mejorar las propiedades fisicoquímicas de la AmB en formulaciones de administración oral mediante el uso de los excipientes adecuados y empleando la técnica de recubrimiento de pellets.
2. De las cuatro formulaciones de pellets de AmB desarrolladas, la formulación B2 (AmB-NaDoc-HPMCAS y Eudragit L-100) presenta una mejor estabilidad, un índice terapéutico más alto y una liberación retardada del fármaco en medios fisiológicos (> 50% a las 6h), lo que la convierte en la mejor candidata para iniciar ensayos preclínicos de seguridad y eficacia.
3. La combinación de AmB-CD-leucina y manosa en cantidades adecuadas es clave para el desarrollo de formulaciones DPI efectivas y seguras para el tratamiento de infecciones fúngicas pulmonares.
4. Las formulaciones DPI optimizadas (F1 y F2) para su administración pulmonar tienen valores de MMAD menores de 3 μm y valores de FPF < 3 μm y FPF < 5 μm por encima del 50% y 75% respectivamente, lo cual representa una distribución eficaz del fármaco a lo largo del TR.
5. La formulación semicristalina optimizada F1 que consiste en 29.8% de AmB, 29.8% de γ -CD, 29.8% de manosa y 10.4% de leucina ha demostrado una mayor FPF comprendida entre 5 y 3 μm a diferentes flujos de aire y una mayor estabilidad a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración.
6. La formulación F1 ha presentado mayores tiempos de retención del fármaco en plasma y en ELF tras la administración *in vivo* intratraqueal que la formulación en estado amorfo (F2) con una mayor captación en macrófagos que podría

suponer un gran beneficio en el tratamiento de la leishmaniasis visceral diseminada que afecta también al pulmón.

7. El desarrollo de DPI con dosis fijas combinadas de AmB-SS ha sido factible gracias al empleo de la micorencapsulación mediante sistemas de atomización ofreciendo una perspectiva esperanzadora para el tratamiento de infecciones pulmonares fúngicas que cursan con obstrucción reversible de las vías respiratorias.

1. An overall improvement in the physico-chemical properties of the AmB have been achieved upon formulations by spray coating technique with appropriate excipients, making it suitable for the development of oral formulations.
2. From the four developed AmB pellet formulations, the one with the better stability profile, but also with the highest therapeutic index was B2 (AmB-NaDoc-HPMCAS and Eudragit L-100) with a suitable sustained drug release in physiological media (>50% at 6h), making it the best candidate for further tests and preclinical trials
3. The combination of AmB-CD-leucine and mannose in appropriate amounts is key for the development of effective and safer DPI formulations for the treatment of pulmonary fungal infections.
4. Aerodynamic particle size plays a key role in drug biodistribution along the RT and toxicity after pulmonary administration of AmB DPI formulations. Optimised DPI formulations (F1 and F2) have shown MMAD value below 3 μm and a $\text{FPF} < 3 \mu\text{m}$ y $\text{FPF} < 5 \mu\text{m}$ between 50% y 75% respectively.
5. F1 optimised semicrystalline formulation consisting of 29.8% AmB, 29.8% γ -CD, 29.8% mannose and 10.4% leucine has shown a greater FPF below 5 and 3 μm at different air flows, longer stability at refrigerated and room temperature conditions.
6. After intratracheal *in vivo* administration, F1 recorded higher retention times in plasma and ELF than F2 amorphous formulation. Also, F1 has exhibited a larger macrophage uptake which could be of great benefit in the treatment of disseminated visceral leishmaniasis affecting also the lung.
7. The development of the fixed dose AmB-SS combination DPI by spray drying is an interesting approach for the treatment of fungal pulmonary infections that courses with bronchoconstriction.

PATENTE

Borrador solicitud patente

DESCRIPCIÓN

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

SECTOR DE LA TÉCNICA

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

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

Sin embargo, es deseable disponer de una formulación de AmB administrable por vía inhalatoria, ya que permite una rápida acción de los fármacos siendo útil, en particular,

para la administración local de fármacos que actúan sobre las vías respiratorias inferiores

De hecho, la mayoría de los ensayos clínicos sobre administración de AmB están enfocados en la seguridad y eficacia de formulaciones lipídicas de AmB inhaladas comerciales.

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

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

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

Por ello, sería deseable una formulación de anfotericina B que se pueda administrar en forma de polvo y esté libre de excipientes que causen irritación bronquial y que puedan incorporar otros antifúngicos y broncodilatadores para acentuar su efecto.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe formulaciones farmacéuticas de anfotericina B conteniendo anfotericina B sola o en combinación con otros fármacos antifúngicos para incrementar su eficacia, o en combinación con otros fármacos broncodilatadores, de administración pulmonar en polvo seco. Estas formulaciones constituyen una solución al problema clínico de la falta de medicamentos disponibles para el tratamiento y la profilaxis de infecciones pulmonares causadas por hongos o patógenos intracelulares como la leishmaniosis o la tuberculosis.

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

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

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

contenido total de la formulación, en donde el fármaco puede encontrarse en forma amorfa o semicristalina (hasta un 50%).

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

- a) Se prepara una disolución en medio acuoso de γ -ciclodextrina y se ajusta el pH de dicha disolución entre 12 y 14.
- b) A continuación se añade la AmB (en una cantidad entre el 5 – 40% del total del peso de la formulación) a la disolución de la etapa (a) en una relación peso AmB: γ -ciclodextrina entre 1:1 y 1:50 y se agita constantemente hasta su completa disolución.
- c) Se ajusta el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 6 y 8, y se sonica si es necesario para conseguir una mezcla homogénea.
- d) Se añade un monosacárido (como, por ejemplo, manosa, rafinosa o manitol) a la suspensión acuosa en una proporción entre el 5 y el 40% en peso del total (relación peso AmB: monosacárido de 1:1)
- e) A continuación se incorpora un aminoácido (como la leucina o isoleucina) a la suspensión anterior en proporciones por debajo del 20% en peso del total de la formulación.

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

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

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

Respecto a los oligosacáridos, es conocido que la ciclodextrina tiene la capacidad de difundir a través del moco producido en ciertas infecciones pulmonares y facilitar la desestabilización del biofilm formado por microorganismos. Estos defectos suelen ser

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

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

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

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

Figura 1. Caracterización físico-química de las micropartículas colapsadas de AmB e Itraconazol: (a) SEM de la formulación semicristalina de AmB, (b) SEM de la formulación amorfa de AmB y (c) SEM de la formulación de itraconazol.

Figura 2. Actividad *in vitro* antifúngica frente a *Candida ssp.* Clave: Diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) en *C. albicans*, *C. parasilopsis* y *C. glabrata* están expresadas mediante *, # y &, respectivamente, en comparación con los discos comerciales de Neosensitab® de AmB.

Figura 3. Estudio de la captación por macrófagos: (a) captación de micropartículas de AmB en presencia de macrófagos utilizando una concentración de AmB de 1,56 µg/ml tras 1, 4 y 24 h de exposición. (b) captación de micropartículas de AmB en presencia de macrófagos a diferentes concentraciones de AmB tras 1h de exposición. Clave: ■ micropartículas de AmB semicristalina; ● micropartículas de AmB amorfa; ▲ AmB dimérica.

Figura 4. Resultado del estudio de la toxicidad hemolítica de los excipientes utilizados en la invención en las micropartículas colapsadas frente a la AmB en varios estados de agregación: dimérica (a una concentración de 62,5 µg/ml) y monomérica (a una concentración de 25 µg/ml). Clave: AmB dimérica (D); AmB dimérica + manosa (D+M); AmB dimérica + leucina (D+L); AmB dimérica + leucina + manosa (D+L+M); AmB monomérica (M); AmB monomérica + manosa (M+M); AmB monomérica + leucina (M+L); AmB monomérica + manosa + leucina (M+M+L).

Figura 5. Tamaño aerodinámico (MMDA) y fracción de partículas (FPF) de formulaciones de AmB evaluados en tres condiciones diferentes: i) formulación en polvo seco (25 mg) para pacientes con una capacidad inspiratoria normal (60 L/min durante 4 s); ii) formulación en polvo seco (25 mg) para pacientes con una capacidad inspiratoria reducida (30 L/min durante 8 s) y iii) formulación en polvo seco (25 mg) reconstituida con agua (5 ml) hasta una concentración de 5 mg/ml y nebulizada con un dispositivo nebulizador de malla y ultrasonidos a 25 L/min durante 15 min. Clave; a) Deposición acumulada de AmB en función del tamaño de partícula y b) porcentaje de AmB recuperada en diferentes estados desde el inhalador hasta partes más bajas de los pulmones para formulación de AmB semicristalina. c) Deposición acumulada de AmB en función del tamaño de partícula y d) porcentaje de AmB recuperada en diferentes estados desde el inhalador hasta partes más bajas de los pulmones para formulación de AmB amorfa. e) Deposición acumulada de AmB en función del tamaño de partícula y f) porcentaje de AmB recuperada en diferentes estados desde el inhalador hasta partes más bajas de los pulmones para AmBisome® (formulación comercial).

Figura 6. Perfil farmacocinético tras la administración intratraqueal de 5 mg/kg de la formulación F1 de AmB en polvo seco semicristalina (a) y la formulación F2 de AmB en polvo amorfa (b), comparada con la formulación comercial AmBisome®. Clave: -- ■ -- Concentración de AmBisome® en plasma tras ser administrada por vía intravenosa, - ▲ - Concentración de AmB en tejido epitelial pulmonar y - ■ - Concentración de AmB

en plasma.

Figura 7. Formulaciones de AmB combinadas con itraconazol. Tamaño de la partícula aerodinámico (MMDA) y fracción de partículas (FPF) por debajo de 5 y 3 μm . Formulación en polvo seco (25 mg) para pacientes con una capacidad inspiratoria normal (60 L/min durante 4 s). Clave: - ■ - F3 (20% total de antifúngicos), - ● - F4 (30% total de antifúngicos) y - ▲ - F5 (40% total de antifúngicos). A y B) Cantidad depositada de AmB en las distintas capas de impactación y C y D) Cantidad depositada de itraconazol en las distintas capas de impactación.

Figura 8. Formulación combinada de AmB con salbutamol. Clave: A) SEM de las micropartículas colapsadas conteniendo ambos fármacos. B) Deposición in vitro a 60 L/min durante 4 s utilizando un impactador de próxima generación (NGI).

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

F1: Formulación cristalina (45% de cristalinidad) de AmB que contiene una proporción de AmB: γ -ciclodextrina:manosa en peso 1:1:1 y un 10,4 % de leucina.

F2: Formulación amorfa de AmB que contiene una proporción de AmB: γ -ciclodextrina:manosa en peso 1:1:0,2 y un 12,5 % de leucina.

F3: Formulación de AmB que contiene un 20% de antifúngicos.

F4: Formulación de AmB que contiene un 30% de antifúngicos.

F5: Formulación de AmB que contiene un 40% de antifúngicos.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

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

Ejemplo 1.

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

Se prepara una disolución en medio acuoso de γ -ciclodextrina y se ajusta el pH de dicha disolución entre 12 y 14. A continuación se añade la AmB (en una cantidad equivalente en peso al de la ciclodextrina (ratio 1:1) y se agita constantemente hasta su completa dispersión. Se ajusta el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 6 y 8, y se sonica durante 10 min en un baño de agua. Se añade manosa a la suspensión acuosa en una proporción AmB: γ -ciclodextrina:manosa de 1:1:1 (en peso) para la formulación descrita como F1, o AmB: γ -ciclodextrina:manosa en una proporción de 1:1:0.2 (en peso) para la formulación descrita como F2. A continuación se incorpora un aminoácido (como la leucina) a la suspensión anterior en proporciones por debajo del 20% en peso del total de la formulación, en particular en un 10.4% para la F1 y en un 12.5% para la F2.

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

Ejemplo 2.

Este ejemplo se refiere a la preparación de formulaciones de itraconazol como antifúngico siguiendo el método descrito.

En las formulaciones de itraconazol, se prepararon varias suspensiones acuosas con la misma concentración de sólidos totales del 0.5% y una cantidad total de fármaco entre el 10-30%. Para la formulación con un total de 20% de fármaco, se disolvió en 200 ml de agua desionizada, 200 mg de γ -ciclodextrina. Se añadieron 200 mg de itraconazol, 200 mg de L-leucina y 400 mg de manitol a la suspensión y se sonicó hasta conseguir una suspensión homogénea antes de ser atomizada.

En la figura 1c, se observan micropartículas de itraconazol con morfología similar a las de AmB.

Ejemplo 3.

En este ejemplo se muestra la influencia de las variables de atomización de las formulaciones del ejemplo 1.

Todas las formulaciones preparadas presentaban un tamaño de partícula entre 1 y 5 μm , siendo menor el tamaño cuanto mayor es el caudal de nitrógeno. La fuerza de aspiración y la temperatura de entrada tienen efecto contrario sobre el rendimiento de forma que se obtienen rendimientos mayores a baja fuerza de aspiración y temperatura de entrada alta.

Ejemplo 4.

En este ejemplo se muestra la influencia de las proporciones de AmB, excipientes y aminoácido en las propiedades de la formulación de AmB preparadas.

Se preparan formulaciones variando la relación en peso AmB: γ -ciclodextrina entre 1:1 y 1:100 en peso, la relación en peso AmB:manosa entre 1:1 y 1:5 en peso y la leucina empleada para mejorar las propiedades de flujo entre el 5 y el 15% en peso.

Los parámetros del proceso de atomización se mantienen en 10% de tasa de atomización (4 mL/min), caudal de nitrógeno de 742 NI/h, temperatura de entrada 150°C y tasa de aspiración del 90%.

En relación al grado de cristalinidad, las variables más influyentes resultan la relación AmB: γ -ciclodextrina y la relación AmB:manosa. El mayor grado de cristalinidad se obtiene cuanto mayor es la cantidad de manosa utilizada y menor es la de γ -ciclodextrina y leucina. En la Figura 1 se muestra la caracterización físico-química de dos formulaciones con distinto grado de cristalinidad, F1 (45% de cristalinidad) y F2 (amorfa). La proporción AmB: γ -ciclodextrina:manosa es 1:1:1 (en peso) y el porcentaje de leucina es del 10,4% para F1; la proporción AmB: γ -ciclodextrina:manosa es 1:1:0,2 (en peso) y el porcentaje de leucina es del 12,5 % en F2.

En las micrografías obtenidas por SEM para F1 y F2 (figura 1a-b, respectivamente), se observan partículas colapsadas semiesféricas con superficies rugosas. En F1 se observan también pequeños cristales no encapsulados de tamaño próximo a 1 μm .

Ejemplo 5.

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

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

Ejemplo 6.

En este ejemplo se prueba la actividad antifúngica *in vitro* de las formulaciones de AmB.

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

Los diámetros de la zona de inhibición se miden en puntos donde hay una inhibición completa de crecimiento de levadura. Los aislados se clasifican en susceptibles a AmB (S) cuando la zona de inhibición es mayor de 15 mm, resistentes (R) si la zona de inhibición es menor de 10 mm e intermedios (I) si la zona de inhibición está entre 11 y 14 mm. En la Figura 2, se observa que las tres cepas de *Candida* probadas son susceptibles a las formulaciones F1 y F2 con un halo de inhibición mayor de 15 mm. F1 y F2 muestran una mayor eficacia significativa ($p < 0,05$) que los discos de AmB comerciales Neo-Sansitabs® contra *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

Ejemplo 7.

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

Se crecen células de línea J774 (línea celular similar a monocitos murinos) en MEM (*Minimum Essential Medium*) desarrollado por Eagle en presencia de FBS (*Fetal Bovine Serum*), 100 UI/mL de penicilina G y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin en matraz de 25 mL a 37°C y atmósfera humidificada 5% CO_2 /aire. Las células J774 (100 μl equivalente a 5×10^5 células/ml) se incuban a 37°C con 100 μl de cada formulación de AmB antes de ser reconstituidas con agua desionizada y diluidas a varias concentraciones, entre 25 y 0,195 $\mu\text{g/mL}$. La AmB dimérica se utiliza como control en las mismas concentraciones. Después de varios tiempos de incubación (1, 4 y 24 h), el sobrenadante se elimina y se

lava toda la placa con medio macrófago frío (RPMI). La lisis celular se lleva a cabo con 250 μ l de Triton 1% en PBS seguido de 30 minutos bajo agitación leve. Después, se transfieren 100 μ l a otra placa de 96 pocillos y se incorporan 100 μ l de metanol para solubilizar la AmB y precipitar los restos celulares. La placa se centrifuga durante 10 minutos a 2500 rpm. Finalmente, se recoge el sobrenadante y se analiza por HPLC.

Las formulaciones F1 y F2 se diferencian en el grado de cristalinidad de la AmB presentes en las micropartículas y contienen AmB:CD:manosa en proporciones 1:1:1 y 1:1:0,2, respectivamente, y leucina en proporciones próximas al 10%. Para estudiar la influencia de los excipientes utilizados en las formulaciones reivindicadas (CD, manosa y leucina), se realizan comparativas de F1 y F2 (que contienen manosa y leucina) con formulaciones de AmB acuosas que contienen solamente desoxicolato sódico (DOC) o CD. La AmB disuelta en agua y dependiendo de los excipientes, se puede encontrar en diferentes estados de agregación. En este caso, la AmB en DOC (relación AmB:DOC 50:41 en peso) se encuentra en estado dimérico y la AmB en CD (relación AmB:CD 1:100 en peso), se encuentra en estado monomérico. Por ello, se refiere a estas formulaciones como AmB dimérica y AmB monomérica.

El perfil de captación *in vitro* (Figura 3) de las formulaciones atomizadas de AmB en células diferenciadas J77A es marcadamente diferente al de la AmB dimérica. La formulación F1 muestra una captación de 5 a 8 veces mayor que F2 a 4 y 24 h ($p < 0,05$) y de 5 a 14 veces mayor que la AmB dimérica a los mismos tiempos ($p < 0,05$). La captación de la formulación F2 es similar a la AmB dimérica excepto a largos periodos de tiempo (24h) (Figura 3a).

Para tiempos de 1h no se observan diferencias estadísticas entre las tres formulaciones cuando se prueba a concentraciones intermedias (0,4 – 1,56 μ g/ml). Sin embargo, se aprecian diferencias claras a bajas (0,2 μ g/ml) y altas (3,125 μ g/ml) concentraciones. F1 muestra una captación más rápida que F2 y la AmB dimérica a bajas concentraciones, lo cual puede estar relacionado con su mayor tamaño de partícula en disolución (20 veces mayor), haciendo la formulación F1 más atractiva para captación de macrófagos. La AmB dimérica muestra una disminución en captación a altas concentraciones, lo cual puede ser resultado de una saturación. Sin embargo, F1 y F2, que contienen manosa que puede enlazar con los receptores localizados en la superficie de los macrófagos, captan macrófagos incluso a mayores concentraciones (Figura 3b).

Ejemplo 8.

En este ejemplo se muestra el efecto hemolítico de los excipientes de las formulaciones AmB atomizadas.

Se centrifuga sangre de personas sanas voluntarias contenida en tubos Vacutainer recubierto de EDTA a 1000 rpm durante 5 minutos y se marcan los niveles de plasma y hematocrito en el tubo. En el tubo se descarta el sobrenadante y tubo se rellena hasta el nivel de plasma marcado con disolución de NaCl 150 mM y se mezcla. Se centrifuga de nuevo el tubo (5 minutos a 1000 rpm) y se descarta de nuevo el sobrenadante. Las células rojas de la sangre (RBC, del inglés *Red Blood Cells*) se lavan dos veces con disolución de NaCl 150 mM. Después se descarta el sobrenadante y las RBCs se diluyen con PBS (tampón fosfato salino) a pH 7,4 hasta una concentración final del 4% ($4,81 \times 10^5$ RBC/ml). Las RBCs diluidas se añaden en placas de 96 pocillos (180 μ l/pocillo).

Para comparar el efecto de la leucina y la manosa en diferentes estados de agregación de la AmB, se preparan disoluciones diméricas y monoméricas de formulaciones de AmB, según se ha descrito en el ejemplo 7, y se colocan 20 μ l de cada una de ellas en los pocillos. Para control positivo, se añaden también en un pocillo 20 μ l de disolución de Triton X-100. Para control negativo, se añaden 20 μ l de PBS a pH = 7,4. Las placas se incuban a 37°C durante 1 hora. Después, se centrifugan a 2500 rpm durante 5 minutos para sedimentar eritrocitos. Los sobrenadantes (50 μ l) se transfieren a una placa transparente de 96 pocillos de fondo plano. Se mide la absorbancia (ABS) de los sobrenadantes usando un lector de placas (BioTek, ELx808) a 595 nm. El porcentaje de hemolisis se calcula mediante la ecuación:

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

La Figura 4 muestra el resultado del estudio de la toxicidad hemolítica de los excipientes utilizados en la invención en las micropartículas colapsadas frente a la AmB en varios estados de agregación: dimérica (a una concentración de 62,5 μ g/ml) y monomérica (a una concentración de 25 μ g/ml). Se deduce que los excipientes (leucina y manosa) tienen un efecto protector en las RBCs solo cuando se usan en proporción 1:1 en peso, pero no de forma separada, tanto en el caso de AmB dimérica como monomérica.

Ejemplo 9.

Se muestra la deposición pulmonar de las formulaciones de AmB.

Para determinar la deposición pulmonar *in vitro* de las formulaciones F1 y F2, se calcula el tamaño de partícula aerodinámico (MMDA) y la fracción de partículas (FPF) por debajo de las 5 y 3 μm , de acuerdo a las especificaciones de la *European Pharmacopoeia 10.0 – Preparations per Inhalation* para dos condiciones diferentes: y 60 L/min durante 4 segundos y 30 L/min durante 8 segundos.

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

En la tabla se muestran los datos para cada una de las composiciones comparadas.

Condiciones	F1			F2			AmBisome®		
	FPF <5 μm (%)	FPF <3 μm (%)	MMAD (μm)	FPF <5 μm (%)	FPF <3 μm (%)	MMAD (μm)	FPF <5 μm (%)	FPF <3 μm (%)	MMAD (μm)
60 L/min, 4 s	81,45	67,16	1,66	79,32	53,27	2,42	4,26	0,43	4,46
30 L/min, 6 s	68,95	52,47	3,48	53,98	42,12	3,28	-	-	-
25 L/min, 15 s	63,84	46,06	3,85	55,11	47,13	4,14	95,80	74,38	2,50

Como se observa en la Figura 5, las formulaciones F1 y F2 atomizadas muestran una buena deposición pulmonar a 60 L/min con un FPF < 5 μm próximo al 80% y un MMAD por debajo de 3 μm . Si se compara la deposición a diferentes caudales de aire, F1 muestra un perfil más consistente, mientras que F2 es más sensible a los cambios del caudal de aire, exhibiendo una reducción importante del 25% en la FPF < 5 μm a 25 y 30 L/min. Además, F2 muestra mayor pérdida de masa en el inhalador y las partes más altas del tracto respiratorio. La formulación comercial AmBisome® muestra un perfil de deposición muy diferente entre 60 L/min a partir de su liberación de una cápsula en un inhalador en polvo seco y nebulizada después de ser reconstituida en agua desionizada y nebulizada a 25 L/min.

Las micropartículas colapsadas de F1 y F2 en estado sólido presentan una buena deposición pulmonar a distintos flujos de aire inspiratorio (entre 60 y 30 L/min). Además,

pueden reconstituirse en agua, dando lugar a un tamaño óptimo en suspensión pudiendo ser aerosolizadas manteniendo una buena deposición en el tracto respiratorio.

Ejemplo 10.

Este ejemplo se refiere al perfil farmacocinético de las formulaciones de AmB.

El perfil farmacocinético de las formulaciones de la presente invención, se determina utilizando ratas OFA 250/275 gr. A un primer grupo (G1) se le administró 5 mg /kg de AmBisome® por vía intravenosa; a los grupos G2 y G3 se les administró las formulaciones F1 y F2 en dosis de 5 mg/kg por vía intratraqueal. En la Figura 5 se observan mayores concentraciones de F1 que de F2 después de períodos prolongados, lo cual puede ser atribuido a su naturaleza semicristalina y mayor tamaño de partícula en disolución. Por el contrario, debido a su naturaleza amorfa, F2 es más soluble en agua siendo más permeable a través de las células epiteliales pulmonares y se eliminan más rápido del organismo. En ambas formulaciones, se mantienen concentraciones en plasma por encima de 1 µg/ml durante, al menos, 24 h; esto indica que una sola administración diaria sería suficiente para proporcionar efecto profiláctico o terapéutico frente a *Aspergillus spp.*

Sin embargo, los niveles de AmB en plasma caen muy rápidamente después de administración intravenosa de AmBisome® (por debajo de 1 µg/ml a las 4 horas), lo cual explica la baja eficiencia de esta formulación cuando se administra por vía parenteral en pacientes críticos (Figura 6).

Ejemplo 11.

En este ejemplo se muestra la combinación de las formulaciones de AmB de la presente invención con otros fármacos antifúngicos o broncodilatadores.

En función de los excipientes utilizados y las condiciones empleadas para su fabricación, las micropartículas pueden contener más de un fármaco antifúngico, como el itraconazol y otros monosacáridos como el manitol. Así, la Figura 7 muestra el buen perfil de deposición pulmonar de micropartículas de AmB cargadas hasta un 40% con itraconazol.

La Figura 8 muestra que la incorporación de salbutamol hace que las partículas de AmB resulten más esféricas con superficies rugosas manteniéndose una buena deposición de las partículas a nivel pulmonar.

REIVINDICACIONES

1. Formulación de anfotericina B basada en micropartículas colapsadas para ser administrada por vía inhalatoria en forma de polvo seco, o en forma de aerosoles previa reconstrucción en agua, que comprende aminoácidos, oligosacáridos y monosacáridos como excipientes, caracterizadas porque no contienen excipientes lipídicos y las micropartículas presentan un tamaño geométrico y aerodinámico apto para la vía pulmonar (1 – 5 μm) con una carga de fármaco antifúngico superior al 25% en peso del polvo seco del contenido total de la formulación y en donde el fármaco puede encontrarse en forma amorfa o semicristalina (hasta un 50%).
2. Formulación, según reivindicación 1, donde los oligosacáridos y monosacáridos son γ -ciclodextrina y manosa, y el aminoácido es leucina.
3. Formulación, según reivindicación 2, donde la relación AmB: manosa es 1:1 y la leucina representa un 10 – 13 % en peso del total de la formulación.
4. Formulación, según reivindicación 3, donde la proporción AmB: γ -ciclodextrina:manosa es 1:1:1.
5. Formulación, según reivindicación 3, que además contiene otros fármacos antifúngicos y/o broncodilatadores.
6. Formulación, según reivindicación 5, donde el antifúngico añadido es itraconazol.
7. Formulación, según reivindicación 6, donde el itraconazol se encuentra en una proporción hasta el 40% dentro de las micropartículas.
8. Formulación, según reivindicaciones 5, donde el broncodilatador es salbutamol.
9. Método para la preparación de la formulación reivindicada que comprende las siguientes etapas:
 - a) Preparar una disolución en medio acuoso de γ -ciclodextrina y ajustar el pH de dicha disolución entre 12 y 14.
 - b) Añadir a continuación anfotericina B (en una cantidad entre el 5 – 40% del total del peso de la formulación) a la disolución de la etapa (a) en una relación peso AmB: γ -ciclodextrina entre 1:1 y agitar constantemente hasta su completa

- dispersión.
- c) Ajustar el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 6 y 8, y sonicar si es necesario para conseguir una mezcla homogénea.
 - d) Añadir un monosacárido a la suspensión acuosa en una relación peso AmB: monosacárido de 1:1
 - e) Incorporar a continuación un aminoácido a la suspensión anterior en proporciones entre el 10 y el 13% en peso del total de la formulación.
 - f) Atomizar la suspensión acuosa mediante atomizador para la preparación de la formulación en polvo seco.
 - g) Recoger el polvo atomizado del vaso colector
10. Método, según reivindicación 9, donde el antifúngico es anfotericina B (AmB) el monosacárido es manosa, y el aminoácido es leucina.
 11. Método, según reivindicación 9, donde la etapa de atomización se lleva a cabo empleando un flujo de entrada de aire o nitrógeno entre 600 y 800 L/h, la suspensión acuosa es bombeada a una velocidad entre 2 y 6 ml/min, la temperatura de evaporación se mantiene por encima de 110°C, y la fuerza de aspiración por encima del 80%.
 12. Método, según reivindicación 11, donde el caudal de aire o nitrógeno se mantiene en 742 L/h, la suspensión se bombea a 2,5 ml/min, la temperatura de evaporación se mantiene a 150°C y la fuerza de aspiración por encima del 90%.
 13. Uso de la formulación reivindicada para la fabricación de un medicamento antifúngico de administración por inhalación.
 14. Uso, según reivindicación 13, donde la administración se realiza mediante inhalador de polvo seco (DPI).
 15. Uso, según reivindicación 14, donde la administración se realiza mediante aerosoles, previa reconstitución del polvo en agua.

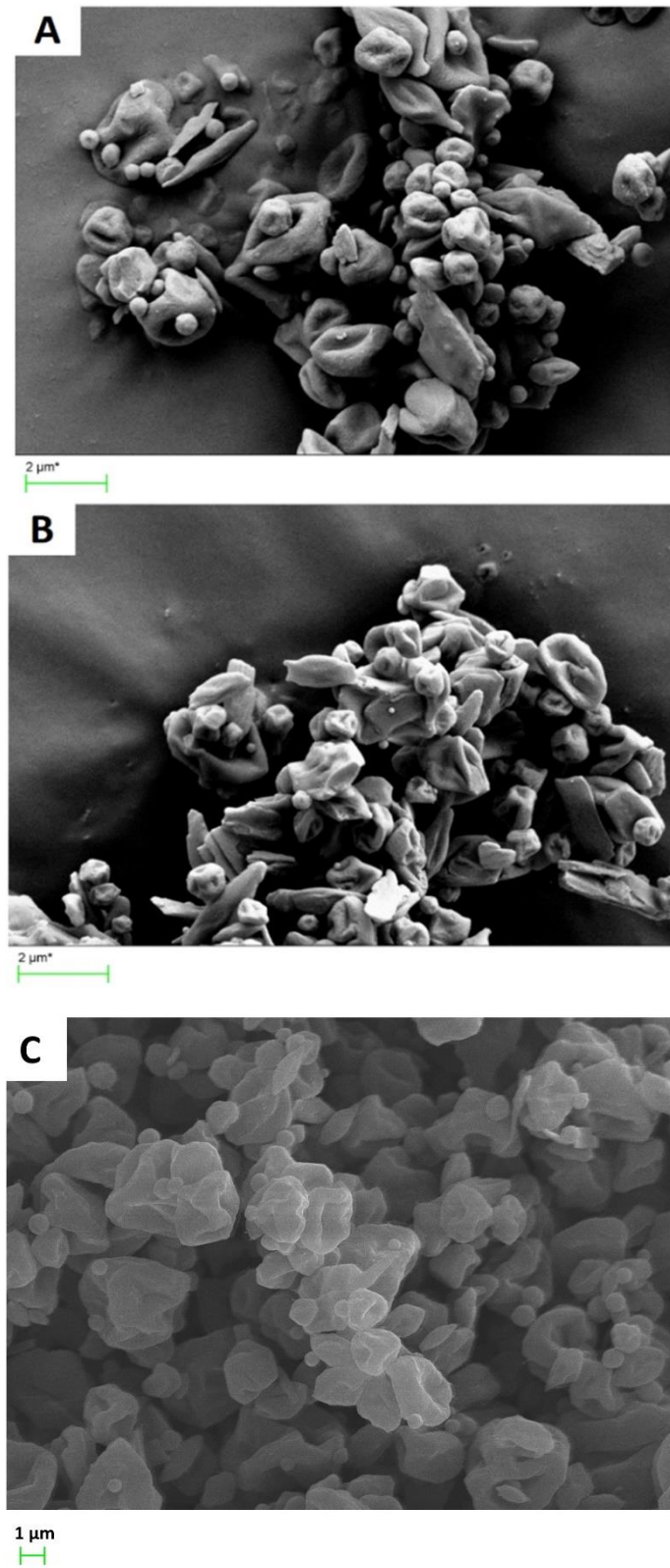


Figura 1

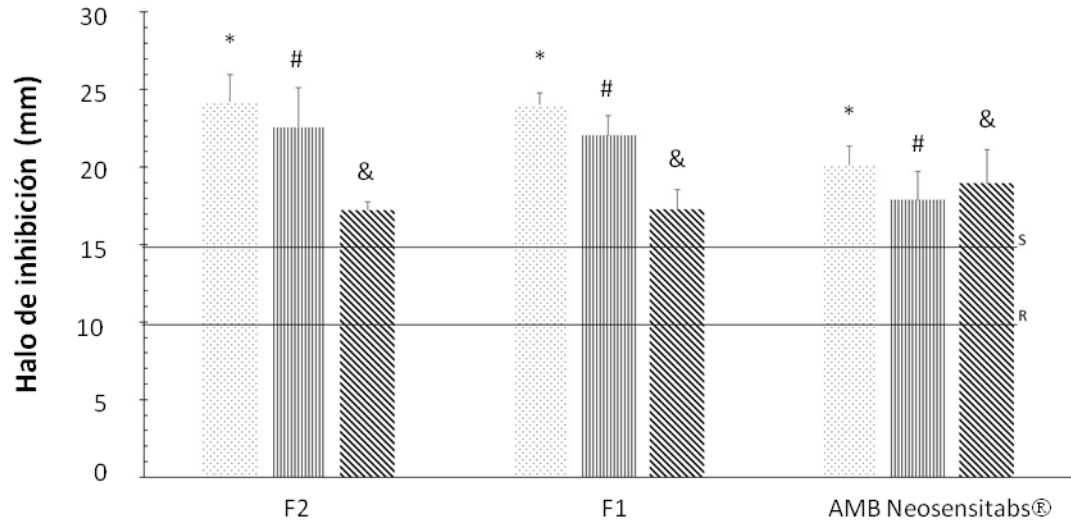


Figura 2



Figura 3

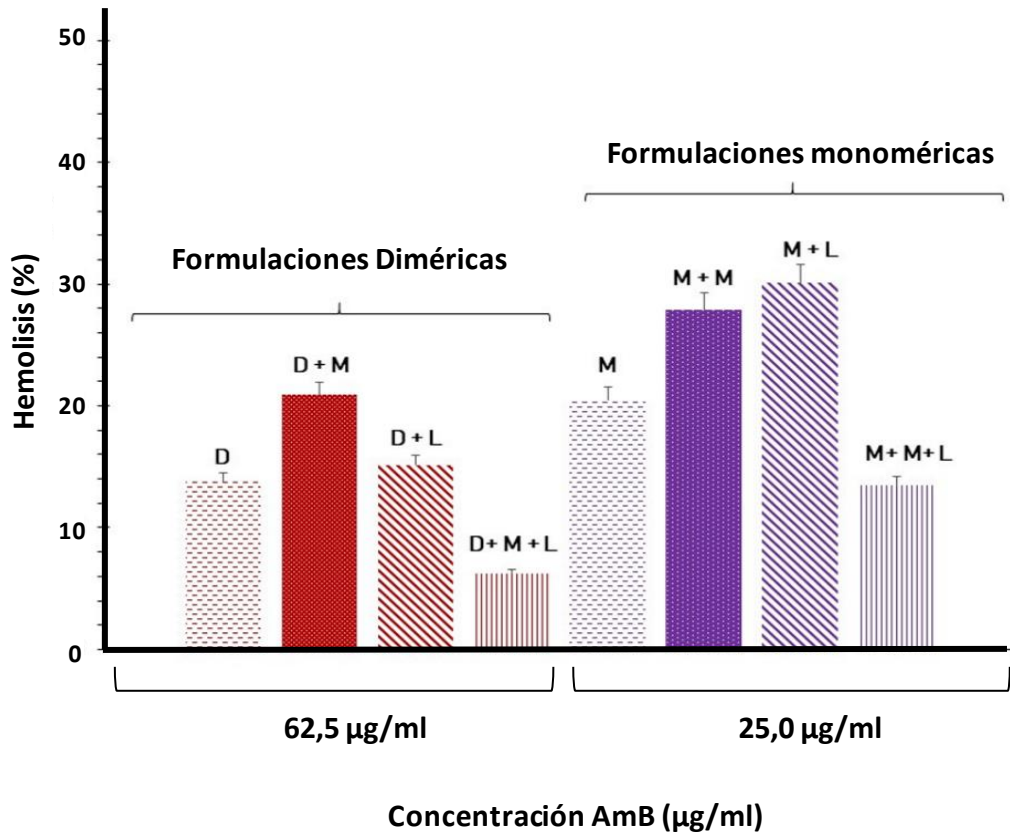


Figura 4

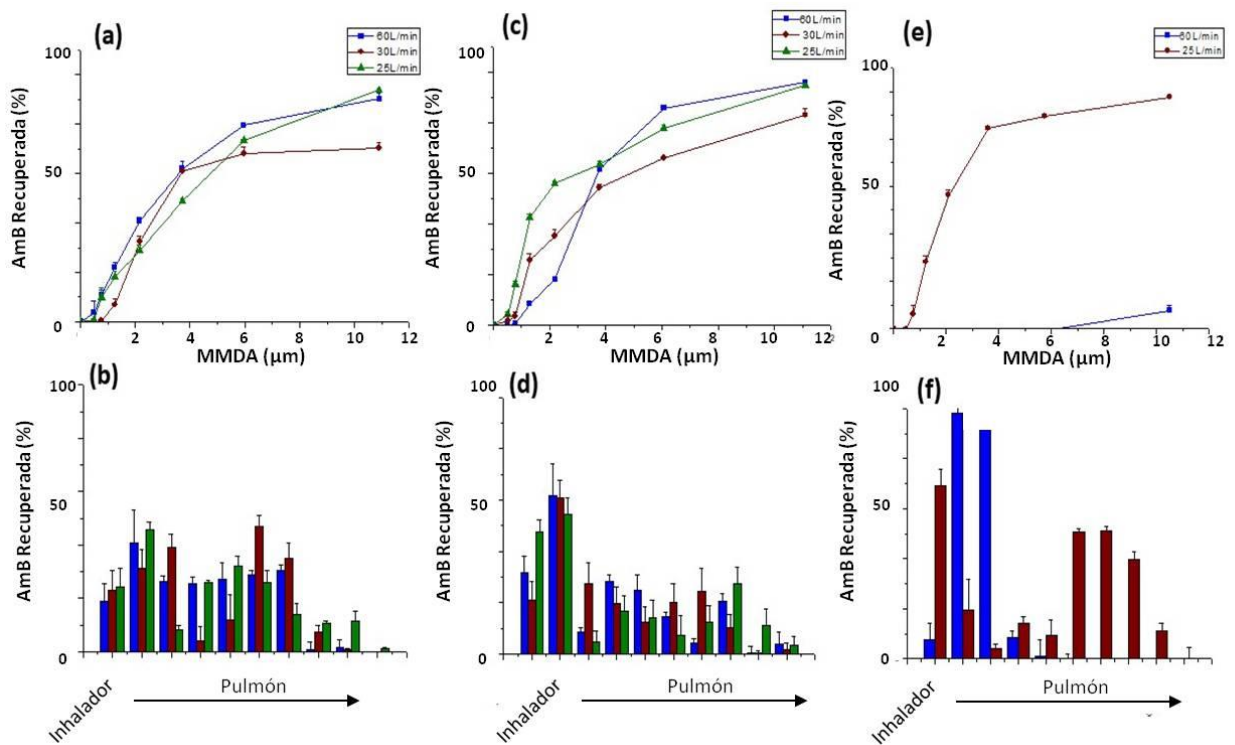


Figura 5

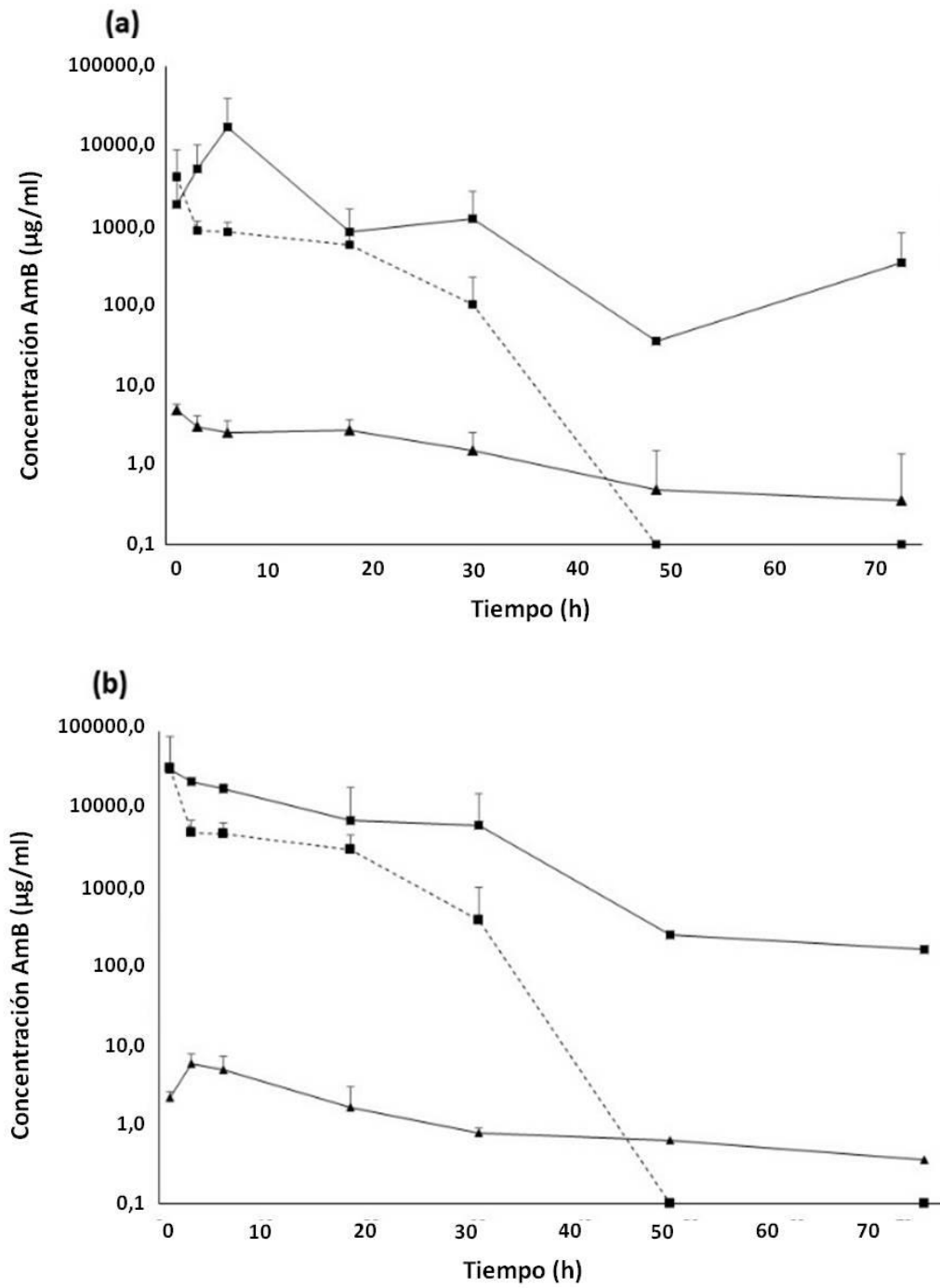


Figura 6

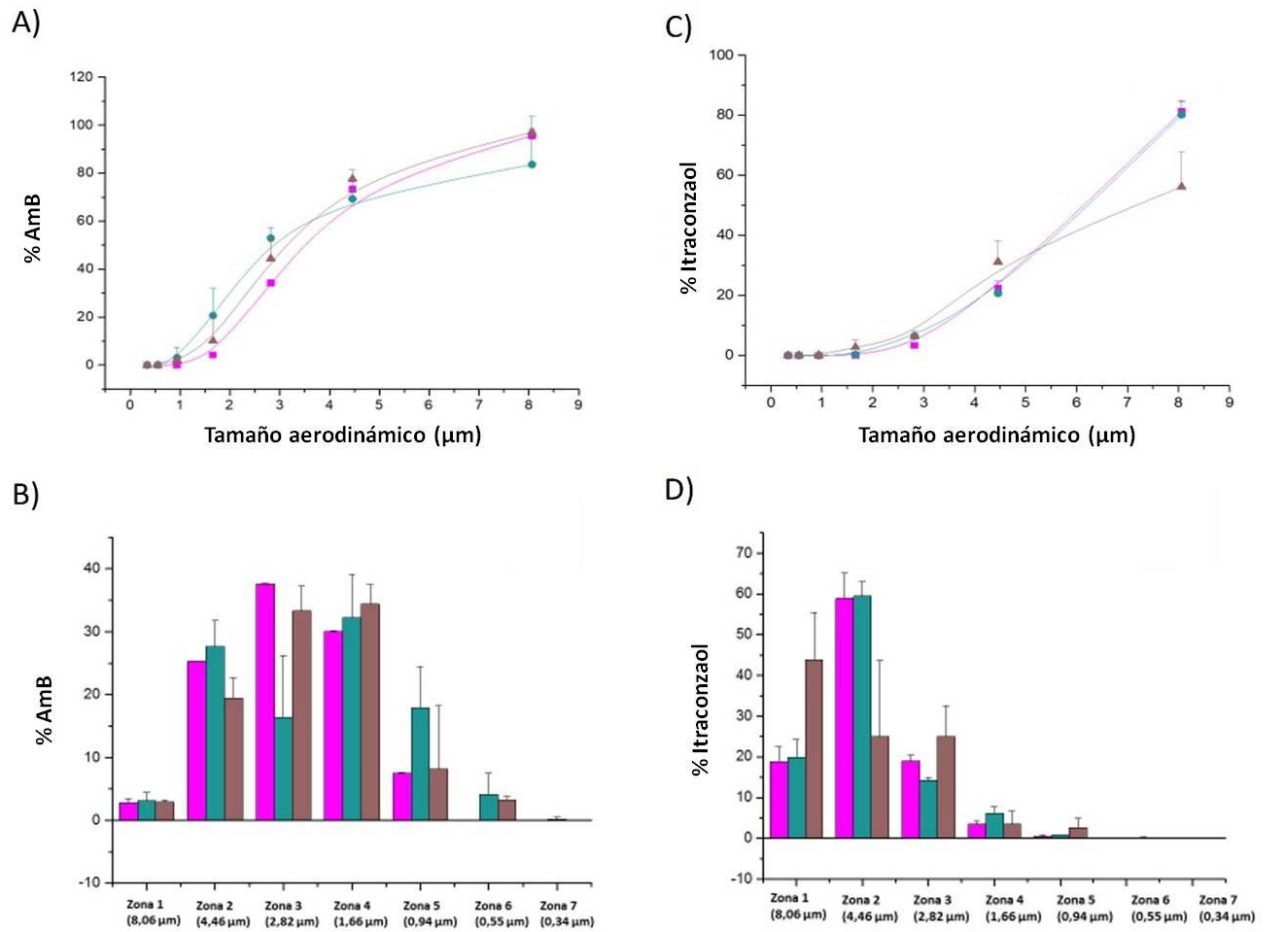


Figura 7

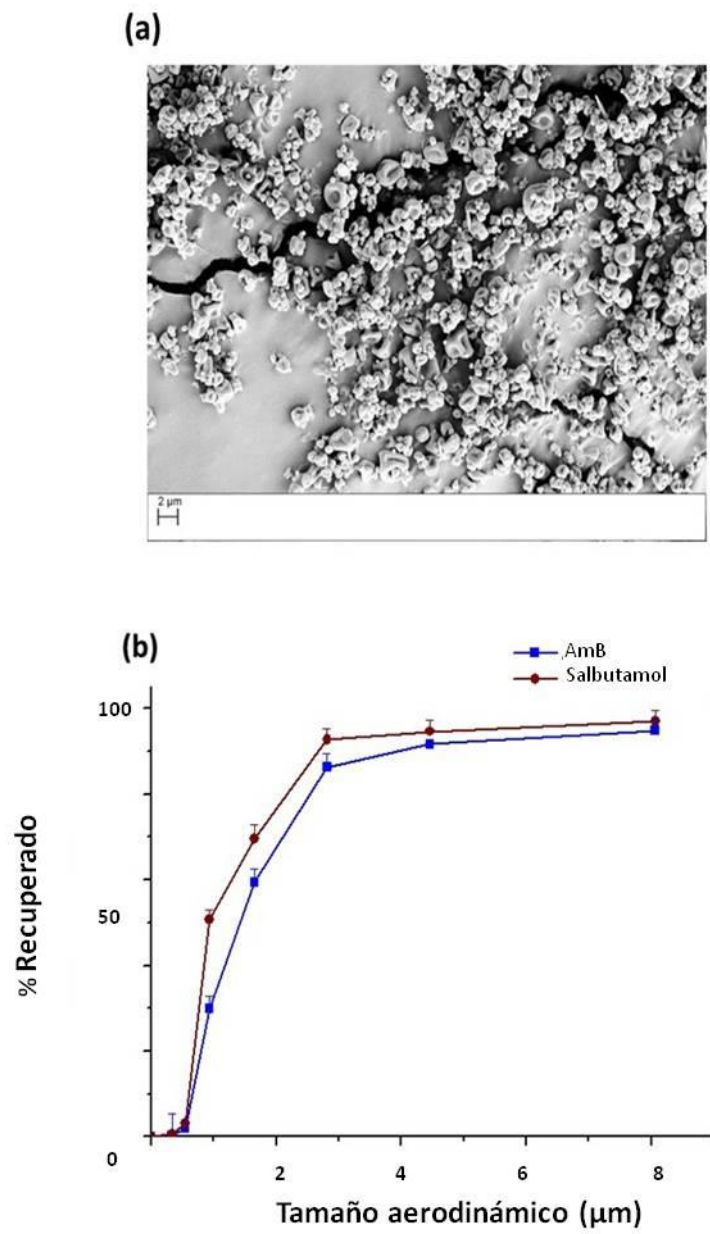


Figura 8

RESUMEN

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

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

La presente invención describe nuevas formulaciones farmacéuticas de antifúngicos en forma de micropartículas colapsadas que no contienen excipientes lipídicos sino mono y oligosacáridos, además de aminoácidos de forma que se pueden administrar empleando inhaladores en polvo seco o mediante aerosoles.



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, ENERGÍA
Y TURISMO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/>
(2) FORMULARIO 5101. TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electronica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACIÓN SOCIAL: UNIVERSIDAD PUBLICA NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL: PAIS RESIDENCIA: CODIGO PAIS: TELEFONO: FAX: CORREO ELECTRONICO: EMPREDEDOR: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:	Universidad Complutense de Madrid <input checked="" type="checkbox"/> España ES Q28180141 Avenida de Séneca, 2 Madrid 28 Madrid 28040 España ES 913946518 otripat@ucom.es [] M ^c Jesus Morillo <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(5-2) SOLICITANTE 2:	PORCENTAJE DE TITULARIDAD: DENOMINACIÓN SOCIAL: UNIVERSIDAD PUBLICA NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL:	065,00 % Universidad Cardinal Herrera CEU [] España ES G28423275 c/ Ramón y Cajal, s/n Alfara de Patriarca 46 Valencia 46115

	PAIS RESIDENCIA:	España
	CODIGO PAIS:	ES
	TELEFONO:	961369000
	FAX:	
	CORREO ELECTRONICO:	
	EMPRENDEDOR:	[]
	PERSONA DE CONTACTO:	
MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:	INVENCION LABORAL:	<input checked="" type="checkbox"/>
	CONTRATO:	<input type="checkbox"/>
	SUCESION:	<input type="checkbox"/>
	OTROS:	<input type="checkbox"/>
(5-3) SOLICITANTE 3:	PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	005,00 %
	DENOMINACIÓN SOCIAL:	TRINITY COLLEGE OF DUBLIN
	UNIVERSIDAD PÚBLICA	<input type="checkbox"/>
	NACIONALIDAD:	Irlanda
	CODIGO PAIS:	IE
	NIF/NIE/PASAPORTE:	2200007U
	CNAE:	
	PYME:	
	DOMICILIO:	Trinity College Dublin - School of Dublin
	LOCALIDAD:	Dublin
	CÓDIGO POSTAL:	Dublin 2
	PAIS RESIDENCIA:	Irlanda
	CODIGO PAIS:	IE
	TELEFONO:	
	FAX:	
	CORREO ELECTRONICO:	
	EMPRENDEDOR:	[]
	PERSONA DE CONTACTO:	
MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:	INVENCION LABORAL:	<input checked="" type="checkbox"/>
	CONTRATO:	<input type="checkbox"/>
	SUCESION:	<input type="checkbox"/>
	OTROS:	<input type="checkbox"/>
(5-4) SOLICITANTE 4:	PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	020,00 %
	DENOMINACIÓN SOCIAL:	FRENCH NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH AND MEDICAL RESEARCH (INSERM)
	UNIVERSIDAD PÚBLICA	<input type="checkbox"/>
	NACIONALIDAD:	Francia
	CODIGO PAIS:	FR
	NIF/NIE/PASAPORTE:	65775684897
	CNAE:	
	PYME:	
	DOMICILIO:	101, rue de Tolbiac, Cedex 13 Paris
	LOCALIDAD:	Paris
	CÓDIGO POSTAL:	75654
	PAIS RESIDENCIA:	Francia
	CODIGO PAIS:	FR
	TELEFONO:	
	FAX:	
	CORREO ELECTRONICO:	
	EMPRENDEDOR:	[]

	PERSONA DE CONTACTO:	
	MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:	
	INVENCION LABORAL:	<input checked="" type="checkbox"/>
	CONTRATO:	<input type="checkbox"/>
	SUCESION:	<input type="checkbox"/>
	OTROS:	<input type="checkbox"/>
(5-5) SOLICITANTE 5:	PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	004,00 %
	DENOMINACION SOCIAL:	POITIERS UNIVERSITY HOSPITAL
	UNIVERSIDAD PUBLICA:	<input type="checkbox"/>
	NACIONALIDAD:	Francia
	CODIGO PAIS:	FR
	NIF/NIE/PASAPORTE:	
	CNAE:	
	PYME:	
	DOMICILIO:	2 Rue de la Miletrie
	LOCALIDAD:	Poitiers
	CODIGO POSTAL:	86021
	PAIS RESIDENCIA:	Francia
	CODIGO PAIS:	FR
	TELEFONO:	
	FAX:	
	CORREO ELECTRONICO:	
	EMPRENDEDOR:	<input type="checkbox"/>
	PERSONA DE CONTACTO:	
	MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:	
	INVENCION LABORAL:	<input checked="" type="checkbox"/>
	CONTRATO:	<input type="checkbox"/>
	SUCESION:	<input type="checkbox"/>
	OTROS:	<input type="checkbox"/>
(5-6) SOLICITANTE 6:	PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	003,00 %
	DENOMINACION SOCIAL:	POITIERS UNIVERSITY
	UNIVERSIDAD PUBLICA:	<input type="checkbox"/>
	NACIONALIDAD:	Francia
	CODIGO PAIS:	FR
	NIF/NIE/PASAPORTE:	
	CNAE:	
	PYME:	
	DOMICILIO:	15 Rue de l'Hôtel Dieu, TSA
	LOCALIDAD:	71117 Poitiers
	CODIGO POSTAL:	86000
	PAIS RESIDENCIA:	Francia
	CODIGO PAIS:	FR
	TELEFONO:	
	FAX:	
	CORREO ELECTRONICO:	
	EMPRENDEDOR:	<input type="checkbox"/>
	PERSONA DE CONTACTO:	
	MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:	
	INVENCION LABORAL:	<input checked="" type="checkbox"/>
	CONTRATO:	<input type="checkbox"/>
	SUCESION:	<input type="checkbox"/>
	OTROS:	<input type="checkbox"/>
	PORCENTAJE DE TITULARIDAD:	003,00 %

(6-1) INVENTOR 1:	<p>APELLIDOS: Serrano López NOMBRE: Dolores Remedios NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAIS: ES</p> <p>DOMICILIO: Plaza Ramón y Cajal, s/n LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28040 PAIS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAIS: ES TELEFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: dserran@ucm.es EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: []</p>	
(6-2) INVENTOR 2:	<p>APELLIDOS: de Pablo Tomero NOMBRE: Esther NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAIS: ES</p> <p>DOMICILIO: Plaza Ramón y Cajal, s/n LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28040 PAIS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAIS: ES TELEFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: epablo@ucm.es EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: []</p>	
(6-3) INVENTOR 3:	<p>APELLIDOS: Torrado Duran NOMBRE: Juan José NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAIS: ES</p> <p>DOMICILIO: Plaza Ramón y Cajal, s/n LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28040 PAIS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAIS: ES TELEFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: torrado1@ucm.es EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: []</p>	
(6-4) INVENTOR 4:	<p>APELLIDOS: Ballesteros Papantonakis NOMBRE: M^a Paloma NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAIS: ES</p> <p>DOMICILIO: Plaza Ramón y Cajal, s/n LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28040 PAIS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAIS: ES TELEFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: pballep@farm EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: []</p>	
(6-5) INVENTOR 5:	<p>APELLIDOS: Bolás Fernández NOMBRE: Francisco NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAIS: ES</p>	

	DOMICILIO: Plaza Ramón y Cajal, s/n LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28040 PAÍS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAÍS: ES TELEFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: francisb@ucm.es EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: []
(6-6) INVENTOR 6:	APELLIDOS: Healy NOMBRE: Anne Marie NACIONALIDAD: Irlanda CÓDIGO PAÍS: IE DOMICILIO: School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences LOCALIDAD: Dublin 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: Dublin 2 PAÍS RESIDENCIA: Irlanda CÓDIGO PAÍS: IE TELEFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: healyam@tcd.ie EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: []
(6-7) INVENTOR 7:	APELLIDOS: Marchand NOMBRE: Sandrine NACIONALIDAD: Francia CÓDIGO PAÍS: FR DOMICILIO: Pole Biologie Sante, 1, rue Georges Bonnet LOCALIDAD: Poitiers 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 86022 PAÍS RESIDENCIA: Francia CÓDIGO PAÍS: FR TELEFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: sandrine.marchand@univ-poitiers.fr EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: []
(6-8) INVENTOR 8:	APELLIDOS: Dea Ayuela NOMBRE: M ^a Auxiliadora NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DOMICILIO: Plaza Ramón y Cajal, s/n LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28040 PAÍS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAÍS: ES TELEFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: mdea@uchceu.es EL INVENTOR RENUNCIA A SER MENCIONADO: []
(7) TÍTULO DE LA INVENCION:	Formulaciones de antifúngicos para inhalación basadas en micropartículas colapsadas conteniendo carbohidratos y aminoácidos
(8) NUMERO DE INFORME TECNOLÓGICO DE PATENTES (ITP):	

(9) SOLICITA LA INCLUSION EN EL PROCEDIMIENTO ACCELERADO DE CONCESION	SI NO	<input checked="" type="checkbox"/>
(10) EFECTUADO DEPOSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(11) DEPOSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCION DE DEPOSITO: NUMERO DE DEPOSITO: ORIGEN BIOLÓGICO:	
(12) RECURSO GENÉTICO:	NUMERO DE REGISTRO: NUMERO DE CERTIFICADO DE ACCESO AL RECURSO: UTILIZACION DEL RECURSO GENÉTICO: CONOCIMIENTO TRADICIONAL ASOCIADO A UN RECURSO GENÉTICO:	
(13) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(14) EXPOSICIONES OFICIALES:	NOMBRE: LUGAR: FECHA:	
(15) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAIS DE ORIGEN: CODIGO PAIS: NUMERO: FECHA:	
(16) REMISION A UNA SOLICITUD ANTERIOR:	PAIS DE ORIGEN: CODIGO PAIS: NUMERO: FECHA:	
(17) REPRESENTANTE:	APELLIDOS: NUMERO DE PODER:	
(18) DIRECCION A EFECTOS DE COMUNICACIONES: DIRECCION ASOCIADA AL PRIMER SOLICITANTE	DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL: PAIS RESIDENCIA: CODIGO PAIS: TELEFONO: FAX: CORREO ELECTRONICO: MEDIO PREFERENTE DE COMUNICACION	Seccion de Contratos y Patentes (OTRI), Fac. de Medicina (Edificio Entrepabellones 7 y 8), c/ Dr. Sotero Ochoa, 7 Madrid 28 Madrid 28040 España ES 913946518 otripat@ucm.es Correo electrónico
(19) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCION: REIVINDICACIONES: DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION:	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de paginas: 15 <input checked="" type="checkbox"/> N.º reivindicaciones: 15 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 8 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de paginas: 1 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de figura(s): <input checked="" type="checkbox"/>

DOCUMENTO DE REPRESENTACION:	<input type="checkbox"/> N.º de páginas:
JUSTIFICANTE DE PAGO (1):	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1
JUSTIFICANTE DE PAGO (2):	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1
JUSTIFICANTE DE PAGO (3):	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1
LISTA DE SECUENCIAS PDF:	<input type="checkbox"/> N.º de páginas:
ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS:	<input type="checkbox"/>
OTROS (Aparecerán detallados):	<input type="checkbox"/>
(20) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA REDUCCION DE TASAS PARA EMPRENDEDORES PREVISTA EN EL ART. 186 DE LA LEY 24/2015 DE PATENTES Y, A TAL EFECTO, APORTA LA SIGUIENTE DOCUMENTACION ADJUNTA:	<input type="checkbox"/>
(21) NOTAS:	
(22) FIRMA:	
FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:	14925120Y MARGARITA SAN ANDRES (R: Q2818014I)
LUGAR DE FIRMA:	
FECHA DE FIRMA:	15 Diciembre 2020