



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 410**

51 Int. Cl.:
A61K 38/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06740736 .1**

96 Fecha de presentación : **06.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1909824**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

54 Título: **Formulaciones farmacéuticas que comprenden péptido de incretina y un disolvente polar aprótico.**

30 Prioridad: **08.04.2005 US 669353 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.10.2011

73 Titular/es: **AMYLIN PHARMACEUTICALS, Inc.**
Intellectual Property Department 9360
Towne Centre Drive
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es: **Jennings, Robert N. Jr.;**
Ong, John T.H.;
Rhodes, Christopher A.;
Stetsko, Gregg y
Prestrelski, Steven J.

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 365 410 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones farmacéuticas que comprenden péptido de incretina y un disolvente polar aprótico.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas, y más particularmente a formulaciones farmacéuticas de péptidos y proteínas con estabilidad mejorada, que comprenden particularmente una incretina o un péptido mimético de incretina, como mínimo un disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante seleccionado de entre el grupo constituido por agua, un azúcar y un alcohol de azúcar.

Antecedentes

El tratamiento de enfermedades mediante la administración prolongada de un agente activo a una velocidad controlada ha sido un objetivo en el campo de la administración de fármacos. Se han adoptado diversos enfoques para la administración de los agentes activos.

Dichos enfoques han incluido la utilización de sistemas implantables de difusión y bombas de perfusión implantables para la administración de fármacos, por ejemplo, por vía intravenosa, infraarterial, subcutánea, intratecal, intraperitoneal, intrarraquídea y epidural. Generalmente, las bombas se insertan quirúrgicamente en una cavidad subcutánea de tejido en la parte inferior del abdomen. En BBI Newsletter, Vol. 17, No. 12, páginas 209-211, diciembre de 1994, se describen sistemas para tratamiento del dolor, quimioterapia y administración de insulina.

Un enfoque incluye dispositivos controlados osmóticamente, tal como los descritos en las patentes US nº 3.987.790, nº 4.865.845, nº 5.057.318, nº 5.059.423, nº 5.112.614, nº 5.137.727, nº 5.234.692 y nº 5.234.693. Estos dispositivos se pueden implantar en un animal para liberar el agente activo de un modo controlado durante un período de administración predeterminado. En general, estos dispositivos funcionan absorbiendo fluido del exterior y liberando cantidades correspondientes del agente activo.

Se dan a conocer otros ejemplos de dispositivos implantables en las patentes US nº 5.034.229, nº 5.057.318, nº 5.110.596 y nº 5.782.396. Otros ejemplos de dispositivos implantables incluyen bombas implantables de tipo regulador, que proporcionan un flujo constante, un flujo ajustable o un flujo programable de formulaciones de agente beneficioso, que están disponibles, por ejemplo, a través de Codman, de Raynham (Massachusetts), Medtronic, de Minneapolis (Minnesota), y Tricumed Medinzintechnik GmbH, de Alemania. Otros ejemplos de dispositivos implantables se describen en las patentes US nº 6.395.292, nº 6.283.949, nº 5.976.109, nº 5.836.935, y nº 5.511.355.

La administración controlada de un agente beneficioso mediante un dispositivo implantable durante periodos prolongados tiene diversas ventajas potenciales. Por ejemplo, generalmente, el uso de dispositivos implantables de administración garantiza el cumplimiento terapéutico por parte del paciente, ya que los dispositivos implantables no son fácilmente manipulables por el mismo y se pueden diseñar para proporcionar dosis terapéuticas de agente beneficioso durante períodos que abarcan semanas, meses o incluso años sin la intervención del paciente. Además, debido a que los dispositivos implantables sólo se pueden colocar una vez durante su vida útil, los mismos pueden comportar una menor irritación del lugar de implante, menos riesgos laborales para los pacientes y los profesionales, una reducción de los riesgos de eliminación de los residuos, una disminución de los costos y una mayor eficacia en comparación con otras técnicas de administración parenteral, tal como las inyecciones, que requieren múltiples administraciones a lo largo de intervalos de tiempo relativamente breves. Sin embargo, la administración controlada de agentes beneficiosos mediante dispositivos implantables presenta diversas dificultades técnicas, y la administración controlada de péptidos, polipéptidos, proteínas y otras sustancias proteínicas durante períodos de tiempo controlados mediante dispositivos implantables ha resultado ser particularmente compleja.

Para la administración de un agente beneficioso mediante un dispositivo implantado a una velocidad controlada a lo largo de un período prolongado (es decir, de semanas, meses o años), el agente beneficioso se debe formular de tal modo que sea estable a temperatura ambiente y a temperatura fisiológica. Las proteínas son activas por naturaleza en ambientes acuosos, y las formulaciones proteínicas han sido, por lo general, soluciones acuosas. Sin embargo, las proteínas suelen ser poco estables en formulaciones acuosas durante períodos prolongados, y a menudo las preparaciones farmacéuticas acuosas de proteínas han requerido refrigeración o han mostrado una vida útil corta a temperatura ambiente o fisiológica.

Las proteínas se pueden degradar a través de una serie de mecanismos, que incluyen desamidación, oxidación, hidrólisis, intercambio de disulfuro y racemización. Además, el agua actúa como plastificante, lo que facilita el desarrollo de las moléculas proteínicas y la agregación molecular irreversible. Por lo tanto, con el fin de proporcionar una formulación proteínica que sea estable a lo largo del tiempo a temperatura ambiente o fisiológica, existe la necesidad de una formulación proteínica no acuosa o esencialmente no acuosa.

La reducción de formulaciones acuosas de proteínas a formulaciones secas en polvo es una forma de aumentar la

estabilidad de las formulaciones farmacéuticas de proteínas. Por ejemplo, las formulaciones de proteínas se pueden secar utilizando diversas técnicas, que incluyen secado por pulverización, liofilización o secado por congelación, y desecación. Las formulaciones secas en polvo de proteínas obtenidas mediante estas técnicas presentan una estabilidad en el tiempo significativamente mayor a temperatura ambiente o incluso fisiológica. Sin embargo, cuando se requiere una formulación de proteínas fluida, como por ejemplo en un dispositivo implantable de administración, las formulaciones secas en polvo de proteínas tienen un uso limitado.

Con el fin de proporcionar formulaciones de proteínas estables y fluidas, se ha sugerido la utilización de formulaciones en solución de péptidos en disolventes no acuosos, apróticos, polares. Dichas formulaciones se han demostrado estables a temperaturas elevadas durante largos períodos. Sin embargo, las formulaciones a base de disolventes no son adecuadas para todas las proteínas, ya que muchas proteínas tienen una solubilidad baja en disolventes adecuados para la administración parenteral. A medida que la solubilidad de la proteína en el disolvente disminuye, la cantidad de formulación necesaria para administrar una dosis determinada de proteína aumenta, y aunque pueden resultar útiles volúmenes relativamente grandes de soluciones de baja concentración de proteínas para la administración por inyección, debido a limitaciones de espacio, generalmente los dispositivos implantables de administración requieren formulaciones de proteínas con concentraciones relativamente elevadas capaces de administrar cantidades terapéuticas de proteína a un caudal bajo a lo largo de períodos prolongados.

Por lo tanto, resulta deseable desarrollar formulaciones que proporcionen las características de estabilidad y administración necesarias para administrar agentes beneficiosos, tales como péptidos y proteínas, a partir de un dispositivo implantable de administración a una velocidad controlada durante un período prolongado.

Sumario de la invención

Para afrontar estas y otras necesidades, la presente memoria da a conocer formulaciones farmacéuticas estables y utilidades de las mismas. Generalmente, las formulaciones contienen una incretina o péptido mimético de incretina, tal como un péptido de exendina, como mínimo un disolvente polar aprótico y, opcionalmente, uno o más excipientes estabilizantes seleccionados de entre el grupo constituido por agua, un azúcar y un alcohol de azúcar. El péptido se estabiliza en la formulación a fin de permitir el almacenamiento a largo plazo y/o la administración a lo largo de un período prolongado.

Así, un aspecto se refiere al uso de disolventes polares apróticos, tal como DMSO, para estabilizar las formulaciones peptídicas frente a la degradación química y física. Se ha puesto de manifiesto que el disolvente polar aprótico mejora la estabilidad general de la incretina y de los péptidos miméticos de la incretina en una amplia gama de condiciones de formulación, incluyendo altas concentraciones y temperaturas elevadas o no refrigeradas, lo que hace posible el almacenamiento prolongado de dichos péptidos a temperatura elevada o ambiente, así como la administración de dichos péptidos en dispositivos a largo plazo que de otra manera no serían factibles, tales como dispositivos de inyección de tipo pluma o dispositivos de administración de tipo bomba.

Además, se dan a conocer métodos para mejorar la estabilidad a largo plazo y lograr la administración prolongada de péptidos o proteínas terapéuticamente activos utilizando un depósito adecuado desde el que se puede bombear o dosificar el péptido formulado a una velocidad controlada. El depósito se puede implantar bajo la piel (por ejemplo, como dispositivo de bomba implantable) o puede ser externo al cuerpo y estar fijado o no (por ejemplo, como dispositivo de inyección de tipo pluma o dispositivo externo de bomba). El péptido se puede formular de tal modo que proporcione estabilidad a temperaturas fisiológicas para la duración de la exposición terapéutica, y puede proporcionar una administración de material terapéuticamente activo durante un período de hasta 2 años.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes para el experto en la materia.

Sumario

Se da a conocer una formulación farmacéutica estable tal como se describe en las reivindicaciones, que comprende una incretina o un péptido mimético de incretina y al menos un disolvente polar aprótico. Son ejemplos de incretinas o péptidos miméticos de incretina los péptidos de péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1), los péptidos de exendina y análogos de los mismos. En algunas formas de realización, el péptido de exendina es exendina-4 o un análogo de la misma. Ejemplos no limitativos de disolventes polares apróticos son el dimetilsulfóxido (DMSO), la dimetilformamida (DMF), el acetato de etilo, la n-metil pirrolidona (NMP), la dimetilacetamida (DMA), el carbonato de propileno y las mezclas de los mismos. En algunas formas de realización, el disolvente polar aprótico es DMSO.

La formulación farmacéutica comprende además al menos un excipiente estabilizante, un aditivo o un disolvente seleccionado de entre el grupo constituido por agua, un azúcar y un alcohol de azúcar. En algunas formas de realización, el excipiente estabilizante, aditivo o disolvente es capaz de disminuir el punto de congelación del disolvente polar aprótico a aproximadamente 0°C o menos. Son excipientes estabilizantes, aditivos o disolventes capaces de bajar el punto de congelación del disolvente polar aprótico el agua, los azúcares y los alcoholes de azúcar. En algunas formas de realización, el disolvente polar aprótico es DMSO, el excipiente estabilizante, aditivo o disolvente capaz de disminuir el punto de congelación del disolvente polar aprótico es agua, y el agua y el DMSO

forman un codisolvente que comprende aproximadamente un 10% p/p de agua (fracción molar de DMSO de 0,67). En algunas formas de realización, el excipiente estabilizante es capaz de estabilizar la conformación de la incretina o péptido mimético de incretina.

5 En algunas formas de realización, el péptido de incretina comprende uno o más residuos de aminoácidos seleccionados de entre el grupo constituido por asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, metionina, triptófano, cisteína, tirosina, histidina, lisina y arginina, y el disolvente polar aprótico, el excipiente estabilizante, o
10 ambos, estabilizan el residuo de aminoácido frente a la degradación. En algunas formas de realización, el residuo aminoácido es asparagina o glutamina, y el disolvente polar aprótico, el excipiente estabilizante, o ambos, estabilizan el residuo aminoácido frente a la degradación, reduciendo o impidiendo la formación de imida cíclica u otros productos de degradación de los residuos aminoácidos de asparagina y glutamina.

En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable comprende además al menos un disolvente prótico no acuoso. Son ejemplos de disolventes próticos no acuosos el polietilenglicol (PEG), el propilenglicol (PG),
15 la polivinilpirrolidona (PVP), el metoxipropilenglicol (MPEG), el glicerol, el glicofurool y las mezclas de los mismos.

En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable comprende además un tampón. En algunas formas de realización, dicho tampón es un tampón de acetato.

20 En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable comprende además un antioxidante. Algunos ejemplos de antioxidantes son ácido ascórbico, cisteína, metionina, monotioglicerol, tiosulfato sódico, sulfitos, BHT, BHA, palmitato de ascorbilo, galato de propilo y vitamina E.

En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable comprende además un quelante. Algunos ejemplos de quelantes son EDTA, ácido tartárico y sus sales, glicerina y ácido cítrico y sus sales.
25

En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable comprende además un azúcar, un alcohol de azúcar o un disolvente no acuoso. Algunos ejemplos de disolventes no acuosos son etanol, glicerina, propilenglicol y polietilenglicol.
30

En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable comprende además un conservante. Algunos ejemplos de conservantes son alcoholes bencílicos, parabenos metílicos y parabenos propílicos.

En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable comprende además un polímero termosensible que no se gelifica a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 37°C.
35

En algunas formas de realización, la incretina o mimético de incretina se compleja con el zinc para formar un complejo de zinc. En algunas formas de realización, el complejo de zinc comprende un GLP-1 o un análogo del mismo. En algunas formas de realización, el complejo de zinc comprende una exendina o un análogo de la misma. En algunas formas de realización, el complejo de zinc comprende un complejo de zinc de exendina-4. En algunas formas de realización, el complejo de zinc se dispersa en el disolvente.
40

En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable tiene una viscosidad comprendida entre aproximadamente 0,25 cP y aproximadamente 1.000.000 cP.
45

En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable tiene un pH igual o inferior al pI de la incretina o mimético de incretina. En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable tiene un pH comprendido entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 7,5. En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable tiene un pH comprendido entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,0. En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable tiene un pH de aproximadamente 4,5.
50

En algunas formas de realización, la incretina o mimético de incretina está presente en una concentración comprendida entre aproximadamente 0,1 mg/ml y el límite de solubilidad del péptido de incretina en la formulación. En algunas formas de realización, la incretina o mimético de incretina está presente en una concentración comprendida entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml.
55

En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica estable, además, se liofiliza. En algunas formas de realización, la formulación liofilizada se reconstituye antes de su uso.
60

En algunas formas de realización, el péptido se liofiliza a partir de una solución con un pH comprendido entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 7,5. En algunas formas de realización, el péptido se liofiliza a partir de una solución con un pH comprendido entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,0. En algunas formas de realización, el péptido se liofiliza a partir de una solución con un pH de aproximadamente 4,5.
65

También se da a conocer una formulación farmacéutica tal como se describe en la presente memoria para su

utilización en el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno que se puede tratar, aliviar o prevenir con la administración de una incretina o un mimético de incretina.

5 En algunas formas de realización, la enfermedad, afección o trastorno comprende intolerancia a la glucosa o diabetes mellitus. En algunas formas de realización, la enfermedad, afección o trastorno es diabetes mellitus. En algunas formas de realización, la enfermedad, afección o trastorno es diabetes de tipo 2.

10 En algunas formas de realización, la administración es parenteral. En algunas formas de realización, la administración es una administración continua. En algunas formas de realización, la administración se lleva a cabo mediante la utilización de un dispositivo de administración de fármacos por bombeo implantable o fijable. En algunas formas de realización, la administración es continua durante un período comprendido entre aproximadamente 1 mes y aproximadamente 6 meses. En algunas formas de realización, la administración se lleva a cabo mediante la utilización de un dispositivo de inyección de pluma.

15 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 ilustra la pureza de la exendina-4 en formulaciones representativas de DMSO, según lo determinado por una metodología SCX-HPLC.

20 La figura 2 ilustra la pureza de la exendina-4 en formulaciones representativas de DMSO, según lo determinado por una metodología RP-HPLC.

La figura 3 ilustra el porcentaje de pureza inicial de formulaciones representativas de DMSO en comparación con formulaciones tampón acuosas mantenidas a 25°C, según lo determinado por una metodología SCX-HPLC.

25 La figura 4 ilustra el porcentaje de pureza inicial de formulaciones representativas de DMSO en comparación con formulaciones tampón acuosas mantenidas a 40°C, según lo determinado por una metodología SCX-HPLC.

30 **Descripción detallada de la invención**

Las formulaciones farmacéuticas estándar de péptidos y proteínas son soluciones acuosas diluidas. Normalmente, la estabilidad del péptido se alcanza mediante la variación de uno o más de los siguientes parámetros: pH, tipo de tampón, fuerza iónica y excipientes (EDTA, ácido ascórbico, etc.). Para estas formulaciones, las vías de degradación que requieren agua (hidrólisis, desamidación, racemización) no pueden estabilizarse por completo, y, generalmente, dichas formulaciones se deben almacenar a temperaturas bajo cero o de refrigeración a efectos de protegerlas frente a la degradación a través de vías de degradación como hidrólisis catalizada por ácidos/bases, desamidación, racemización y oxidación. Por el contrario, en un aspecto, se pone de manifiesto que la incretina y los péptidos miméticos de incretina formulados en disolventes no acuosos, tal como el dimetilsulfóxido (DMSO), son química y físicamente más estables que los formulados en agua. Las formulaciones reivindicadas en la presente memoria estabilizan compuestos peptídicos a temperaturas elevadas (por ejemplo, comprendidas entre una temperatura de refrigeración y una temperatura de aproximadamente 50°C, entre temperatura ambiente y una temperatura de aproximadamente 40°C, entre temperatura ambiente y aproximadamente la temperatura fisiológica, etc.) y en altas concentraciones (por ejemplo, del 2,5% p/v, el 5% p/v, el 10% p/v, etc.).

45 De acuerdo con la presente descripción, el DMSO es un ejemplo de disolvente polar aprótico. Sin pretender quedar constreñidos por la teoría, se espera que los disolventes apróticos disminuyan la velocidad de degradación, ya que carecen de la capacidad de proporcionar protones a las reacciones de degradación. Por el contrario, se espera que los disolventes más polares que el agua (por ejemplo, el momento dipolar del agua es 1,85, para la DMF es de 3,82, y para el DMSO es de 3,96) hagan aumentar la velocidad de degradación, ya que pueden ayudar a estabilizar la etapa determinante de la velocidad. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que el efecto global de determinados disolventes polares apróticos, en general, es estabilizar las soluciones de péptidos tales como incretina y péptidos miméticos de incretina, y más específicamente péptidos con residuos aminoácidos de asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, metionina, cisteína, triptófano, tirosina, histidina, lisina y/o arginina.

55 Así, se da a conocer una solución al problema de cómo lograr una estabilidad a largo plazo y una administración prolongada de incretina y péptidos miméticos de incretina terapéuticamente activos, utilizando un depósito adecuado desde el que el péptido formulado se puede bombear o dosificar a una velocidad controlada o deseada. Dicho depósito se puede implantar bajo la piel (por ejemplo, como un dispositivo de bombeo implantable) o puede ser externo al cuerpo, fijado o no (por ejemplo, un dispositivo de inyección de tipo pluma o un dispositivo de bombeo externo). El péptido se formula de tal modo que proporcione estabilidad a temperaturas no refrigeradas, tal como temperatura ambiente o temperaturas fisiológicas, durante el periodo de exposición terapéutica, y puede proporcionar una administración de material terapéuticamente activo durante un periodo de hasta 2 años.

65 Se da a conocer la utilización de disolventes polares apróticos, tal como DMSO, para estabilizar formulaciones de péptidos frente a la degradación química y física. Se ha puesto de manifiesto que el disolvente polar aprótico puede mejorar la estabilidad general de la incretina y los péptidos miméticos de incretina en una amplia gama de

condiciones de formulación, incluyendo altas concentraciones y temperaturas elevadas, lo que hace posible el almacenamiento a largo plazo de los péptidos a temperaturas no refrigeradas, así como la administración de péptidos en dispositivos implantables a largo término que, de otro modo, no serían factibles.

5 Se da a conocer la utilización de disolventes polares apróticos para estabilizar las formulaciones de incretina y péptidos miméticos de incretina, de tal manera que el péptido se libera a lo largo del tiempo como una forma químicamente no modificada, una forma modificada pero terapéuticamente activa, y/o una forma fácilmente convertible en una sustancia terapéuticamente activa.

10 En un aspecto, se da a conocer una solución de codisolvente que incluye DMSO con un 10% de agua. El agua en una proporción de aproximadamente el 8% p/p disminuye el punto de congelación del DMSO a justo por debajo de 0°C. Se ha observado que, para una solución con DMSO como disolvente que contiene un 10% p/p de agua (fracción molar de DMSO de 0,67), la estabilidad de la exendina-4 aumenta.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados indicados:

El término “estabilidad química” significa que se forma un porcentaje aceptable de productos de degradación producidos por vías químicas tales como oxidación o hidrólisis. En particular, una formulación se considera químicamente estable si no se forman más de aproximadamente 30%, 25%, 20%, 10%, 5%, 2% o 1% de productos de degradación tras dos meses a temperatura ambiente.

El término “estabilidad física” significa que se forma un porcentaje aceptable de agregados (por ejemplo, dímeros, trímeros y formas mayores). En particular, una formulación se considera físicamente estable si no se forman más de aproximadamente 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2% o 1% de agregados tras dos meses a temperatura ambiente.

25 El término “formulación estable” significa que al menos aproximadamente el 65% del compuesto peptídico física y químicamente estable permanece tras dos meses a temperatura ambiente (o condiciones equivalentes a temperatura elevada). Son formulaciones particularmente útiles aquellas que conservan al menos aproximadamente el 80% del péptido química y físicamente estable en dichas condiciones. Son formulaciones estables particularmente deseables aquellas que no presentan una degradación sustancial después de recibir irradiación de esterilización (por ejemplo, haces de rayos gamma, beta o de electrones).

Los términos “péptido” y/o “compuesto peptídico” se refieren a polímeros de hasta 50 residuos aminoácidos unidos por enlaces amida (CONH). Dichos términos incluyen análogos, derivados, agonistas, antagonistas y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los mismos. Dichos términos también incluyen péptidos y/o compuestos peptídicos con D-aminoácidos, aminoácidos modificados, derivatizados o de origen no natural con configuración D- o L- y/o unidades peptidomiméticas como parte de su estructura.

El término “incretina” o péptido “mimético de incretina” se refiere a un compuesto, por ejemplo un péptido, que provoca directa o indirectamente un aumento dependiente de la glucosa de la cantidad de liberación de insulina, de tal modo que la cantidad de insulina liberada por el páncreas es mayor cuando los niveles de glucosa en plasma son elevados en comparación con los niveles de glucosa en plasma normales. Sin embargo, la incretina y los péptidos miméticos de incretina pueden tener muchas funciones biológicas adicionales, y las formulaciones y métodos dados a conocer en la presente memoria no se limitan a usos exclusivamente en el contexto de la liberación de insulina. Ejemplos específicos de incretinas son GIP y GLP-1, junto con sus análogos y derivados. Algunos ejemplos de miméticos de incretina son exendina-3 y exendina-4, junto con sus análogos y derivados.

El término “concentración elevada” se refiere a aproximadamente el 2,5% p/v y hasta la solubilidad máxima del péptido en particular.

El término “excipiente” se refiere a una sustancia presente en una formulación que se agrega como diluyente o vehículo, o para darle forma o consistencia. A modo de ejemplo, los excipientes incluyen disolventes tales como EtOH, que se utilizan para disolver fármacos en las formulaciones, tensoactivos no iónicos tales como Tween 20, que se utilizan para facilitar la solubilización de fármacos en formulaciones, y conservantes tales como alcoholes bencílicos o parabenos metílicos o propílicos, que se utilizan para impedir o inhibir el crecimiento microbiano.

El término “disolvente polar aprótico” se refiere a un disolvente polar que no contiene hidrógeno ácido y no actúa como dador de enlaces de hidrógeno. Algunos ejemplos de disolventes polares apróticos son dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetato de etilo, n-metil pirrolidona (NMP), dimetilacetamida (DMA) y carbonato de propileno.

El término “disolvente prótico no acuoso” se refiere a un disolvente apolar que contiene hidrógeno unido a oxígeno o nitrógeno, de tal modo que es capaz de formar puentes de hidrógeno o de dar protones. Algunos ejemplos de disolventes próticos no acuosos son los polietilenglicoles (PEG), el propilenglicol (PG), la polivinilpirrolidona (PVP), el metoxipropilenglicol (MPEG), el glicerol y el glicofulrol.

- Un aspecto de la presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas de compuestos de incretina o péptidos miméticos de incretina tal como se describen en las reivindicaciones en al menos un disolvente polar aprótico estable durante períodos prolongados a temperaturas elevadas. Las formulaciones acuosas diluidas estándar de péptidos y proteínas requieren el manejo del tipo de tampón, la fuerza iónica, el pH y los excipientes (por ejemplo, EDTA y ácido ascórbico) para lograr estabilidad. En cambio, las formulaciones reivindicadas alcanzan la estabilización de los compuestos peptídicos mediante el uso de disolventes polares apróticos. En particular, se puede alcanzar una estabilidad de concentraciones elevadas (por ejemplo, de aproximadamente el 2,5% p/v) de compuesto peptídico mediante las formulaciones descritas en la presente memoria.
- Tal como se ha mencionado anteriormente, se ha puesto de manifiesto inesperadamente que ciertos péptidos, tales como la incretina y los péptidos miméticos de incretina, que incluyen GLP-1 y péptidos de exendina, particularmente péptidos de exendina, formulados en disolventes polares apróticos, mejoran la estabilidad en comparación con las formulaciones en agua. En un aspecto, se dan a conocer formulaciones farmacéuticas estables que incluyen incretina o péptidos miméticos de incretina en al menos un disolvente polar aprótico que es química y físicamente estable a temperaturas elevadas o no refrigeradas durante períodos prolongados. Las formulaciones incluyen además uno o más excipientes estabilizantes seleccionados de entre el grupo constituido por agua, un azúcar y un alcohol de azúcar. Dichas formulaciones son estables incluso cuando se utilizan en altas concentraciones. Por lo tanto, dichas formulaciones tienen la ventaja de que pueden ser transportadas y almacenadas a temperaturas iguales o superiores a temperaturas no refrigeradas, temperatura ambiente o temperatura fisiológica durante períodos prolongados. También resultan adecuadas para su utilización en dispositivos de administración implantables.
- En ciertas formas de realización, el péptido se disuelve en mezclas de disolvente o disolventes polares apróticos y excipientes estabilizantes. La formulación puede ser un líquido que fluye libremente, una mezcla viscosa de tipo gel o una composición liofilizada. El péptido se estabiliza en la formulación de tal modo que se libera como una forma químicamente no modificada, una forma modificada pero terapéuticamente activa, y/o una forma que se convierte fácilmente en una sustancia terapéuticamente activa.
- En algunas formas de realización, el compuesto de incretina o péptido mimético de incretina puede estar complejado con un ión metálico y el complejo de proteína-metal o péptido-metal puede presentar una solubilidad reducida en mezclas de disolvente o disolventes polares apróticos y excipientes estabilizantes, en comparación con la disolución de proteínas o péptidos sin complejar. En algunas formas de realización, la estabilidad de un péptido o proteína terapéuticamente activos, tal como un mimético de incretina, o más particularmente, exendina-3, exendina-4 o análogos o derivados de los mismos, se ve reforzada por complejación o quelación del péptido o proteína con un ión metálico, tal como el catión de zinc. En algunas formas de realización, el complejo péptido-metal o proteína-metal se suspende en agua/DMSO al 0,5% o agua/DMSO al 10%, y el complejo péptido-metal o proteína-metal presenta una estabilidad mejorada en comparación con la disolución de péptido o proteína sin complejar. Sin ánimo de quedar limitados por la teoría, se cree que la complejación o quelación con el catión de zinc, por ejemplo, aumenta la estabilidad de un péptido o proteína terapéuticamente activos reduciendo su solubilidad, lo que reduce la susceptibilidad del péptido o proteína a la degradación por solólisis. Por lo tanto, la suspensión posterior del complejo de péptido-zinc o proteína-zinc en un disolvente polar aprótico puede mejorar adicionalmente su estabilidad en comparación con la disolución de la proteína o péptido sin complejar en el disolvente. En algunas formas de realización, se obtiene una dispersión de un precipitado blanco visible a simple vista que contiene aproximadamente 25 mg/ml de exendina-4 en forma de complejo exendina-4-zinc en DMSO. En algunas formas de realización, la dispersión del complejo exendina-4-zinc en DMSO contiene entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml de exendina-4. En algunas formas de realización, se evalúa adicionalmente la estabilidad del complejo péptido-zinc metálico a diferentes temperaturas y durante distintos períodos.
- La complejación de una proteína, un péptido o un compuesto peptídico con un ión metálico puede resultar útil en la formulación de un agente beneficioso que se administra a lo largo de un período prolongado. La complejación también puede permitir que una proteína, un péptido o un compuesto peptídico se formule a un pH deseado, de tal manera que la formulación se puede mezclar o coadministrar con un segundo agente beneficioso con un menor riesgo de precipitación por cambio del pH.
- En una forma de realización, las formulaciones se presentarán en forma líquida, o en forma de gel viscoso fluido, en las condiciones de uso. Dicha formulación puede presentar una viscosidad comprendida, por ejemplo, entre aproximadamente 0,25 y 1.000.000 cP. En otra forma de realización, la formulación es un polvo liofilizado que se puede reconstituir antes de su uso.
- En otro aspecto, se da a conocer la utilización de incretina o péptidos miméticos de incretina en las formulaciones descritas en la presente memoria, habiendo estado liofilizados dichos péptidos (antes o después de la formulación) a partir de soluciones acuosas con un pH comprendido entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5, o entre aproximadamente 4,5, formulación que presenta una mayor estabilidad. En otro aspecto, se da a conocer el uso de incretina o péptidos miméticos de incretina en las presentes formulaciones, habiendo sido liofilizados dichos péptidos (antes o después de la formulación) a partir de soluciones acuosas con un pH igual o inferior al pI del péptido de

incretina, formulación que presenta una mayor estabilidad.

Las incretinas y péptidos miméticos de incretina son compuestos que provocan un aumento de la cantidad de insulina liberada cuando los niveles de glucosa son normales, o particularmente cuando son elevados. Estos compuestos de incretina y péptidos miméticos de incretina tienen acciones que van más allá de la acción inicial de la incretina definida por la secreción de insulina. Por ejemplo, pueden tener también acciones para reducir la producción de glucagón y retrasar el vaciamiento gástrico. Además, pueden tener acciones para mejorar la sensibilidad a la insulina, y pueden aumentar la neogénesis de células de islotes (formación de nuevos islotes).

El concepto del efecto de la incretina se desarrolló a partir de la observación de que las respuestas de la insulina a la glucosa oral son superiores a las medidas tras la administración intravenosa de cantidades equivalentes de glucosa. Se concluyó que los factores derivados del intestino, o incretinas, afectan a la liberación de insulina posprandial. La entrada de nutrientes en el estómago y el tracto gastrointestinal proximal provoca la liberación de hormonas incretinas, que a su vez estimulan la secreción de insulina. Este insulínotropismo, o capacidad de estimular la secreción de insulina, se puede cuantificar mediante la comparación de las respuestas de insulina o péptido C a cargas de glucosa orales frente a cargas intravenosas. De esta manera, se ha puesto de manifiesto que el efecto de la incretina es responsable de aproximadamente entre el 50% y el 70% de la respuesta de insulina a la glucosa oral en individuos sanos.

Aunque muchas hormonas posprandiales tienen una actividad similar a la incretina, la incretina y péptidos miméticos de incretina principales incluyen polipéptido insulínotropico dependiente de la glucosa, también conocido como polipéptido gástrico inhibidor (GIP), péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1), y péptidos de exendina.

GIP y GLP-1 pertenecen a la superfamilia de péptidos de glucagón y, por lo tanto, comparten cierta identidad de secuencia de aminoácidos. GIP y GLP-1 son secretados por células especializadas en el tracto gastrointestinal y tienen receptores localizados en las células de los islotes, así como de otros tejidos. Como las incretinas, ambos son secretados en el intestino como respuesta a la ingestión de nutrientes, lo que da lugar a una secreción de insulina mejorada. El efecto insulínotropico de GIP y GLP-1 depende de las elevaciones de la glucosa ambiental. Ambos se desactivan rápidamente por la enzima omnipresente dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV).

Más particularmente, GIP es un péptido individual de 42 aminoácidos sintetizado en células K enteroendocrinas especializadas y secretado por las mismas. Estas células se concentran principalmente en el duodeno y el yeyuno proximal, aunque también se pueden encontrar a lo largo de todo el intestino. El principal estimulante de la secreción de GIP es la ingestión de comidas ricas en hidratos de carbono y lípidos. Tras la ingestión, los niveles en plasma circulante de GIP aumentan de 10 a 20 veces. La semivida del GIP intacto se estima en aproximadamente 7,3 minutos en sujetos sanos y 5,2 minutos en sujetos diabéticos.

Los efectos fisiológicos del GIP se han estudiado utilizando antagonistas del receptor de GIP, antagonistas del péptido GIP, y ratones knockout del receptor de GIP, además de los protocolos de perfusión de GIP. El bloqueo del enlace del GIP con su receptor da lugar a una secreción de insulina dependiente de glucosa atenuada tras la carga oral de glucosa en ratas y ratones. De modo similar, la administración de antagonistas de GIP o antisueros de GIP reduce notablemente la liberación de insulina posprandial en ratas. Los ratones knockout del receptor de GIP exhiben niveles normales de glucosa en ayunas, pero también una leve intolerancia a la glucosa tras la recepción de cargas orales de la misma. Curiosamente, también exhiben resistencia a la obesidad inducida por la dieta tras meses de alimentación alta en grasas. Además, en los ratones ob/ob deficientes en leptina, el genotipo knockout de receptor de GIP parece disminuir el grado de obesidad que se desarrolla.

La perfusión de GIP ha demostrado consistentemente la estimulación de la secreción de insulina en islotes aislados de rata, páncreas aislado perfundido de rata, perros y humanos. Durante el pinzamiento normoglucémico, ligeramente hiperglucémico (54 mg/dl por encima del nivel basal) y moderadamente hiperglucémico (143 mg/dl por encima del nivel basal), se ha demostrado que la perfusión de GIP da lugar a la secreción de insulina sólo en presencia de concentraciones elevadas de glucosa. Además, se ha demostrado que el GIP no es glucagotrópico en seres humanos normales durante las condiciones normoglucémicas o hiperglucémicas. Así, el efecto del GIP liberado endógenamente aparece como un importante mecanismo de secreción de insulina posprandial, y no parece jugar ningún papel en el estado de ayuno.

El GIP tiene también muchos efectos no incretínicos. A diferencia de otros secretagogos de insulina, el GIP estimula la proliferación de células beta y la supervivencia celular en los estudios de líneas celulares de islotes INS-1. Además, algunos estudios en animales han sugerido un papel del GIP en el metabolismo de los lípidos mediante la estimulación de la actividad de la lipoproteína lipasa, que induce la incorporación de ácidos grasos en el tejido adiposo y estimula la síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, en los seres humanos, no hay pruebas evidentes de ningún efecto del GIP sobre el metabolismo de los lípidos. El GIP también parece estimular la secreción de glucagón por el páncreas de rata perfundido aislado, aunque los estudios en humanos no han demostrado ninguna influencia significativa sobre la secreción de glucagón. Además, a diferencia del GLP-1, el GIP parece actuar acelerando el vaciamiento gástrico y no por la inhibición de la motilidad gastrointestinal.

El GLP-1, un producto del gen de glucagón, es un péptido de 30/31 aminoácidos sintetizado y secretado por las células L enteroendocrinas, localizadas principalmente en el íleon y el colon, aunque también es secretado por las células L del duodeno y el yeyuno. Otros productos incretínicos del gen de glucagón incluyen la glicentina, que es biológicamente inactiva, y la oxintomodulina, que presenta algunas propiedades insulínótropicas. Al igual que el GIP, el receptor de GLP-1 se expresa ampliamente en los islotes del páncreas, el cerebro, el corazón, los riñones y el tracto gastrointestinal.

Hay dos formas principales de GLP-1 biológicamente activo que se secreta tras la ingestión de comida: GLP-1 (7-37) y GLP-1 (7-36) amida, que se diferencian por un solo aminoácido. La mayor parte del GLP-1 circulante activo resulta ser GLP-1 (7-36) amida, aunque ambos son equipotentes y tienen actividades biológicas similares. La secreción de GLP-1 en el intestino distal se activa mediante señales nerviosas y endocrinas iniciadas por la entrada de nutrientes en el lumen del tracto gastrointestinal proximal. Los niveles circulantes de GLP-1 aumentan rápidamente a los pocos minutos de la ingestión de alimentos y están altamente correlacionados con la liberación de insulina. Al igual que el GIP, el GLP-1 aumenta la secreción de insulina en presencia de concentraciones elevadas de glucosa. La DPP-IV disocia rápidamente el GLP-1, dando lugar a su metabolito inactivo truncado. El GLP-1 perfundido tiene una semivida más corta que el GIP, de aproximadamente 2 minutos tanto en sujetos humanos no diabéticos como diabéticos.

El GLP-1 tiene muchos efectos biológicos, y la mayor parte de los GLP-1, analizados en estudios en animales, también se han demostrado en estudios en seres humanos. El GLP-1 es responsable de una parte significativa de la respuesta de la insulina a la glucosa oral, y los estudios en animales y humanos con antagonistas del receptor del GLP-1 sugieren que el GLP-1 puede ser esencial para una tolerancia normal a la glucosa. El GLP-1 no sólo aumenta la secreción de insulina, sino que también inhibe la secreción de glucagón de un modo dependiente de la glucosa. Dicho de otro modo, la supresión del glucagón por parte del GLP-1 no tiene lugar en concentraciones hipoglucémicas de glucosa en plasma, sino que requiere la presencia de normoglucemia o hiperglucemia. Existen pruebas de que, como el GIP, el GLP-1 aumenta la proliferación de las células beta y ayuda a mantener las poblaciones de las mismas. También se ha puesto de manifiesto en estudios en animales y humanos que el GLP-1 ralentiza el vaciado gástrico, lo que frena la entrada de nutrientes en el intestino y disminuye las concentraciones de glucosa posprandial.

También existe un interés significativo en el papel del GLP-1 en la regulación de la ingesta de alimentos y la pérdida de peso. En los roedores, la inyección aguda intracerebroventricular de GLP-1 o agonistas del receptor del GLP-1 da lugar a la reducción de la ingesta de alimentos. Además, la administración central del antagonista del receptor del GLP-1 exendina 9-39 da lugar a un aumento de la ingesta de alimentos en ratas.

En resumen, el GLP-1: (1) estimula la secreción de insulina dependiente de glucosa; (2) inhibe la secreción posprandial de glucagón; (3) reduce la glucosa en sangre después de la carga de glucosa o la ingestión de comida, y (4) ralentiza el vaciado gástrico, dando lugar a una disminución de la fluctuación glucémica y a una disminución de la secreción de insulina estimulada por glucosa.

Las exendinas son otra familia de péptidos implicados en la secreción de insulina. Las exendinas se encuentran en la saliva del monstruo de Gila, un lagarto originario de Arizona, y del lagarto moteado mexicano. La exendina-3 está presente en la saliva del *Heloderma horridum*, y la exendina-4 en la de *Heloderma suspectum* (Eng, J. *et al.*, J. Biol. Chem., 265: 20259-62, 1990; Eng, J. *et al.*, J. Biol. Chem., 267: 7402-05 (1992)). Las exendinas tienen cierta similitud de secuencia con diversos miembros de la familia de péptidos similares al glucagón, siendo el grado más alto de identidad, del 53%, para el GLP-1 (Goke *et al.*, J. Biol. Chem., 268: 19650-55 (1993)).

La exendina-4 es un potente agonista de los receptores del GLP-1 en células TC1 secretoras de insulina, en células acinares dispersas de páncreas de cobaya y en células parietales del estómago; el péptido también estimula la liberación de somatostatina e inhibe la liberación de gastrina en estómagos aislados (Goke *et al.*, J. Biol. Chem., 268: 19650-55 (1993); Schepp *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 69: 183-91 (1994); Eissele *et al.*, Life Sci., 55: 629-34 (1994)). Se puso de manifiesto que la exendina-3 y la exendina-4 eran agonistas del GLP-1 en la estimulación de la producción de AMPc en las células acinares pancreáticas y la liberación de amilasa en las mismas (Malhotra, R. *et al.*, Regulatory Peptides, 41:149-56 (1992); Raufman *et al.*, J. Biol. Chem., 267: 21432-37 (1992); Singh *et al.*, Regul. Pept., 53: 47-59 (1994)). Se ha propuesto la utilización de las actividades insulínótropicas de la exendina-3 y la exendina-4 para el tratamiento de la diabetes mellitus y la prevención de la hiperglucemia (Eng, patente US nº 5.424.286).

Se ha documentado el hecho de que los péptidos truncados de exendina, tales como exendina[9-39], una molécula carboxiamidada, y los fragmentos de 3-39 a 9-39, son antagonistas potentes y selectivos del GLP-1 (Goke *et al.*, J. Biol. Chem., 268:19650-55 (1993); Raufman, J. P. *et al.*, J. Biol. Chem., 266:2897-902 (1991); Schepp, W. *et al.*, Eur. J. Pharm., 269:183-91 (1994); Montrose-Rafizadeh *et al.*, Diabetes, 45(Suppl. 2):152A (1996)). La exendina[9-39] bloquea el GLP-1 endógeno in vivo, lo que reduce la secreción de insulina (Wang *et al.*, J. Clin. Invest., 95:417-21 (1995); D'Alessio *et al.*, J. Clin. Invest., 97:133-38 (1996)). El receptor aparentemente responsable del efecto insulínótropico del GLP-1 se ha clonado a partir de células de islotes pancreáticos de rata (Thorens, B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8641-8645 (1992)). Las exendinas y la exendina[9-39] se unen al receptor clonado de GLP-1

(receptor de GLP-1 de células pancreáticas de rata: Fehmann HC *et al.*, *Peptides*, 15 (3): 453-6 (1994); receptor de GLP-1 humano: Thorens B *et al.*, *Diabetes*, 42 (11): 1678-82 (1993)). En células transfectadas con el receptor de GLP-1 clonado, la exendina-4 es un agonista, es decir, aumenta el AMPc, mientras que la exendina[9-39] es un antagonista, es decir, bloquea los efectos estimulantes de la exendina-4 y el GLP-1.

La exendina-4 es un péptido amidado C-terminal de 39 aminoácidos que se encuentra en la saliva del monstruo de Gila (*Heloderma horridum*), con un 53% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia peptídica del GLP-1. Véase, por ejemplo, Eng, J. *et al.*, *J. Bio. Chem.*, 267:11, p. 7402-7405 (1992), Young *et al.*, *Diabetes*, Vol. 48, pág. 1026-1034, mayo de 1999. En cuanto a su actividad, la exendina-4 es un agonista altamente específico para el receptor del GLP-1, y, como el GLP-1, es capaz de estimular la secreción de insulina. Por lo tanto, como el GLP-1, la exendina-4 se considera un péptido insulínotropico.

Sin embargo, a diferencia del GIP y el GLP-1, la exendina-4 tiene una semivida relativamente larga en humanos debido a su resistencia a los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV, que degrada rápidamente la secuencia del GIP y el GLP-1 *in vivo*. Además, se ha puesto de manifiesto que, en comparación con el GLP-1, la exendina-4 tiene una mayor capacidad para estimular la secreción de insulina, y que se puede utilizar una cantidad menor de exendina-4 para obtener dicha actividad estimulante. Véase, por ejemplo, la patente US nº 5.424.286, que se incorpora al presente documento como referencia. Por lo tanto, los péptidos de exendina-4 o sus derivados (para ejemplos de dichos derivados, véase, por ejemplo, la patente US nº 6.528.486 y su correspondiente solicitud internacional WO 01/04156) tienen una mayor utilidad potencial en el tratamiento de desórdenes que implican la desregulación de los niveles de insulina (por ejemplo, en enfermedades como la diabetes) que el GIP o el GLP-1. También entran dentro del alcance de la invención composiciones que comprenden agonistas de exendina, análogos de exendina y/o análogos de agonistas de exendina, tales como los dados a conocer en las solicitudes de patente internacional WO 99/25727, WO 99/25728 y WO 99/07404.

Los compuestos peptídicos útiles en las formulaciones y métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar en forma de sal, por lo general una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales útiles son conocidas por los expertos en la materia e incluyen sales de ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, bases inorgánicas o bases orgánicas. En una forma de realización, las sales son sales de acetato.

Los péptidos y compuestos peptídicos fácilmente solubles en disolventes polares apróticos son particularmente útiles. Sin embargo, se pueden utilizar diversos excipientes y técnicas de solubilización conocidos en la técnica para mejorar la solubilidad del péptido de interés. El experto en la materia puede determinar fácilmente qué compuestos son de utilidad sobre la base de su solubilidad, es decir, el compuesto tiene que ser soluble en el disolvente polar aprótico en particular, como mínimo en una cantidad aceptable. En una forma de realización particular, los compuestos peptídicos son péptidos de exendina, incluidos la exendina-4 y análogos de la misma.

Alternativamente, resultan útiles proteínas, péptidos y compuestos peptídicos que exhiben una solubilidad baja. En algunas formas de realización, la estabilidad de un péptido o proteína terapéuticamente activos, tal como un mimético de incretina, o más particularmente, exendina-3, exendina-4 o análogos o derivados de las mismas, se puede ver reforzada por complejación o quelación del péptido o proteína con un ión metálico, tal como el catión de zinc. Sin ánimo de quedar limitados por la teoría, se cree que la complejación o quelación con el catión de zinc, por ejemplo, aumenta la estabilidad de un péptido o proteína terapéuticamente activos reduciendo su solubilidad, lo que reduce la susceptibilidad del péptido o proteína a la degradación por solvolisis. De este modo, se espera que la suspensión posterior del complejo de péptido-zinc o proteína-zinc en un disolvente polar aprótico mejore aún más su estabilidad en comparación con la disolución de la proteína o péptido no complejados o péptido en el disolvente.

La proporción de incretina o péptido mimético de incretina puede variar en función del compuesto, el desorden a tratar, la solubilidad del compuesto, la dosis esperada y la duración de la administración. (Véase, por ejemplo, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Gilman *et al.*, 7ª ed. (1985) y *Pharmaceutical Sciences*, Remington, 18ª ed. (1990). La concentración de péptido en formulaciones de alta concentración puede variar al menos entre aproximadamente 0,05 mg/ml y la solubilidad máxima del compuesto. En una forma de realización, este intervalo está comprendido entre aproximadamente 0,05 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, entre aproximadamente 0,05 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, entre aproximadamente 0,2 mg/ml y aproximadamente 25 mg/ml, entre aproximadamente 1,0 mg/ml y aproximadamente 10,0 mg/ml, entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 5,0 mg/ml, etc.

También se dan a conocer los productos metabólicos *in vivo* de las formulaciones descritas en la presente memoria. Dichos productos pueden resultar, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación y similares del compuesto administrado, debidas principalmente a procesos enzimáticos. En consecuencia, también se incluyen los compuestos producidos por un proceso que comprende poner en contacto una formulación descrita en la presente memoria con un mamífero por un período suficiente para obtener un producto metabólico de la misma. Por regla general, dichos productos se identifican mediante la preparación de una formulación descrita en la presente memoria marcada radioactivamente (por ejemplo, con C¹⁴ o H³), la administración de la misma en una dosis detectable (por ejemplo, superior a aproximadamente 0,5 mg/kg) a un mamífero, por ejemplo una rata, un ratón, una cobaya, un mono o un ser humano, dejando pasar tiempo suficiente para que tenga lugar el metabolismo

(típicamente entre 30 segundos y 30 horas) y aislando los productos de conversión a partir de la orina, la sangre u otras muestras biológicas. Estos productos se aíslan fácilmente, ya que están marcados (otros se aíslan utilizando anticuerpos capaces de enlazar epítopes que sobreviven en el metabolito). Las estructuras de metabolito se determinan de la manera convencional, por ejemplo, por análisis de EM o RMN. En general, el análisis de los metabolitos se puede llevar a cabo del mismo modo que los estudios convencionales de metabolismo de fármacos, bien conocidos por los expertos en la materia. Los productos de conversión, siempre y cuando no se encuentren de otra forma in vivo, son útiles en los ensayos de diagnóstico para la dosificación terapéutica de las formulaciones descritas en la presente memoria, incluso aunque no posean actividad biológica propia.

En general, las formulaciones estables descritas en la presente memoria se pueden preparar por simple disolución de la cantidad deseada, que puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto peptídico deseado en el disolvente polar aprótico seleccionado. Los ejemplos de disolventes polares apróticos incluyen dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetato de etilo, n-metil pirrolidona (NMP), dimetilacetamida (DMA), carbonato de propileno y mezclas de los mismos.

El disolvente polar aprótico puede incluir opcionalmente pequeñas cantidades de agua en cantidades deseadas. El aumento de la cantidad de agua contenida en las formulaciones peptídicas puede hacer aumentar de forma general la degradación del péptido. Sin embargo, el efecto de estabilización de las formulaciones puede resultar suficiente para dar lugar a una buena estabilidad a largo plazo.

En una forma de realización, el disolvente polar aprótico tiene un punto de congelación de 0°C o menor, con el fin de evitar la congelación durante el almacenamiento. En este sentido, sin la intención de quedar limitados por la teoría, se cree que la estabilidad de los péptidos aumenta cuando se evitan los cambios de fase. Así, en un aspecto, las formulaciones pueden presentar un punto de congelación por debajo de aproximadamente 0°C. Este punto de congelación puede ser una propiedad inherente del disolvente polar aprótico, o se pueden utilizar sistemas de codisolvente alternativos para obtener el punto de congelación deseado.

Todos los componentes farmacéuticamente aceptables que mejoran la solubilidad, la estabilidad física y/o la estabilidad química de la incretina o péptido mimético de incretina en las formulaciones según la invención pueden ser útiles en el contexto de las formulaciones descritas en la presente memoria. Las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria incluyen uno o más excipientes estabilizantes, y cada excipiente puede tener una o más funciones de estabilización.

En un aspecto, el excipiente estabilizante puede actuar estabilizando la naturaleza física del péptido. Los excipientes estabilizantes adecuados capaces de estabilizar la incretina o péptido mimético de incretina incluyen agua, azúcares y alcoholes de azúcar.

En algunas formas de realización, el excipiente estabilizante puede actuar estabilizando el péptido frente a la degradación química, por ejemplo, reduciendo o evitando la formación de imida cíclica u otros productos de degradación de los residuos aminoácidos de asparagina y glutamina.

Se puede observar una reducción de la degradación química, por ejemplo, como una reducción de aproximadamente el 2%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 6%, aproximadamente el 7%, aproximadamente el 8%, aproximadamente el 9%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, o aproximadamente el 90% en la velocidad de degradación de la formulación que comprende un disolvente polar aprótico y/o al menos un excipiente estabilizante, en comparación con la velocidad de degradación de la formulación que no contiene ningún disolvente polar aprótico y/o al menos un excipiente estabilizante.

En algunas formas de realización, se considera que una formulación presenta una reducción en los productos de degradación química si se observa un porcentaje menor de productos de degradación tras un mes a 25°C en la formulación que comprende un disolvente polar aprótico y/o al menos un excipiente estabilizante, en comparación con la formulación que no contiene ningún disolvente polar aprótico y/o al menos un excipiente estabilizante. En algunas formas de realización, se considera que una formulación presenta una reducción en los productos de degradación química si se observa un porcentaje menor de productos de degradación tras un mes a 25°C en la formulación que comprende un disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante, en comparación con la formulación que no contiene ningún disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante. En algunas formas de realización, se considera que una formulación presenta una reducción en los productos de degradación química si se observa un porcentaje menor de productos de degradación tras tres meses a 25°C en la formulación que comprende un disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante, en comparación con la formulación que no contiene ningún disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante. En algunas formas de realización, se considera que una formulación presenta una reducción en los productos de degradación química si se observa un porcentaje menor de productos de degradación tras seis meses a 25°C en la formulación que comprende un disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante, en comparación con la

5 formulación que no contiene ningún disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante. En algunas formas de realización, se considera que una formulación presenta una reducción en los productos de degradación química si se observa un porcentaje menor de productos de degradación tras un mes a 37°C en la formulación que comprende un disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante, en comparación con la formulación que no contiene ningún disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante. En algunas formas de realización, se considera que una formulación presenta una reducción en los productos de degradación química si se observa un porcentaje menor de productos de degradación tras dos meses a 37°C en la formulación que comprende un disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante, en comparación con la formulación que no contiene ningún disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante. En algunas formas de realización, se considera que una formulación presenta una reducción en los productos de degradación química si se observa un porcentaje menor de productos de degradación tras tres meses a 37°C en la formulación que comprende un disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante, en comparación con la formulación que no contiene ningún disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante. En algunas formas de realización, se considera que una formulación presenta una reducción en los productos de degradación química si se observa un porcentaje menor de productos de degradación tras seis meses a 37°C en la formulación que comprende un disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante, en comparación con la formulación que no contiene ningún disolvente polar aprótico y al menos un excipiente estabilizante.

20 En otro aspecto, el excipiente estabilizante puede actuar haciendo disminuir el punto de congelación del disolvente polar aprótico a 0°C o menos. Se cree que los puntos de congelación menores de 0°C estabilizan la formulación impidiendo los cambios de fase en las condiciones probables de preparación y almacenamiento. En este sentido, y sin la intención de quedar limitados por la teoría, se cree que la estabilidad física del péptido se mantiene mediante la minimización de los cambios de fase. Son excipientes adecuados en este contexto: agua, sales, azúcares, alcoholes de azúcar y mezclas de los mismos.

25 En otro aspecto, el excipiente estabilizante puede actuar aumentando la viscosidad de la formulación dentro de un intervalo comprendido entre 0,25 y 1.000.000 cP. Los ejemplos de excipientes estabilizantes adecuados en este contexto incluyen polímeros termosensibles que aumentan la viscosidad de la formulación, pero no gelifican en las condiciones de uso.

30 En una forma de realización, el excipiente estabilizante puede ser un disolvente prótico no acuoso. Los ejemplos de disolventes próticos no acuosos incluyen polietilenglicoles (PEG), propilenglicol (PG), polivinilpirrolidona (PVP), metoxipropilenglicol (MPEG), glicerol y glicofurool.

35 En otra forma de realización, el excipiente estabilizante puede ser un tampón acuoso, un antioxidante, un agente quelante, un tensioactivo o cualquier otro aditivo farmacéuticamente aceptable que mejore la solubilidad o la estabilidad del péptido. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen los tampones de acetato, citrato, fosfato, tartrato y glutamato. Los ejemplos de antioxidantes adecuados incluyen ácido ascórbico, cisteína, metionina, monoioglicerol, tiosulfato sódico, sulfitos, BHT, BHA, palmitato de ascorbilo, galato de propilo, vitamina E o mezclas de los mismos. Los ejemplos de quelantes adecuados incluyen EDTA, glicerina, ácido tartárico y sus sales, ácido cítrico y sus sales, o mezclas de cualquiera de las sustancias anteriores.

45 En otro aspecto, se dan a conocer aplicaciones de las formulaciones descritas en la presente memoria. Generalmente, las aplicaciones comprenden una formulación descrita en la presente memoria para su administración a un sujeto que la necesite. Las formulaciones pueden ser utilizadas en cualquier contexto terapéutico o profiláctico en el que la incretina o péptido mimético de incretina pueda resultar útil. A modo de ejemplo no limitativo, las aplicaciones pueden incluir el tratamiento o prevención de la diabetes mellitus (incluidas las de tipo 1, tipo 2 y gestacional), intolerancia a la glucosa, obesidad, dislipidemia, infarto de miocardio o cualquier otro uso conocido de la incretina o péptidos miméticos de incretina.

50 De acuerdo con las aplicaciones descritas en la presente memoria, una formulación farmacéutica puede ser una formulación para su administración a través de cualquier vía conocida en la técnica que permita que la incretina o péptido mimético de incretina esté biológicamente disponible para el sujeto o la muestra en cantidades efectivas. Por ejemplo, la formulación puede ser una formulación para su administración a un sujeto a través de cualquier vía central o periférica conocida en la técnica, incluidas, aunque sin limitarse a las mismas: vía oral, parenteral, transdérmica, transmucosa o pulmonar. En una forma de realización, se utiliza administración parenteral. Los ejemplos de vías específicas de administración incluyen las vías oral, ocular, rectal, bucal, tópica, nasal, oftálmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intracerebral, transdérmica y pulmonar. La determinación del método apropiado de administración se lleva a cabo generalmente sobre la consideración de la condición (por ejemplo, enfermedad o trastorno) a tratar, la etapa de dicha condición (por ejemplo, enfermedad o trastorno), la comodidad para el sujeto y otros factores conocidos por los expertos en la materia.

65 La administración puede ser intermitente o continua, en forma aguda y/o crónica. La administración continua se puede alcanzar utilizando un dispositivo de administración controlada por bombeo implantable o fijable, tal como se describen en las patentes US nº 5.728.396, nº 5.985.305, nº 6.156.331, nº 6.261.584 y nº 6.395.292. Sin embargo, se puede utilizar cualquier dispositivo de administración controlada implantado conocido en la técnica.

Alternativamente, se pueden utilizar dispositivos de inyección de tipo pluma conocidos en la técnica junto con las formulaciones y los métodos descritos en la presente memoria.

5 En una forma de realización, la administración puede ser un tratamiento profiláctico que se inicia en el momento del diagnóstico o la observación de la condición o condiciones (por ejemplo, estilo de vida, historia genética, cirugía, etc.) que pone al sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno específicos. Alternativamente, la administración se puede llevar a cabo posteriormente a la aparición de los síntomas asociados a una enfermedad o trastorno específicos.

10 El término “cantidad efectiva” se refiere a una cantidad de un agente farmacéutico utilizado para tratar, aliviar, prevenir o eliminar la condición identificada (por ejemplo, una enfermedad o un trastorno), o para ejercer un efecto terapéutico o preventivo detectable. Dicho efecto se puede detectar, por ejemplo, mediante marcadores químicos, los niveles de antígeno o el tiempo transcurrido hasta un acontecimiento medible, como por ejemplo la morbilidad o la mortalidad. La cantidad efectiva exacta para un sujeto depende de su peso corporal, su tamaño y su salud; de la naturaleza y el alcance del trastorno; y del agente terapéutico o combinación de agentes terapéuticos seleccionados para la administración. Las cantidades efectivas adecuadas para una situación se pueden determinar mediante la experimentación rutinaria al alcance de los conocimientos y el juicio del médico.

15 Para cualquier péptido, la cantidad efectiva se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivo celular, por ejemplo en modelos animales, como modelos de rata o ratón. También se puede utilizar un modelo animal para determinar el intervalo adecuado de concentraciones y la vía de administración. A continuación, esta información se puede utilizar para determinar las dosis y las vías útiles para la administración en seres humanos.

20 La eficacia y la toxicidad se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, la ED₅₀ (dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la LD₅₀ (dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéutico y tóxico es el índice terapéutico, y se puede expresar como el cociente ED₅₀/LD₅₀. Resultan preferentes las composiciones farmacéuticas que presentan elevados índices terapéuticos. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosis para uso humano. La dosis contenida en dichas composiciones está típicamente comprendida dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye una ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo en función de la forma de dosificación utilizada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.

25 Más particularmente, las relaciones concentración-efecto biológico observadas en relación con la incretina o péptido mimético de incretina empleados en los métodos descritos en la presente memoria indican que la dosis diana está comprendida dentro del intervalo entre aproximadamente 1 µg/día y aproximadamente 1 g/día, o aproximadamente 10 µg/día y aproximadamente 10 mg/día, o aproximadamente 10 µg/día y aproximadamente 250 µg/día, aproximadamente 10 µg/día y aproximadamente 50 µg/día, o aproximadamente 20 µg/día, en dosis únicas, divididas o continuas para un paciente con un peso comprendido entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 kg. Las dosis se pueden ajustar según los pacientes por encima o por debajo del intervalo de peso establecido. El médico determinará la dosis exacta a la vista de factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento.

30 En la presente memoria, se da a conocer la identificación de un sujeto que necesita tratamiento. Se puede utilizar cualquier criterio efectivo para determinar que un sujeto puede beneficiarse de la administración de una incretina o un péptido mimético de incretina. Los métodos para el diagnóstico de enfermedades cardíacas, obesidad, dislipidemia y diabetes, por ejemplo, así como los procedimientos para la identificación de las personas con riesgo de desarrollar estos trastornos, son bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos procedimientos pueden incluir ensayos clínicos, exámenes físicos, entrevistas personales y evaluación de los antecedentes familiares.

35 Como ayuda para la comprensión de la presente invención, se incluyen los siguientes ejemplos. Por supuesto, los experimentos descritos en la presente memoria no deben considerarse como limitativos del alcance de la presente invención.

55 Ejemplos

La presente invención se describe con más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, que se incluyen para ilustrar mejor la invención, pero no deben interpretarse como una limitación del alcance de la misma.

60 Ejemplo 1:

La estabilidad de la exendina-4 en DMSO y DMSO con un 0,5% de agua añadida se puede evaluar del modo siguiente. La evaluación se puede basar en la estabilidad de muestras de exendina-4 almacenadas a 5, 25 y 40°C durante un máximo de 6 meses. Además, se puede evaluar la estabilidad de la exendina-4 en DMSO en comparación con los tampones acuosos a un pH de 4,5.

Se pueden utilizar tres métodos de HPLC para analizar las muestras: HPLC de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) para determinar la potencia (mg/ml) y dos métodos para evaluar la pureza (%), un método de intercambio catiónico fuerte (SCX) y un método de fase inversa (RP). Dichos métodos se pueden adaptar según sea necesario para obtener un análisis de muestras apropiado. Además, el contenido de agua de las muestras se puede evaluar mediante un procedimiento analítico adecuado de Karl Fischer.

Por ejemplo, se puede utilizar SEC-HPLC para medir la potencia de una solución de exendina-4 por ensayo estándar externo, sobre la base del contenido total de péptido de la solución que contiene exendina a 214 nm, en comparación con soluciones de calidad estándar de referencia. La identidad, la potencia y la fuerza de marcación de la exendina-4 se pueden establecer mediante la comparación de los tiempos de retención de los picos de exendina-4 de la solución de muestra y las soluciones estándar de referencia.

Para un periodo de administración de seis meses, resultan deseables aproximadamente 3.600 µg de exendina-4 sobre la base de una dosis de 20 µg/día. Suponiendo un depósito de administración representativo de aproximadamente 150 µl, puede resultar deseable una concentración de aproximadamente 25 mg/ml. Además, a menudo las proteínas y los péptidos se liofilizan, y a menudo incluyen cierta humedad residual. Se puede investigar el efecto del agua sobre la estabilidad del péptido como tal, y las muestras se pueden preparar en DMSO puro y en DMSO con un 0,5% de agua añadida.

Esta concentración de agua hace disminuir el punto de congelación de 18,6°C del DMSO hasta aproximadamente 17,5°C. Debido a la baja concentración molar, se espera que el péptido haga disminuir el punto de congelación sólo ligeramente. Las muestras se pueden preparar con exendina-4 secada mediante el almacenamiento en un desecador lleno de nitrógeno, sobre anhídrido fosfórico, durante al menos 24 horas. Se puede utilizar una bolsa con guantes llena de nitrógeno para preparar la solución madre y las muestras individuales. El desecador, los equipos y los suministros se pueden colocar en la bolsa con guantes. La bolsa con guantes se puede burbujear con nitrógeno y sellarse. Las muestras se pueden preparar mediante la adición de aproximadamente 1.250 mg de exendina-4 a un matraz aforado de 50 ml. Se puede añadir DMSO (envase cerrado) para alcanzar el volumen final. A continuación, se puede transferir aproximadamente la mitad de la solución a un matraz aforado de 25 ml, se pueden añadir 125 µl de agua y la solución resultante se puede mezclar a efectos de obtener una solución final del 0,5% p/v de agua. A continuación, las muestras se pueden separar en viales de 2 ml, se tapan y se sellan a presión. Las muestras se pueden almacenar, por ejemplo a 5°C, 25°C y 40°C, en cajas de cartón para protegerlas de la luz. A continuación, las muestras se pueden someter a ensayo a los intervalos deseados para determinar la pureza y la potencia.

Los resultados de muestras representativas de exendina-4 preparadas de una manera similar a la descrita anteriormente se indican en las tablas siguientes. Más particularmente, se preparan muestras de 25 mg/ml de exendina-4 en DMSO puro y en DMSO/agua al 0,5% en atmósfera de N₂ y se mantienen a 5, 25, y 40°C durante 6 meses (abreviado como "mes.").

Método	Temp (°C)	Sistema	Potencia (mg/ml)				
			0 mes.	1 mes.	2 mes.	3 mes.	6 mes.
SEC-HPLC							
Potencia (mg/ml)	5	DMSO puro					24,5
	5	Agua/DMSO 0,5%					24,4
	25	DMSO puro	23,4	24,8	24,5	24,4	24,3
	25	Agua/DMSO 0,5%	23,4	24,9	24,5	24,4	24,2
	40	DMSO puro		24,8	24,6	24,7	23,6
	40	Agua/DMSO 0,5%		24,9	24,7	24,4	23,1

Método	Temp (°C)	Sistema	% de pureza			
			1 mes.	2 mes.	3 mes.	6 mes.
RP-HPLC						
% de pureza	5	DMSO puro				99,7
	5	Agua/DMSO 0,5%				99,6
	25	DMSO puro	99,7	99,1	98,4	97,0
	25	Agua/DMSO 0,5%	99,5	99,2	98,3	96,6
	40	DMSO puro	96,5	90,2	83,7	71,1
	40	Agua/DMSO 0,5%	96,3	90,3	83,8	71,7

Método	Temp (°C)	Sistema	% de pureza			
			1 mes.	2 mes.	3 mes.	6 mes.
SCX-HPLC						
% de pureza	5	DMSO puro				99,5
	5	Agua/DMSO 0,5%				99,4

(continuación)

Método	Temp (°C)	Sistema	% de pureza			
			1 mes.	2 mes.	3 mes.	6 mes.
SCX-HPLC						
	25	DMSO puro	99,0	98,4	96,7	95,8
	25	Agua/DMSO 0,5%	99,2	98,3	97,9	95,8
	40	DMSO puro	95,8	90,2	85,0	72,2
	40	Agua/DMSO 0,5%	96,0	90,7	85,7	72,5

Método	Temp (°C)	Sistema	% de pureza				
			0,25 mes.	0,5 mes.	1 mes.	2 mes.	3 mes.
SCX-HPLC							
% de pureza	25	Tampón acuoso (pH 4,5)	99,2	98,5	97,1	94,8	90,4
	40	Tampón acuoso (pH 4,5)	92,2	87,9			

5 La exendina-4 se puede formular en DMSO y en DMSO con un 0,5% de agua. En pocas palabras, tal como se ha demostrado anteriormente, no existe ninguna diferencia sustancial debido a la presencia de un 0,5% de agua, que puede introducirse debido a la humedad residual de un péptido liofilizado. La pureza de la exendina-4 se reduce aproximadamente en un 28% con respecto a los valores iniciales después de 6 meses a 40°C. A 25°C, la pureza se reduce aproximadamente de un 3 a un 4% durante el mismo período (véase figuras 1 y 2). Sin embargo, a 5°C, la pureza se mantiene entre un 0,4 y un 0,6% con respecto a los valores iniciales. Esencialmente, no se observan cambios en la potencia. En comparación con la estabilidad del producto acuoso (figuras 3 y 4), es evidente que la estabilidad de la exendina-4 mejora en el disolvente polar aprótico DMSO.

15 **Ejemplo 2: Estabilidad de la exendina-4 en sistemas de disolventes polares apróticos**

15 Como se demuestra en el ejemplo 1, el DMSO proporciona una estabilidad mejorada a la exendina-4. También se puede evaluar la estabilidad de la exendina-4 en otros disolventes polares apróticos y en sistemas de codisolvente basados en DMSO. La evaluación se puede basar en la estabilidad de muestras de exendina-4 almacenadas a 5, 25 y 37°C durante un máximo de 6 meses. Además del dimetilsulfóxido (DMSO), los ejemplos de disolventes para la evaluación incluyen agua, dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF), N-metil-pirrolidona (NMP), carbonato de propileno y acetato de etilo.

25 Se pueden utilizar tres métodos de HPLC para analizar las muestras: HPLC de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) para determinar la potencia (mg/ml) y dos métodos para evaluar la pureza (%), un método de intercambio catiónico fuerte (SCX) y un método de fase inversa (RP). Dichos métodos se pueden adaptar según sea necesario para obtener un análisis de muestras apropiado. Además, el contenido de agua de las muestras se puede evaluar mediante un procedimiento analítico adecuado de Karl Fischer.

30 Por ejemplo, se puede utilizar SEC-HPLC para medir la potencia de una solución de exendina-4 por ensayo estándar externo, sobre la base del contenido total de péptido de la solución que contiene exendina a 214 nm, en comparación con soluciones de calidad estándar de referencia. La identidad, la potencia y la fuerza de marcación de la exendina-4 se pueden establecer mediante la comparación de los tiempos de retención de los picos de exendina-4 de la solución de muestra y las soluciones estándar de referencia.

35 Disolventes no acuosos: Se puede evaluar la estabilidad de la exendina-4 en disolventes polares apróticos con puntos de congelación inferiores a 0°C. Son disolventes representativos que satisfacen estos criterios: DMA, DMF, NMP, carbonato de propileno y acetato de etilo.

40 Codisolvente. Sistema con agua: El agua en una proporción de aproximadamente el 8% p/p disminuye el punto de congelación del DMSO a justo por debajo de 0°C. Para proporcionar una protección adicional frente a la congelación, se puede evaluar una solución acuosa al 10% p/p. La adición de agua al sistema ofrece la posibilidad de reacciones de hidrólisis con el péptido. Sin embargo, se establece una interacción fuerte entre las moléculas de DMSO y de agua que puede atenuar las reacciones de hidrólisis. De hecho, para un 10% p/p de agua (fracción molar de DMSO de 0,67), se ha demostrado que la mezcla se caracteriza por la presencia de complejos DMSO:agua en una relación de 1:1. Tan sólo cuando la fracción molar de agua es superior a 0,6, las moléculas de agua pura son frecuentes. Además, las reacciones de hidrólisis aumentan a pH extremos, lo que indica que la catálisis tiene lugar a través de los iones hidronio e hidroxilo. La ionización de muchos compuestos, incluida el agua, se inhibe en DMSO, y el pKa del agua se desplaza de 15,75 para el agua pura a 32 en solución de DMSO. Estos valores corresponden a una reducción de los iones hidronio e hidroxilo en una solución neutra de más de 1×10^8 M. Por lo tanto, resulta deseable evaluar la estabilidad de la exendina-4 en este sistema.

Sistemas de codisolvente con disolventes polares apróticos: También se pueden utilizar otros disolventes para disminuir el punto de congelación del DMSO. De este modo, se pueden preparar sistemas binarios de disolvente utilizando DMSO y DMA, DMF, NMP, carbonato de propileno o acetato de etilo. Dichas mezclas se pueden diseñar

con el fin de aprovechar una mejor solubilidad y/o estabilidad proporcionada por una mezcla rica en DMSO. Primeramente, se pueden determinar las cantidades apropiadas del disolvente no acuoso. A continuación se puede evaluar la solubilidad de la exendina-4 mediante inspección visual en la mezcla codisolvente. Los sistemas que proporcionan una estabilidad suficiente de la exendina-4 y no se congelan en el frigorífico se pueden seleccionar para el análisis de estabilidad.

DMSO: Se puede preparar una solución de exendina-4 de 10 mg/ml en DMSO para su utilización como control.

Muchos de los disolventes no acuosos de interés son muy higroscópicos y pueden absorber agua cuando se exponen a la atmósfera. Además, las muestras se pueden separar en recipientes parcialmente llenos. De este modo, se puede utilizar una bolsa o caja con guantes llena de nitrógeno para preparar la solución madre y las muestras individuales. Las muestras se pueden colocar en la bolsa con guantes. La bolsa con guantes se puede burbujear con nitrógeno y sellarse. Las muestras se pueden preparar mediante la adición de aproximadamente 110 mg de exendina-4 en un vial de vidrio. A continuación, se puede agregar la mezcla de disolventes o codisolventes no acuosos para alcanzar una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml. Las muestras (aproximadamente 0,5 ml) se pueden separar en viales de 2 ml que se tapan y se sellan a presión. Las muestras se pueden almacenar a 5°C, 25°C y 37°C en cajas de cartón para protegerlas de la luz. A continuación, las muestras se pueden someter a ensayo al cabo de un mes, dos meses, tres meses y seis meses, como se desee.

Las muestras representativas de exendina-4 se preparan de una manera similar a la descrita anteriormente. Más particularmente, se preparan las siguientes muestras:

Formulación nº	Sistema disolvente	Mezcla - % p/p de disolvente en DMSO
1	Acetato de etilo/DMSO	33% p/p
2	Carbonato de propileno/DMSO	30% p/p
3	N-metilpirrolidona/DMSO	26% p/p
4	Dimetilformamida/DMSO	25% p/p
5	Dimetilacetamida/DMSO	30% p/p
6	Agua/DMSO	10% p/p
7	N-metilpirrolidona	(puro)
8	Dimetilformamida	(puro)
9	Dimetilacetamida	(puro)
10	DMSO	(puro)

Los resultados de las muestras representativas se proporcionan en las siguientes tablas.

PORCENTAJE DE VALOR INICIAL									
MESES									
Pureza por SCX		37°C				25°C			
Form. No.	Inicial	1	2	3	6	1	2	3	6
1	98,8	64,0	32,9			85,1	71,3		
2	97,1	16,4				51,3			
3	97,6	88,0	77,7	62,0	52,1	95,8	90,0	83,3	78,1
4	98,6	19,8				60,5			
5	99,0	86,4	72,2	53,5	40,9	94,0	89,6	86,9	77,6
6	99,1	94,3	88,7	79,6	73,6	97,3	97,8	96,8	91,3
7	81,4	30,7				52,1			
8	92,9	5,6				28,1			
9	98,3	65,7	28,7			87,3	76,7		
10	99,1	95,9	93,1	85,4	74,7	99,0	97,8	96,1	92,3

PORCENTAJE DE VALOR INICIAL									
MESES									
Pureza por RP		37°C				25°C			
Form. No.	Inicial	1	2	3	6	1	2	3	6
1	97,0	62,2	32,8			86,8	73,2		
2	95,4	14,2				49,6			
3	96,2	90,4	77,2	62,5	47,3	95,5	91,3	83,7	76,5
4	96,5	20,1				64,1			
5	97,5	88,3	74,1	50,8	39,0	96,2	92,5	86,8	78,7
6	97,7	97,7	94,7	87,3	81,5	99,5	98,7	97,6	96,9
7	86,6	32,5				59,9			

(continuación)

PORCENTAJE DE VALOR INICIAL									
MESES									
Pureza por RP		37°C				25°C			
Form. No.	Inicial	1	2	3	6	1	2	3	6
8	91,8	0,4				26,5			
9	96,8	68,4	28,6			89,4	80,7		
10	97,4	98,0	94,1	83,1	74,3	99,5	98,9	97,4	95,5

PORCENTAJE DE VALOR INICIAL									
MESES									
Potencia por SEC		37°C				25°C			
Form. No.	Inicial	1	2	3	6	1	2	3	6
1	9,05	107,0	107,5			103,3	102,5		
2	8,24	99,0				98,4			
3	8,52	100,1	103,0	96,3	91,6	99,9	101,2	98,6	97,7
4	8,80	103,2				99,5			
5	9,06	100,8	100,8	99,3	101,5	100,5	100,0	100,2	98,9
6	9,48	101,6	102,1	102,2	99,2	98,5	100,7	100,9	99,6
7	9,57	98,2				98,7			
8	9,27	103,3				102,2			
9	9,02	102,2	100,5			102,2	103,7		
10	9,42	102,7	102,1	102,7	98,9	100,9	101,9	101,5	101,9

5

Ejemplo 3: Aumento de la estabilidad de los complejos de péptido-zinc en sistemas de disolventes polares apróticos

Como medio para aumentar la estabilidad de una incretina o mimético de incretina terapéuticamente activos, tal como exendina-3, exendina-4 o análogos o derivados de las mismas, se puede complejar el péptido con un ión metálico, tal como el catión de zinc. Sin ánimo de quedar limitados por la teoría, se cree que la complejación o quelación con el catión de zinc, por ejemplo, aumenta la estabilidad de una incretina o péptido mimético de incretina terapéuticamente activos reduciendo su solubilidad, lo que reduce la susceptibilidad del péptido a la degradación por solvólisis. De este modo, se espera que la suspensión posterior del complejo péptido-zinc en un disolvente polar aprótico mejore aún más su estabilidad en comparación con la disolución del péptido no complejado en el disolvente. Se puede evaluar la estabilidad de un complejo exendina-4-zinc en suspensión con DMSO, DMSO con un 0,5% de agua añadida, en otros disolventes polares apróticos (por ejemplo, agua, DMA, DMF, NMP, carbonato de propileno o acetato de etilo), en sistemas de codisolventes basados en DMSO, tal como se han descrito anteriormente, o en disolventes apolares apróticos (por ejemplo, aceite de silicona o dimeticona). La evaluación se puede basar en la estabilidad de muestras de exendina-4-zinc almacenadas a 5, 25, 37 y/o 40°C durante un máximo de 6 meses. Además, se puede evaluar la estabilidad de la exendina-4 en DMSO en comparación con los tampones acuosos a un pH comprendido entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 7,5.

Se pueden utilizar tres métodos de HPLC para analizar las muestras: HPLC de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) para determinar la potencia (mg/ml) y dos métodos para evaluar la pureza (%), un método de intercambio catiónico fuerte (SCX) y un método de fase inversa (RP). Dichos métodos se pueden adaptar según sea necesario para obtener un análisis de muestras apropiado. Además, el contenido de agua de las muestras se puede evaluar mediante un procedimiento analítico adecuado de Karl Fischer.

Por ejemplo, se puede utilizar SEC-HPLC para medir la potencia de una solución de exendina-4-zinc por ensayo estándar externo, sobre la base del contenido total de péptido de la solución que contiene exendina-4-zinc a 214 nm, en comparación con soluciones de calidad estándar de referencia. La identidad, la potencia y la fuerza de marcación del complejo exendina-4-zinc se pueden establecer mediante la comparación de los tiempos de retención de los picos de exendina-4-zinc de la solución de muestra y las soluciones estándar de referencia.

Formación del complejo: Se mezcla exendina-4 con zinc y el complejo exendina-4-zinc precipita a un pH neutro. En un vaso de precipitados de 20 ml, se prepara una solución nítida que contiene aproximadamente 10,7 mg/ml de exendina-4 mediante la disolución de 0,1074 gramos de exendina-4 y 1,16158 gramos de acetato de zinc dihidrato en 10 ml de agua desionizada. El pH inicial de esta solución es de 5,73. Cuando el pH de la solución se ajusta a 7,00 mediante la adición gota a gota de una solución de hidróxido de potasio al 45% p/p, la solución se vuelve turbia y se observa un precipitado blanco (complejo exendina-4-zinc). A continuación, se transfieren 5 ml de esta suspensión turbia de complejo exendina-4-zinc a un tubo de centrifuga de 15 ml, se centrifuga a 4.000 rpm durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante.

5 Dispersión en DMSO: Los complejos péptido-metal se pueden suspender en disolventes polares apróticos, tales como DMSO, agua/DMSO al 0,5% o agua/DMSO al 10%, para formar una suspensión en la que el complejo péptido-metal puede presentar una estabilidad mejorada. Por ejemplo, al complejo exendina-4-zinc precipitado tal como se ha descrito anteriormente, se añaden 2 ml de DMSO y los contenidos se mezclan por inversión. Se obtiene una dispersión de un precipitado blanco visible a simple vista que contiene aproximadamente 25 mg/ml de exendina-4 en DMSO, lo que indica que el complejo exendina-4-zinc no se disuelve en DMSO. Se puede evaluar adicionalmente la estabilidad de esta dispersión a diferentes temperaturas y a lo largo de distintos periodos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulación farmacéutica estable que comprende una incretina o un péptido mimético de incretina y al menos un disolvente aprótico polar y al menos un excipiente estabilizante seleccionado de entre el grupo constituido por: agua, un azúcar y un alcohol de azúcar.
- 10 2. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 1, en la que la incretina o péptido mimético de incretina se selecciona de entre el grupo constituido por: un péptido de péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) y un péptido de exendina o un análogo de los mismos.
- 15 3. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 2, en la que el péptido de exendina es exendina-4 o un análogo del mismo.
- 20 4. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 1, en la que el excipiente estabilizante es agua.
- 25 5. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho al menos un disolvente polar aprótico se selecciona de entre el grupo constituido por: dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetato de etilo, n-metil pirrolidona (NMP), dimetilacetamida (DMA), carbonato de propileno y mezclas de los mismos.
- 30 6. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 5, en la que dicho al menos un disolvente polar aprótico es DMSO.
- 35 7. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 1, en la que dicho al menos un excipiente estabilizante es capaz de disminuir el punto de congelación del disolvente polar aprótico a aproximadamente 0°C o menos.
- 40 8. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 7, en la que el disolvente polar aprótico es DMSO, en la que dicho al menos un excipiente estabilizante capaz de disminuir el punto de congelación del disolvente polar aprótico es agua, y el agua y el DMSO forman un codisolvente que comprende un 10% p/p de agua (fracción molar de DMSO de 0,67).
- 45 9. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho al menos un excipiente estabilizante es capaz de estabilizar la conformación de la incretina o péptido mimético de incretina.
- 50 10. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el péptido de incretina comprende uno o más residuos aminoácidos seleccionados de entre el grupo constituido por: asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, metionina, cisteína, triptófano, tirosina, histidina, lisina y arginina, y el disolvente polar aprótico y/o dicho al menos un excipiente estabilizante estabiliza el residuo de aminoácido frente a la degradación.
- 55 11. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 10, en la que el residuo aminoácido se selecciona de entre el grupo constituido por: asparagina y glutamina, y el disolvente polar aprótico y/o dicho al menos un excipiente estabilizante estabiliza el residuo aminoácido frente a la degradación reduciendo o impidiendo la formación de imida cíclica u otros productos de degradación de los residuos aminoácidos de asparagina y glutamina.
- 60 12. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además al menos un disolvente prótico no acuoso.
- 65 13. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 12, en la que el disolvente prótico no acuoso se selecciona de entre el grupo constituido por: polietilenglicol (PEG), propilenglicol (PG), polivinilpirrolidona (PVP), metoxipropilenglicol (MPEG), glicerol, glicofurol y mezclas de los mismos.
14. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además un tampón.
15. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 14, en la que el tampón es un tampón de acetato.
16. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende además un antioxidante.
17. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 16, en la que el antioxidante se selecciona de entre el grupo constituido por: ácido ascórbico, cisteína, metionina, monotioglicerol, tiosulfato sódico, sulfitos, BHT, BHA, palmitato de ascorbilo, galato de propilo y vitamina E.
18. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende además un quelante.

19. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 18, en la que el quelante se selecciona al menos de entre el grupo constituido por EDTA, ácido tartárico y sus sales, glicerina y ácido cítrico y sus sales.
- 5 20. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que comprende además un disolvente no acuoso.
21. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 20, en la que el disolvente no acuoso se selecciona al menos de entre el grupo constituido por etanol, glicerina, propilenglicol y polietilenglicol.
- 10 22. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que comprende además un conservante.
23. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 22, en la que el conservante se selecciona al menos de entre el grupo constituido por alcoholes bencílicos, parabenos metílicos y parabenos propílicos.
- 15 24. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 23, que comprende además un polímero termosensible que no se gelifica a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 37°C.
- 20 25. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en la que dicha incretina o mimético de incretina está complejada con zinc, formando un complejo de zinc.
- 25 26. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 25, en la que el complejo de zinc comprende un GLP-1 o un análogo del mismo.
27. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 25, en la que el complejo de zinc comprende una exendina o un análogo de la misma.
- 30 28. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 25, en la que el complejo de zinc comprende un complejo de zinc de exendina-4.
29. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en la que el complejo de zinc se dispersa en el disolvente.
- 35 30. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en la que la formulación tiene una viscosidad comprendida entre aproximadamente 0,25 cP y aproximadamente 1.000.000 cP.
- 40 31. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en la que la formulación tiene un pH igual o inferior al pI de la incretina o mimético de incretina.
32. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en la que la formulación tiene un pH comprendido entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 7,5.
- 45 33. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en la que la formulación tiene un pH comprendido entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,0.
34. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 33, en la que la formulación tiene un pH de aproximadamente 4,5.
- 50 35. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, en la que la incretina o mimético de incretina está presente en una concentración comprendida entre aproximadamente 0,1 mg/ml y el límite de solubilidad del péptido de incretina en la formulación.
- 55 36. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, en la que la incretina o mimético de incretina está presente en una concentración comprendida entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml.
- 60 37. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, en la que dicha formulación, además, se liofiliza.
38. Formulación farmacéutica estable según la reivindicación 37, en la que la formulación liofilizada se reconstituye antes de su utilización.
- 65 39. Formulación farmacéutica estable según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 38, en la que el péptido se liofiliza a partir de una solución con un pH comprendido entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6.

- 5 40. Formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39, para su utilización en el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno, en la que dicha enfermedad, afección o trastorno comprende intolerancia a la glucosa o diabetes mellitus.
- 10 41. Uso de la formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno que se puede tratar, aliviar o prevenir mediante la administración de una incretina o mimético de incretina, en la que la enfermedad, afección o trastorno comprende intolerancia a la glucosa o diabetes mellitus.
42. Uso según la reivindicación 41, en el que la enfermedad, afección o trastorno es diabetes mellitus.
43. Uso según la reivindicación 42, en el que la enfermedad, afección o trastorno es diabetes de tipo 2.
- 15 44. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 43, en el que la administración es una administración parenteral.
45. Uso según la reivindicación 44, en el que dicha administración es una administración continua.
- 20 46. Uso según la reivindicación 45, en el que dicha administración se lleva a cabo mediante la utilización de un dispositivo de administración de fármacos por bombeo implantable o fijable.
47. Uso según la reivindicación 45 ó 46, en el que dicha administración es continua durante un período comprendido entre aproximadamente 1 mes y aproximadamente 6 meses.
- 25 48. Uso según la reivindicación 44, en el que dicha administración se lleva a cabo mediante la utilización de un dispositivo de inyección de tipo bolígrafo.
- 30 49. Uso de un excipiente estabilizante para mejorar la estabilidad de una formulación farmacéutica que comprende una incretina o péptido mimético de incretina y al menos un disolvente polar aprótico, en el que dicho excipiente estabilizante se selecciona de entre el grupo constituido por: agua, un azúcar y un alcohol de azúcar.
50. Uso según la reivindicación 49, en el que dicho al menos un excipiente estabilizante es capaz de disminuir el punto de congelación del disolvente polar aprótico a aproximadamente 0°C o menos.

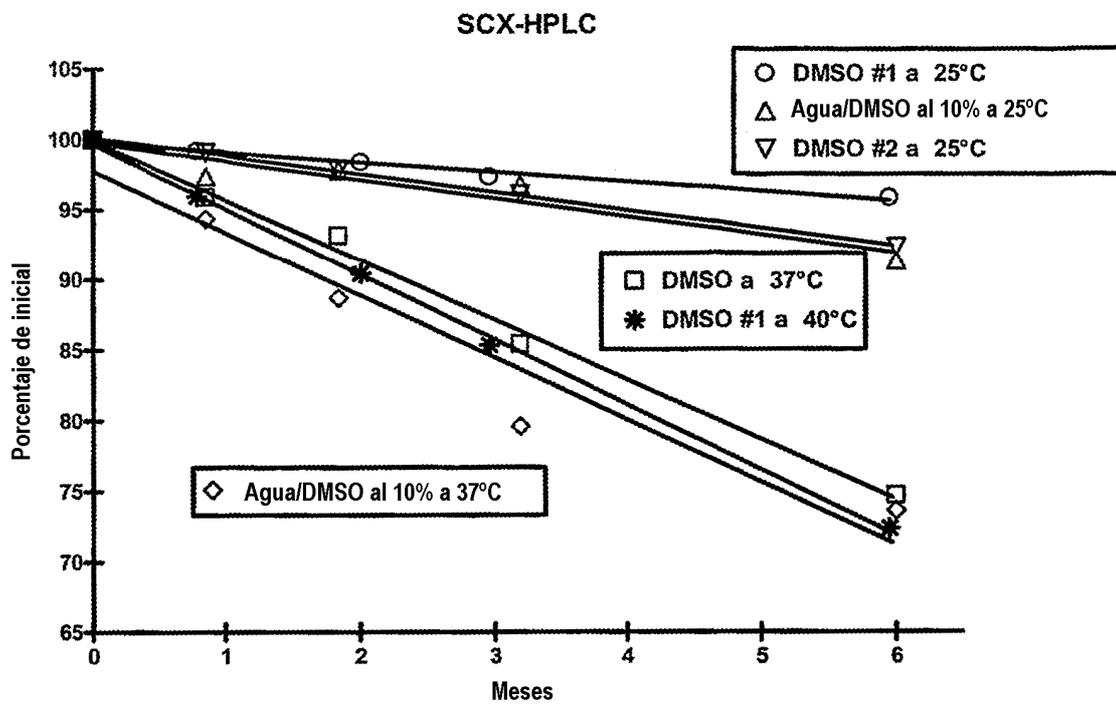


FIG 1

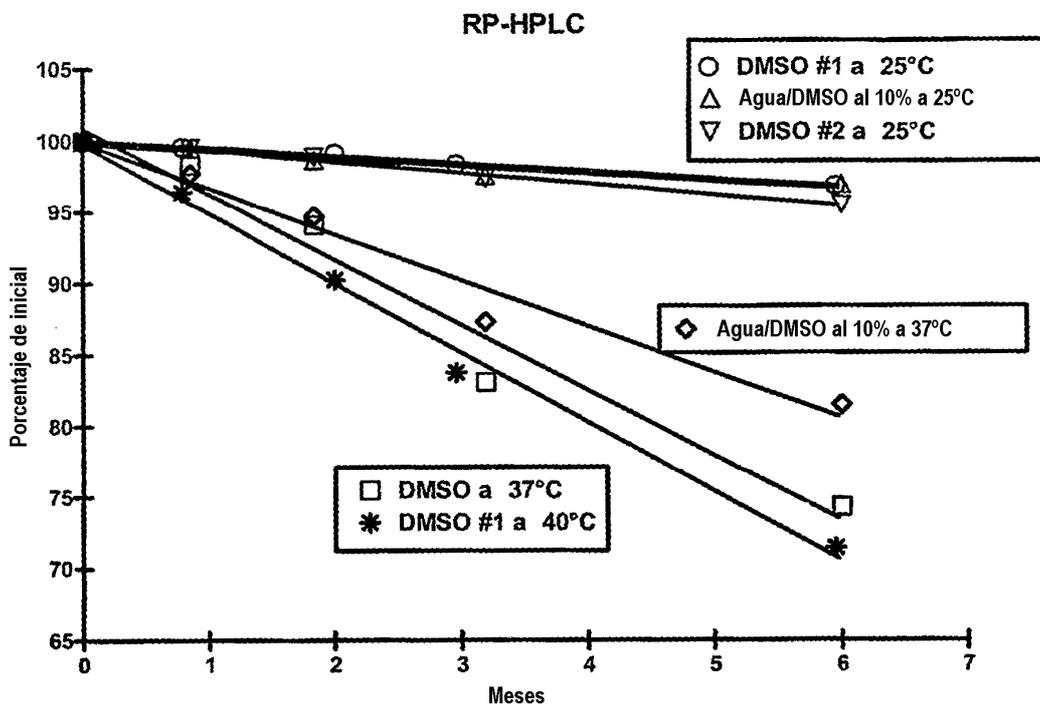


FIG 2

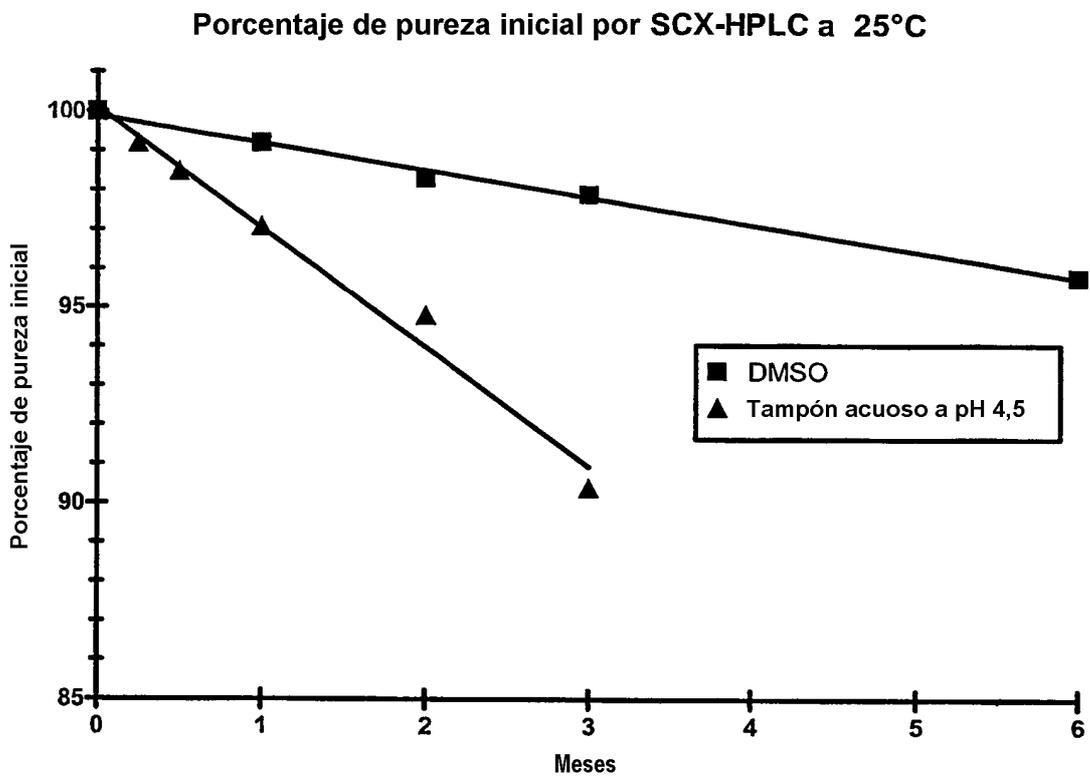


FIG 3

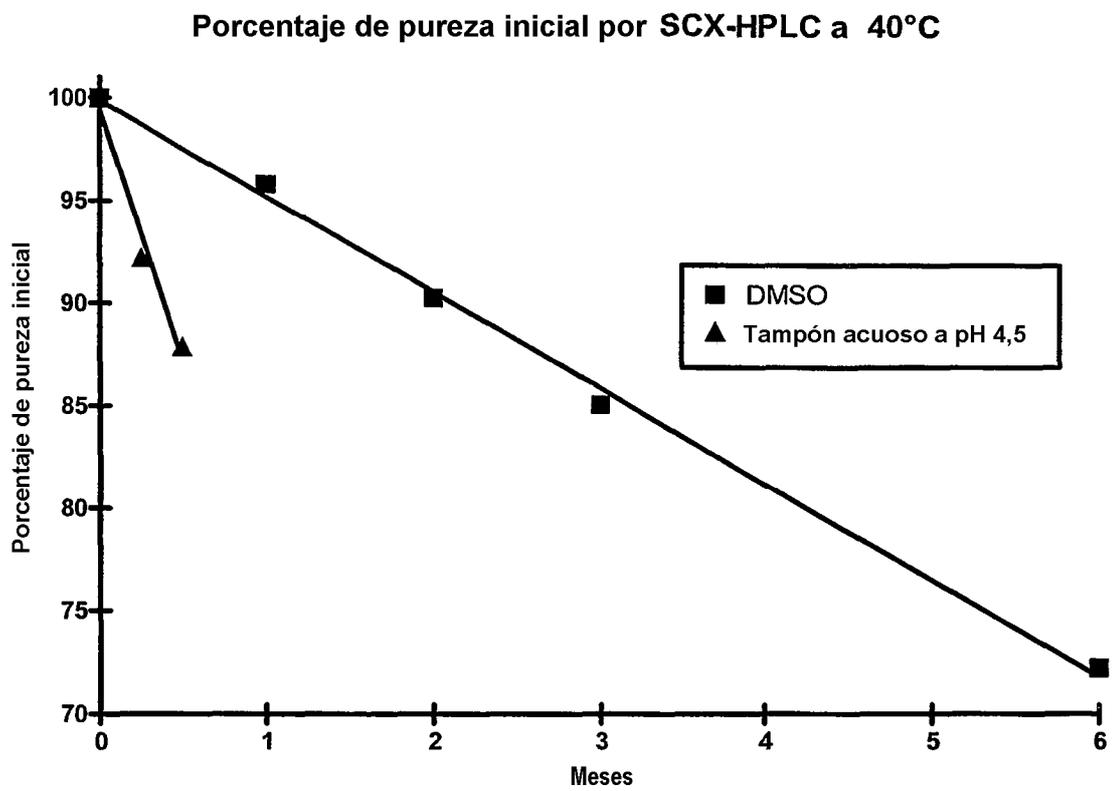


FIG 4