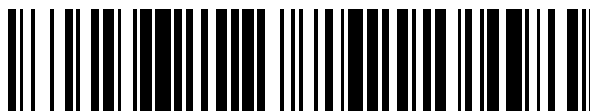


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 056**

51 Int. Cl.:
A61K 38/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04735873 .4**
96 Fecha de presentación: **03.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1633391**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

54 Título: **COMPOSICIONES PEPTÍDICAS FARMACÉUTICAS ESTABILIZADAS.**

30 Prioridad:
03.06.2003 DK 200300820
05.06.2003 US 476282 P
19.01.2004 DK 200400063
22.01.2004 US 538487 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.02.2012

73 Titular/es:
NOVO NORDISK A/S
Novo Allé
2880 Bagsvård, DK

72 Inventor/es:
JUUL-MORTENSEN, Claus

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

ES 2 375 056 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

Composiciones peptídicas farmacéuticas estabilizadas

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al campo de composiciones farmacéuticas.

Más específicamente la invención está relacionada con métodos para preparar composiciones farmacéuticas estables de péptido GLP-1 que se obtienen a partir de un producto de péptido en masa que se seca a un pH por encima del pH neutro.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] Los péptidos terapéuticos son muy usados en la práctica médica.

Se requiere que las composiciones farmacéuticas de tales péptidos terapéuticos tengan un tiempo de conservación de varios años para ser adecuadas para un uso común.

No obstante, las composiciones peptídicas son intrínsecamente inestables debido a la sensibilidad hacia la degradación física y química.

20 La degradación química implica cambio de enlaces covalentes, tal como oxidación, hidrólisis, racemización o reticulación.

La degradación física implica cambios conformacionales relativos a la estructura nativa del péptido, es decir, estructura secundaria y terciaria, tal como agregación, precipitación o adsorción a superficies.

25 [0003] El glucagón ha sido usado durante décadas en la práctica médica en la diabetes y diferentes péptidos similares al glucagón están siendo desarrollados para varias indicaciones terapéuticas.

El gen de preproglucagón codifica glucagón así como péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y péptido similar al glucagón tipo 2 (GLP-2).

30 Análogos y derivados de GLP-1 así como el péptido de lagarto homólogo, exendin-4, están siendo desarrollados para el tratamiento de la hiperglucemia dentro de la diabetes de tipo 2.

Los GLP-2 son potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

No obstante, todos estos péptidos que abarcan 29-39 aminoácidos tienen un alto grado de homología y comparten varias propiedades, sobre todo su tendencia a agregar y la formación de fibrillas insolubles.

35 Esta propiedad parece abarcar una transición de una conformación de hélice alfa predominante a hojas beta (Blundell T.L. (1983) The conformation of glucagon. En: Lefébvre P.J. (Ed) Glucagon I. Springer Verlag, págs 37-55, Senderoff R.I. *et al.*, J. Pharm. Sci. 87 (1998)183-189, WO 01/55213).

La agregación de los péptidos similares al glucagón se ve principalmente cuando soluciones de los péptidos son revueltas o agitadas, en la interfaz entre la solución y la fase gaseosa (aire), y en contacto con superficies hidrofóbicas tal como Teflon®.

40 [0004] Así, varios excipientes deben ser frecuentemente añadidos a composiciones farmacéuticas de los péptidos similares al glucagón para mejorar su estabilidad.

El tiempo de conservación de formulaciones parenterales líquidas de estos péptidos debe ser de al menos un año, preferiblemente más tiempo.

45 El periodo en uso donde el producto se puede transportar y agitar diariamente a temperatura ambiente debería ser preferiblemente de varias semanas.

Así, existe una necesidad de composiciones farmacéuticas de péptidos similares al glucagón que tengan una estabilidad mejorada.

50 [0005] El documento WO00/37098 divulga una formulación estable en almacenamiento de molécula GLP-1, un conservante, un modificador de tonicidad, con un pH que es de 8.2 a 8.8.

[0006] El documento US2003/0060412 divulga un método de preparación de un compuesto de GLP-1 que es soluble en solución acuosa a pH 7.4.

55 [0007] Se ha descubierto de forma inesperada que productos de péptido en masa preparados mediante el secado de una solución o la suspensión de un producto peptídico GLP-1 con un pH por encima de 8.0 aumentó la estabilidad de las composiciones farmacéuticas obtenidas a partir de estos productos de péptido en masa.

60 DEFINICIONES

[0008] A continuación se ofrece una definición detallada de los términos usados en la especificación.

5 [0009] El término "cantidad eficaz", como se utiliza en este caso, significa una dosis que es suficiente para ser eficaz para el tratamiento del paciente en comparación a ningún tratamiento.

[0010] El término "reconstituido", como se utiliza en este caso en referencia a una composición farmacéutica, significa una composición acuosa que ha sido formada mediante la adición de agua o una solución acuosa apropiada a un material sólido que comprende el ingrediente farmacéutico activo.

10 Composiciones farmacéuticas para la reconstitución son aplicadas cuando no se pueden producir una composición líquida con una vida útil aceptable.

Un ejemplo de una composición farmacéutica reconstituida es la solución que resulta al añadir agua o una solución acuosa apropiada a una composición liofilizada.

15 La solución es frecuentemente para la administración parenteral y, por tanto, el agua para inyección o cualquier otro solvente apropiado se usan para reconstituir el material sólido.

El término "tratamiento de una enfermedad", como se utiliza en este caso, significa el tratamiento médico y cuidado de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, condición o trastorno.

El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, condición o trastorno.

20 El tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, condición o trastorno así como para aliviar los síntomas o complicaciones asociados a la enfermedad, condición o trastorno.

[0011] El término "péptido similar al glucagón", como se utiliza en este caso, se refiere a los péptidos homólogos derivados del gen de preproglucagón, exendinas y análogos y derivados de los mismos.

25 Los péptidos derivado a partir del gen de preproglucagón es el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1),

[0012] El péptido GLP-1 tiene la siguiente secuencia:

| | | | | | | | | |
|-------|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 |
| GLP-1 | | | | | | | | |
| | H | A | E | G | T | F | T | S |
| | D | V | S | S | L | E | G | Q |
| | A | A | K | E | F | I | A | W |
| | L | V | K | G | R | G | | |

30 [0013] El término "análogo", como se utiliza, en este caso en referencia a un péptido significa un péptido modificado donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido han sido sustituidos por otros residuos de aminoácidos y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido eliminados del péptido y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido añadidos al péptido.

Tal adición o deleción de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el extremo N-terminal del péptido y/o en el extremo C-terminal del péptido.

35 Dos sistemas simples y diferentes son frecuentemente usados para describir análogos: para ejemplo Arg³⁴-GLP-1(7-37) o K34R-GLP-1(7-37) designa un análogo de GLP-1 donde residuos de aminoácidos en la posición 1-6 han sido eliminados, y la lisina presente naturalmente en la posición 34 ha sido sustituida con arginina (abreviatura estándar de única letra para aminoácidos usada según la nomenclatura IUPAC-IUB).

40 [0014] El término "derivado", como se utiliza en este caso, en relación con un péptido primario significa una proteína primaria químicamente modificada o un derivado análogo, donde al menos un sustituyente no está presente en la proteína primaria o un análogo de la misma, es decir, una proteína primaria que ha sido modificada de manera covalente.

Modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos de acilo, ésteres, pegilaciones y similares.

45 Unos ejemplos de un derivado de GLP-1 (7-37) es Arg³⁴, Lys²⁶(N-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1 (7-37).

[0015] El término "péptido GLP-1", como se utiliza en este caso, significa GLP-1 (7-37), un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1.

50 [0016] El término "producto en masa" o "producto peptídico en masa", como se utiliza en este caso, significa el producto de péptido purificado a usar para la producción de una composición farmacéutica.

Así, el producto en masa es normalmente obtenido como el producto de la purificación final, secado o paso de preparación.

El producto en masa puede ser cristales, precipitado, solución o suspensión.

55 El producto en masa es también conocido en la técnica como la sustancia farmacológica.

[0017] El término "punto isoelectrico" como se utiliza en este caso significa el valor de pH donde la carga neta total de una macromolécula tal como un péptido es cero.

En péptidos puede haber muchos grupos cargados, y en el punto isoelectrico la suma de todas estas cargas es cero, es decir, el número de cargas negativas equilibra el número de cargas positivas.

5 A un pH por encima del punto isoelectrico la carga neta total del péptido será negativa, mientras que a valores de pH por debajo del punto isoelectrico la carga neta total del péptido será positiva.

El punto isoelectrico de un péptido se puede determinar mediante isoelectroenfoco o se puede estimar a partir de la secuencia del péptido mediante algoritmos computacionales conocidos en la técnica.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0018] En un aspecto la presente invención se refiere a método para aumentar la vida útil de una composición farmacéutica según la reivindicación 1.

15

[0019] En una forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 8.1 a 12.0.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 8.1 a 11.5.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 8.1 a 11.0.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 8.1 a 10.7.

20

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 8.5 a 12.0.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 8.5 a 11.5.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 8.5 a 11.0.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 8.5 a 10.7.

25

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 8.5 a 10.5.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 9.0 a 12.5.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 9.0 a 12.0.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 9.0 a 11.5.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 9.0 a 11.0.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 9.0 a 10.7.

30

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 9.0 a 10.5.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 8.5 a 10.0.

En otra forma de realización el péptido similar al glucagón ha sido secado a un pH en el intervalo de 8.5 a 9.6.

[0020] En otra forma de realización de la invención el producto de péptido en masa ha sido producido mediante secado de una solución o suspensión del péptido similar al glucagón con un pH en la gama especificada durante un periodo en el intervalo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 24 horas, y a una temperatura superior a la temperatura de nucleación (bien como nucleación homogénea o heterogénea) del péptido en masa a aproximadamente 25 °C.

35

[0021] En otra forma de realización de la invención el producto de péptido en masa ha sido producido mediante secado de una solución o suspensión del péptido similar al glucagón con un pH en la gama especificada para un periodo en el intervalo de 1 minuto a 30 minutos, y a una temperatura de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 25 °C.

40

[0022] Debe entenderse que la invención se puede realizar a través de varias combinaciones de valores de pH, temperatura y tiempo.

45

Estas tres variables se puede combinar en las gamas anteriormente mencionadas.

No obstante, mientras que una o dos de las variables pueden ser adecuadamente elegidas en el tramo alto de los intervalos, el resto de una o dos variables son típicamente inferiores.

Por ejemplo, si un valor alto de pH tal como pH 10 se usa es preferiblemente combinado con una temperatura inferior tal como aproximadamente 5-10 °C y/o un tiempo corto tal como menos de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 6 horas.

50

Combinaciones útiles de variables son: pH 10.0 a 5 °C durante aproximadamente 3 horas, pH 10.0 a 15 °C durante aproximadamente 1 hora, o pH 11.0 a 5 °C durante aproximadamente 1 hora.

[0023] El desarrollo de cristales de hielo, tanto como un único cristal o como un policristal, es el proceso de nucleación inicial, sólo se produce hielo con la congelación de agua o una solución acuosa a presiones bajas, tanto en la congelación rápida como en la congelación lenta.

55

La nucleación de soluciones puede ocurrir de dos modos, dependiendo de la concentración del soluto y de la temperatura.

Si una solución saturada es enfriada, entonces se puede hacer no sólo superenfriada con respecto a la fase de hielo, sino también sobresaturado con respecto al soluto.

60

En ausencia de núcleos de congelación apropiados, la solución puede superenfriarse.

Así la temperatura usada durante el tratamiento del péptido a pH más alto debe ser mantenida por encima de la temperatura de nucleación del péptido a las condiciones predominantes.

La temperatura de nucleación es conocida por el experto en la técnica, y puede ser rutinariamente determinada para el péptido pertinente mediante experimentos a temperaturas diferentes.

5

[0024] Varias tecnologías de secado se pueden aplicar para el secado de la solución o suspensión del péptido similar al glucagón.

El secado por liofilización es el modo convencional de secar péptidos farmacéuticos.

Otras tecnologías de secado son el secado por atomización y secado al vacío.

10 En una forma de realización preferida el péptido similar al glucagón se seca mediante liofilización.

[0025] En otra forma de realización la composición farmacéutica es una solución.

[0026] En otra forma de realización la composición farmacéutica es una suspensión.

15

[0027] En otra forma de realización la composición farmacéutica es un sólido, por ejemplo una formulación liofilizada a la cual el médico o el paciente adiciona el solvente antes de su uso.

El solvente usado para la reconstitución puede ser agua para inyección u otro solvente adecuado.

20

[0028] En otra forma de realización el pH de la composición farmacéutica es inferior al pH de la solución o suspensión del péptido en masa secada.

[0029] En otra forma de realización el pH de la composición farmacéutica es al menos 0.8 unidades de pH inferior que el pH de la solución o suspensión del péptido en masa secada.

25

[0030] En otra forma de realización el pH de dicha composición farmacéutica es al menos 1.5 unidades de pH inferior al pH de la solución o suspensión del péptido en masa secada.

[0031] Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un compuesto activo o una sal derivada junto con uno o más excipientes farmacéuticos tal como tampón, conservante, un agente de isotonicidad y/o un estabilizador.

30

Composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido similar al glucagón según la presente invención se pueden administrar parenteralmente a pacientes que necesiten tal tratamiento.

La administración parenteral se puede realizar mediante inyección subcutánea, inyección intramuscular, o inyección intravenosa mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma.

35

La administración alternativa se puede realizar mediante infusión, por ejemplo, usando una bomba de infusión.

[0032] En una forma de realización el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 7.0 a pH 8.0, preferiblemente de pH 7.2 a pH 7.8.

En otra forma de realización el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 7.2 a pH 7.6.

40

En otra forma de realización el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 7.4 a pH 7.8.

[0033] En otra forma de realización el punto isoeléctrico de dicho péptido similar al glucagón es de 3.0 a 7.0, preferiblemente de 4.0 a 6.0.

45

[0034] En una forma de realización dicho péptido similar al glucagón es glucagón, un análogo de glucagón o un derivado.

[0035] En otra forma de realización dicho péptido similar al glucagón es oxintomodulina.

50

[0036] En una forma de realización dicho péptido similar al glucagón es GLP-1, o, un derivado de GLP-1.

[0037] En otra forma de realización dicho GLP-1 análogo es seleccionado del grupo que consiste en Gly⁸-GLP-1(7-36)-amida, Gly⁸-GLP-1(7-37), Val⁸-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸-GLP-1(7-37), Val⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Asp²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Lys²²-GLP-1(7-37), Val¹⁸Arg²²-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸Arg²²-GLP-1 (7-37), Val⁸His²²-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸His²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁹Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵-GLP-1 (7-37), Val⁸Tyr¹⁶Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Leu¹⁶Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Tyr¹⁸Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1 (7-37), Val⁸Glu²²Ile³³-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Ile³³-GLP-1 (7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵-GLP-1 (7-37), y sus análogos.

55

60

- [0038] En otra forma de realización dicho derivado de un análogo de GLP-1 es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(NC^α-hexadecanoil))) - GLP-1 (7-37).
- 5 [0039] Métodos para la preparación de GLP-1, análogos del mismo, así como derivados de GLP-1 se pueden encontrar en, por ejemplo, los documentos WO 99/43706, WO 00/55119, WO 00/34331 y WO 03/18516.
- [0040] En otra forma de realización el péptido similar al glucagón es un péptido GLP-1 y la composición farmacéutica o una composición reconstituida de la misma tiene una concentración de péptido tipo glucagón de 0,1 mg/mL a 50mg/mL, de 0,1 mg/mL a 25mg/mL, de 1 mg/mL a 25mg/mL, de 1 mg/mL a 10mg/mL, o de 3mg/ml a 8mg/ml.
- 10 [0041] Tampones adecuados en composiciones farmacéuticas son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero de forma no limitativa, ortofosfato, TRIS, glicina, N-glicilglicina, citrato sodio acetato, carbonato de sodio, glicilglicina, histidina, lisina, arginina, fosfato sódico, y citrato sódico o mezclas derivadas.
En una forma de realización la composición farmacéutica comprende un tampón que es Tris.
15 En otra forma de realización la composición farmacéutica comprende un tampón que es Bicina.
- [0042] Conservantes en composiciones farmacéuticas son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, pero de forma no limitativa, fenol, m-cresol, metil p-hidroxibenzoato, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol benzílico, clorobutanol, y thiomersal, o mezclas derivadas.
- 20 [0043] En una forma de realización la composición farmacéutica comprende un agente de isotonicidad.
- [0044] En otra forma de realización la composición farmacéutica comprende un agente de isotonicidad que es cloruro de sodio, xilitol, manitol, sorbitol, glicerol, glucosa, maltosa, sacarosa, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina, dimetil sulfona, polietilenglicol, propilenoglicol o mezclas derivadas.
- 25 [0045] En otra forma de realización de la presente invención la composición farmacéutica comprende además un estabilizador.
- [0046] En otra forma de realización de la invención la formulación comprende además un estabilizador seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos moleculares bajos.
- 30 [0047] En otra forma de realización de la invención el estabilizador se selecciona de polietilenglicol (p. ej. PEG 3350), polialcohol vinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, sales diferentes (p. ej. cloruro sódico), L-glicina, L-histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas derivadas.
35 Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.
En una forma de realización preferida de la invención el estabilizador es seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, imidazol y arginina.
- [0048] En otra forma de realización de la presente invención el estabilizador es seleccionado del grupo que consiste en PEG 3350, polialcohol vinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, cloruro sódico, L-glicina, L-histidina, imidazol, L-arginina, L-lisina, L-isoleucina, ácido L-aspártico, L-triptófano, L-treonina y mezclas derivadas.
- 40 [0049] En otra forma de realización de la invención la formulación comprende además un agente quelante.
En otra forma de realización de la invención el agente quelante se selecciona de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico, y ácido aspártico, y mezclas derivadas.
45 Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.
- [0050] En otra forma de realización de la presente invención la composición farmacéutica comprende además un tensioactivo.
50 En otra forma de realización de la invención el tensioactivo se selecciona de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitán, poloxámeros, tal como 188 y 407, ésteres de ácido graso de sorbitán de polioxietileno, derivados de polioxietileno tal como derivados alcoxilados y alquilados (tweens, por ejemplo Tween-20, o Tween-80), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de los mismos, glicerol, ácido cólico o derivados de lo mismo, lecitinas, alcoholes y fosfolípidos, glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas, serina de fosfatidilo), gliceroglicolípidos (galactopiransoide), esfingofosfolípidos (esfingomiélin), y esfingoglicolípidos (ceramidas; gangliósidos), DSS (sodio de docusato, registro CAS n° [577-11-7]), calcio de docusato, registro CAS n° [128-49-4]), potasio de docusato, registro CAS n° [7491-09-0]), SDS (sulfato de dodecilo de sodio o lauril sulfato de sodio), dipalmitoil ácido fosfatídico, caprilato de sodio, ácidos biliares y sales derivadas y glicina o conjugados de taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, deoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-Hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato,
- 60

aniónico (arilsulfonatos alquilo) tensioactivos monovalentes, palmitoil lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (p. ej. 1-acil-sn-glicero-3-ésteres de fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina), alquilo, alcoxilo (éster alquílico), alcoxi (éster de alquilo)- derivados de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo lauroilo y derivados de miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, que es colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y el positivamente cargado DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, surfactivos bipolares (p. ej. N-alkuil-N, N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, dodecilsulfocolina, miristoilo lisofosfatidilcolina, lisolecitina de huevo de gallina), tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternarias) (p. ej. bromuro de cetil trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio) tensioactivos no iónicos, copolímeros en bloque de óxido de polietileno/óxido de polipropileno (Pluronic/Tetronic, Triton X-100, dodecilo β -D-glucopiranosida) o tensioactivos poliméricos (Tween-40; Tween-80 Brij-35), derivados de ácido fusídico (p. ej. taurodihidrofusidato de sodio etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales derivadas C6-C12 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N^α-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, derivados N^α-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un ácido neutral o ácido de amino, derivado N^α-acilado derivado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutral y dos aminoácidos cargados, o el tensioactivo puede ser seleccionado del grupo de derivados de imidazolina, o mezclas derivadas. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

[0051] El uso de excipientes tal como conservantes, agentes isotónicos y tensioactivos en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a edición, 1995.

[0052] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido similar al glucagón, un tampón aceptable farmacéuticamente y un conservante aceptable farmacéuticamente, caracterizada por el hecho de que dicha composición farmacéutica se prepara mediante un método según la presente invención.

[0053] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica con un pH entre aproximadamente 7.2 a aproximadamente 7.8, comprendiendo dicha composición un péptido similar al glucagón y al menos un excipiente aceptable farmacéuticamente, donde dicha composición es estable en almacenamiento como medida por un incremento de menos del doble de fluorescencia en una prueba de Tioflavina T del péptido similar al glucagón contenido en dicha composición después del almacenamiento de la composición durante un mes a 37°C.

[0054] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido, un tampón aceptable farmacéuticamente y un conservante aceptable farmacéuticamente, caracterizado por el hecho de que dicha composición farmacéutica se prepara mediante un método según la presente invención.

[0055] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de hiperglicemia comprendiendo la administración parenteral de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica según la presente invención.

[0056] El péptido primario de tipo glucagón se puede producir mediante síntesis peptídica, por ejemplo, síntesis peptídica de fase sólida usando química t-Boc o F-Moc u otras técnicas bien establecidas. El péptido primario de tipo glucagón puede también ser producido mediante un método que comprende el cultivo de una célula huésped con una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y capaz de expresar el polipéptido en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones que permiten la expresión del péptido, después de lo cual el péptido resultante es recuperado del cultivo.

[0057] El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huéspedes, tal como medios mínimos o complejos con suplementos apropiados. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej. en catálogos de la American Type Culture Collection). El péptido producido por las células puede luego ser recuperado del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo la separación de las células huéspedes del medio por centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado mediante una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similares, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.

[0058] La secuencia de ADN que codifica el péptido primario puede adecuadamente ser de origen genómico o de ADNc, por ejemplo obtenido preparando un banco genómico o de ADNc y selección de secuencias de ADN que codifican la totalidad o parte del péptido mediante hibridización usando sondas de oligonucleótidos sintéticos conforme a técnicas estándar (ver, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989).

La secuencia de ADN que codifica el péptido puede también ser preparada sintéticamente mediante métodos estándares establecidos, por ejemplo, el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, *EMBO Journal* 3 (1984), 801 - 805.

5 La secuencia de ADN puede también ser preparada por reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en el documento US 4,683,202 o en Saiki *et al.*, *Science* 239 (1988), 487 - 491.

10 [0059] La secuencia de ADN se puede insertar en cualquier vector que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección de vector dependerá a menudo de la célula huésped en que la que se ha de introducir.

Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido.

15 Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y es replicado con el cromosoma(s) en el que se ha integrado.

[0060] El vector es preferiblemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica el péptido es operativamente enlazado a segmentos adicionales necesarios para la transcripción del ADN, tal como un promotor.

20 El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se pueden derivar de genes que codifican proteínas bien heterólogo o bien homólogo a la célula huésped.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el péptido de la invención en una variedad de células huéspedes son bien conocidos en la técnica, cf. por ejemplo Sambrook *et al.*, *supra*.

25 [0061] La secuencia de ADN que codifica el péptido puede también, si es necesario, ser operativamente conectada a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras transcripcionales, y secuencias potenciadoras traduccionales.

El vector recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de ADN permitiendo al vector replicar en la célula huésped en cuestión.

30 [0062] El vector puede también comprender una etiqueta seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped o uno que confiere resistencia a un fármaco, por ejemplo ampicilina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

35 [0063] Para dirigir un péptido primario de la presente invención en la vía secretora de las células huéspedes, una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, preprosecuencia o presecuencia) se puede proporcionar en el vector recombinante.

La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido en el marco de lectura correcto.

Secuencias señal secretoras se sitúan comúnmente en el extremo 5' a la secuencia de ADN que codifica el péptido.

40 La secuencia señal secretora puede ser aquella normalmente asociada al péptido o puede ser de un gen que codifica otra proteína segregada.

45 [0064] Los procedimientos usados para enlazar las secuencias de ADN que codifican el péptido actual, el promotor y opcionalmente el terminador y/o secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados conteniendo la información necesaria para la replicación, son conocidos para personas expertas en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*).

[0065] La célula huésped en la que la secuencia de ADN o el vector recombinante es introducido puede ser cualquier célula que es capaz de producir el presente péptido e incluye bacterias, levadura, hongos y células eucariotas mayores.

50 Ejemplos de células huéspedes adecuadas bien conocidas y usadas en la técnica son, sin limitación, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, o líneas celulares mamíferas BHK o CHO.

[0066] La presente invención es también ilustrada por los siguientes ejemplos que, no obstante, no han de ser interpretados como una limitación del alcance de protección.

55 Las características descritas en la descripción precedente y en los siguientes ejemplos puede, tanto separadamente como en cualquier combinación de las mismas, ser material para la realización de la invención en formas diversas de la misma.

EJEMPLOS

60 [0067] En lo sucesivo "Compuesto 1" tiene como objetivo significar: Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1 (7-

37).

[0068] Antes de la liofilización de la solución o suspensión de la sustancia farmacológica de un péptido, el pH se ajusta al pH objetivo.

5 Después formulaciones farmacéuticas de liofilización fueron preparadas según el procedimiento general 1 y 2.

Procedimiento general 1

10 [0069] Conservante, agente isotónico y tampón fueron disueltos en agua y el pH ajustado a 7.4. En lo sucesivo, el péptido liofilizado fue disuelto mientras se agitó lentamente.
El pH fue ajustado a 7.4 usando hidróxido sódico y/o ácido clorhídrico.
Finalmente, la formulación fue filtrada a través de un filtro de 0,22 µm.

15 Procedimiento general 2

[0070] Conservante, agente isotónico y tampón fueron disueltos en agua y el pH ajustado a 7.4. El péptido fue disuelto en agua mientras se agitó lentamente.
20 Las dos soluciones fueron mezcladas y el pH ajustado a 7.4 usando hidróxido sódico y/o ácido clorhídrico.
Finalmente, la formulación fue filtrada a través de un filtro de 0,22 µm.

[0071] La estabilidad física de las formulaciones se evalúa mediante la prueba de Tioflavina T.
La estabilidad física de las diferentes formulaciones se caracteriza por su tendencia a formar fibrillas.
25 Un método para determinar la presencia de fibrillas es la prueba de Tioflavina T.
El tinte de tiazol histológico Tioflavina T (ThT) se usa como un indicador de formación de fibrilla amiloide.
El método se basa en las características fluorescentes de ThT.
En presencia de fibrillas de amiloide, la fluorescencia de ThT muestra un máximo de excitación a 450 nm y emisión mejorada a 482 nm.
30 Se ha mostrado que la intensidad de fluorescencia de ThT es lineal con el aumento en la concentración de fibrilla amiloide.
La estabilidad física de las formulaciones se evalúa mediante la prueba de ThT después de que el almacenamiento de la formulación sea cartuchos de vidrio llenos al máximo durante varios períodos de tiempo.

35 **Resultados de fórmula farmacéutica fabricada con sustancia farmacológica ajustada a un pH por encima del pH neutro (> 8) antes de la liofilización**

[0072] Los resultados de prueba de ThT al inicio (t = 0) y después de 1 mes de almacenamiento a 37°C pueden ser vistos en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de prueba de ThT (unidades de fluorescencia) después 1 semana o 1 mes de análisis de estabilidad acelerada.

| pH de Compuesto 1 antes de liofilización | Concentración de Compuesto 1 en la fórmula farmacéutica | pH de formulación farmacéutica | Unidades de fluorescencia después de almacenamiento a 37°C | | |
|--|---|--------------------------------|--|----------------|-----------|
| | | | T = 0 semana | T = 1 semana | T = 1 mes |
| 8,0 | 3 mg/ml | 7,4 | 6 | no determinado | 28 |
| 9,5 | 3 mg/ml | 7,4 | 6 | no determinado | 7 |
| 11,5 | 3 mg/ml | 7,4 | 6 | no determinado | 7 |
| 8,0 | 6,25 mg/ml | 7,4 | 13 | 20 | 37 |
| 9,5 | 6,25 mg/ml | 7,4 | 14 | 13 | 13 |
| 11,5 | 6,25 mg/ml | 7,4 | 14 | 13 | 14 |

45 [0073] Se puede observar que las formulaciones farmacéuticas fabricadas con el Compuesto 1 ajustado a pH 9.5 y 11.5 antes de la liofilización es físicamente más estable después 1 semana y 1 mes de almacenamiento a 37°C (ya que no se ha observado ningún aumento en el ThT) en comparación con la fórmula farmacéutica fabricada con el Compuesto 1 ajustado a pH 8.0 antes la liofilización (donde se ha observado un aumento en el ThT).

REIVINDICACIONES

1. Método para aumentar la vida útil de una composición farmacéutica que comprende un péptido GLP-1, un tampón aceptable farmacéuticamente seleccionado de ortofosfato, TRIS, glicina, N-glicilglicina, citrato sodio acetato, carbonato de sodio, glicil-glicina, histidina, lisina, arginina, fosfato sódico y citrato sódico o mezclas derivadas, y un conservante aceptable farmacéuticamente seleccionado de fenol, m-cresol, metil p-hidroxibenzoato, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol benzílico, clorobutanol, y thiomersal, o mezclas derivadas, **caracterizado por el hecho de que** dicha composición farmacéutica es preparada a partir de un producto de péptido en masa que ha sido producido por secado de una solución o suspensión de dicho péptido similar al glucagón con un pH en el intervalo de 8.1 a 12.5, donde el pH de dicha composición farmacéutica es al menos 0.8 unidades de pH inferior al pH de la solución o suspensión del péptido en masa secada.
2. Método según la reivindicación 1, donde dicho pH está en el intervalo de 8.5 a 10.5.
3. Método según la reivindicación 1, donde dicho pH está en el intervalo de 9.0 a 10.5.
4. Método según la reivindicación 1, donde dicho pH está en el intervalo de 8.5 a 9.6.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicho producto de péptido en masa ha sido producido mediante el secado de una solución o suspensión de dicho péptido GLP-1 con un pH en la gama especificada durante un periodo en el intervalo de 10 minutos a 5 horas, y a una temperatura de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 25 °C.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho producto de péptido en masa ha sido producido por secado de una solución o suspensión de dicho péptido GLP-1 con un pH en la gama especificada durante un periodo en el intervalo de 1 minuto a 30 minutos, y a una temperatura de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 25 °C.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicho secado es una liofilización.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dicha composición farmacéutica es una solución.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dicha composición farmacéutica es una suspensión.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dicha composición farmacéutica es un sólido.
11. Método según la reivindicación 10, donde dicha composición farmacéutica debe ser reconstituida con agua para inyección u otro solvente adecuado.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el pH de dicha composición farmacéutica es inferior al pH de la solución o suspensión del péptido en masa secada.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el pH de dicha composición farmacéutica es al menos 1.5 unidades de pH inferior al pH de la solución o suspensión del péptido en masa secada.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición farmacéutica es conveniente para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 7.0 a pH 8.0, preferiblemente de pH 7.2 a pH 7.8.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el punto isoeléctrico de dicho péptido similar al glucagón es de 3.0 a 7.0, preferiblemente de 4.0 a 6.0.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde dicho péptido GLP-1 es seleccionado del grupo que consiste en GLP-1 (7-37), Gly⁸-GLP-1 (7-36)-amida, Gly⁸-GLP-1 (7-37), Val⁸-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸-GLP-1 (7-37), Val⁸Asp²²-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸Asp²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Lys²²-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸Lys²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Arg²²-GLP-1(7-37), Val⁸His²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸His²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁹Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵-GLP-1 (7-37),

Val⁸Tyr¹⁶Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Leu¹⁶Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Tyr¹⁸Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Ile³³-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1 (7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵-GLP-1 (7-37), y péptidos químicamente modificados de los mismos que han sido modificados de manera covalente con amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos de acilo, ésteres o pegilaciones.

5

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde dicho péptido GLP-1 es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))²⁶-GLP-1 (7-37).

10 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde la concentración de dicho péptido similar al glucagón en la composición farmacéutica es de 0,1 mg/mL a 50mg/mL, de 0,1 mg/mL a 25mg/mL, de 1 mg/mL a 25mg/mL, de 1 mg/mL a 10mg/mL, o de 3mg/ml a 8mg/ml.

15 20. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un agente de isotonicidad.

21. Método según la reivindicación 20, donde dicho agente de isotonicidad es cloruro sódico, xilitol, manitol, sorbitol, glicerol, glucosa, maltosa, sacarosa, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina, dimetil sulfona, polietilenoglicol, propilenoglicol o mezclas derivadas.

20 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un tensioactivo.