

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 096**

51 Int. Cl.:

C07K 1/36 (2006.01)

C07D 241/08 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2000 E 00945009 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **17.04.2002 EP 1196430**

54 Título: **Purificación y estabilización de agentes farmacéuticos a base de péptidos y proteínas**

30 Prioridad:

29.06.1999 US 141433 P

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

08.02.2013

73 Titular/es:

**MANKIND CORPORATION (100.0%)
28903 NORTH AVENUE PAINE
VALENCIA CA 91355, US**

72 Inventor/es:

**STEINER, SOLOMON S.;
WOODS, RODNEY J. y
SULNER, JOSEPH W.**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 096 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

Purificación y estabilización de agentes farmacéuticos a base de péptidos y proteínas

Antecedentes de la Invención

[0001] La presente invención está en general en el campo de las formulaciones farmacéuticas, y más particularmente relacionada con los métodos y composiciones para purificar y estabilizar péptidos y proteínas, tales como insulina, que son utilizados en aplicaciones farmacéuticas.

[0002] En una persona normal, las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans producen insulina, necesitada por el cuerpo para el metabolismo de la glucosa, como respuesta a un incremento de la concentración de glucosa en la sangre. La insulina metaboliza la glucosa entrante y para temporalmente la transformación por el hígado de glucógeno y lípidos a glucosa permitiendo de ese modo al cuerpo soportar actividad metabólica entre comidas. El diabético Tipo I, sin embargo, tiene una capacidad reducida o total incapacidad de producir insulina debido a la destrucción de células β y necesita reemplazar la insulina por medio de inyecciones diarias o una bomba de insulina. Pero, más común que el Tipo I de diabetes, es el Tipo II de diabetes, que se caracteriza por resistencia a la insulina y función pancreática crecientemente dañada de las células β . El Los diabéticos Tipo II pueden todavía producir insulina, pero pueden también requerir terapia de sustitución de insulina.

[0003] Los diabéticos de Tipo II normalmente presentan una respuesta retrasada a incrementos en los niveles de glucosa en sangre. Mientras las personas normales normalmente liberan insulina en 2-3 minutos tras el consumo de alimentos, los diabéticos de Tipo II pueden no segregar insulina endógena durante varias horas tras el consumo. Como resultado, la producción de glucosa endógena continúa tras el consumo (Pfeiffer, Am. J. Med, 70:579-88 (1981)), y el paciente experimenta hiperglucemia debido a niveles elevados de glucosa en sangre.

[0004] La pérdida de secreción de insulina provocada por glucosa es una de las perturbaciones más tempranas de la función de las células β (Cerasi et al., Diabetes, 21:224-34 (1972); Polonsky et al., N. Engl. J. Med, 318:1231-39 (1988)), pero las causas y el grado de disfunción de las células β cell se desconocen en la mayoría de los casos. Mientras que los factores genéticos juegan un papel importante, (Leahy, Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes, 2:300-06 (1995)), algunas perturbaciones de la secreción de insulina parecen ser adquiridas y pueden ser al menos parcialmente reversibles a través mediante un control óptimo de la glucosa. El control óptimo de la glucosa por medio de la terapia de insulina tras una comida puede llevar a una significativa mejora de la liberación natural de insulina provocada por glucosa requiriendo tanto una respuesta normal del tejido a la insulina administrada como un aumento brusco en las concentraciones de insulina en suero. Por lo tanto, el desafío presentado en el tratamiento de los diabéticos de Tipo II en la primera fase, aquéllos que no tienen pérdida excesiva de función de las células β , es restaurar la liberación de insulina después de las comidas.

[0005] La mayoría de los diabéticos Tipo II de fase temprana son tratados con agentes orales, pero con poco éxito. Las inyecciones subcutáneas de la insulina son también raramente eficaces para proporcionar insulina a los diabéticos Tipo II y pueden realmente empeorar la acción de la insulina a causa de un comienzo de acción retrasado, variable, y superficial. Se ha demostrado, sin embargo, que si la insulina es administrada intravenosamente con una comida, los diabéticos Tipo II de fase temprana experimentan el paro de glucogénesis hepática y presentan un control aumentado de la glucosa fisiológica. Además, sus niveles de ácidos grasos libres caen a un ritmo más rápido que sin la terapia de insulina. Mientras que posiblemente es eficaz en tratar diabetes de Tipo II, la administración intravenosa de insulina no es una solución razonable, ya que no es seguro o factible para los pacientes administrar intravenosamente insulina en cada comida.

[0006] La insulina, un polipéptido con un peso molecular nominal de 6,000 Daltons, ha sido producida tradicionalmente procesando páncreas de cerdo y vaca para aislar el producto natural. Más recientemente, sin embargo, se ha usado tecnología recombinante para producir insulina humana in vitro. La insulina humana natural y recombinante en solución acuosa está en una configuración hexamérica, es decir, seis moléculas de insulina recombinante se asocian no covalentemente en un compendio hexamérico cuando se disuelve en agua en presencia de iones de cinc. La insulina hexamérica no se absorbe rápidamente. Con el fin de que la insulina humana sea absorbida dentro de la circulación del paciente, la forma hexamérica debe primero asociarse en formas diméricas y/o monoméricas antes de que la sustancia pueda moverse dentro del flujo sanguíneo. El retraso en la absorción requiere que la insulina humana recombinante sea administrada aproximadamente una media hora antes de la hora de la comida con el fin de producir el nivel terapéutico sanguíneo de insulina, lo cual puede ser agobiante para pacientes a los que se requiere que anticipen los momentos en que comerán. Para superar este retraso, se han desarrollado análogos de la insulina recombinante humana, tales como HUMALOG™, que rápidamente se disocian en una forma virtualmente monomérica totalmente tras administración subcutánea. Estudios clínicos han demostrado que HUMALOG™ es absorbido cuantitativamente más rápido que la insulina humana recombinante tras administración subcutánea. Ver, por ejemplo, la Patente estadounidense nº 5,547,929 a Anderson Jr., et al.

[0007] En un esfuerzo de evitar las desventajas asociadas con la administración por inyección y para acelerar la absorción, se ha desarrollado la administración de análogos monoméricos de insulina via pulmonar. Por ejemplo, la Patente US nº 5.888.477 a Gonda, et al. revela hacer a un paciente inhalar una fórmula en aerosol de insulina

monomérica para depositar partículas de insulina en el tejido del pulmón del paciente. Sin embargo, la fórmula monomérica es inestable y rápidamente pierde actividad, mientras que la tasa de captación permanece inalterada. **[0008]** Mientras que sería deseable producir insulina rápidamente absorbible derivada de fuentes naturales, la transformación de la forma hexamérica en la forma monomérica, tal como eliminando el cinc del complejo, da una insulina que es inestable y tiene una vida útil indeseablemente corta. Por tanto sería deseable proporcionar formar monoméricas de insulina, manteniendo al tiempo su estabilidad en la ausencia de cinc. También sería ventajoso proporcionar a los pacientes diabéticos con composiciones de insulina monomérica que sean adecuadas para la administración pulmonar, proporcionen rápida absorción, y que puedan ser producidas en formulaciones listas para usar que tengan un tiempo de caducidad comercialmente útil.

[0009] Estos problemas con impurezas, iones de metal que afectan a la estabilidad o biodisponibilidad, suceden con muchas otras proteínas y péptidos.

[0010] La patente US nº 6.071.497 a Steiner, et al. revela sistemas de administración de fármacos en micropartículas en los cuales el fármaco es encapsulado en micropartículas de dicetopiperazina que son estables a un pH de 6.4 o menos e inestables a pH de más de 6.4, o que son estables tanto con pH ácido como básico, pero que son inestables a pH entre alrededor de 6.4 y 8. La patente no describe composiciones de insulina monomérica que sean adecuadas para administración pulmonar, proporcionen rápida absorción, y que puedan ser producidas en formulaciones listas para usar que tengan un tiempo de caducidad comercialmente util.

[0011] Sería por tanto ventajoso desarrollar composiciones alternativas de administración de insulina para Diabéticos Tipo II que proporcionen elevación más rápida de los niveles sanguíneos de insulina y sean fácilmente administradas para asegurar la conformidad del paciente. Sería deseable aplicar las composiciones y métodos de administración a otros agentes biológicamente activos.

[0012] Es por tanto un objeto de la presente invención proporcionar métodos mejorados para purificar péptidos y proteínas, especialmente en la preparación de composiciones adecuadas para administración pulmonar.

[0013] Es otro objeto de la presente invención proporcionar composiciones estables de péptidos monoméricos adecuadas para administración pulmonar.

[0014] Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar métodos y composiciones para el transporte facilitado de insulina y otros péptidos biológicamente activos a través de membranas biológicas.

[0015] Es otro objeto de la presente invención proporcionar métodos y composiciones para la absorción mejorada de insulina u otros péptidos biológicamente activos en el flujo sanguíneo.

[0016] Es otro objeto más de la presente invención proporcionar métodos y composiciones para la absorción mejorada de insulina u otros péptidos biológicamente activos en el flujo sanguíneo caracterizados por facilitar la administración.

Resumen de la Invención

[0017] Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente solicitud proporciona un método para purificar un péptido que comprende proporcionar micropartículas preformadas de una dicetopiperazina en una suspensión; proporcionar una composición de péptido conteniendo una impureza a eliminar; formar un complejo del péptido con las micropartículas preformadas de la dicetopiperazina; y eliminar esencialmente toda impureza del complejo lavando con un nodisolvente para el péptido y la dicetopiperazina.

[0018] En un segundo aspecto, la presente solicitud proporciona una composición para la administración de un péptido a un paciente, comprendiendo un péptido complejoado con una dicetopiperazina; en donde la composición se obtiene combinando el péptido con micropartículas preformadas de la dicetopiperazina para formar un revestimiento del péptido sobre las micropartículas y el péptido es una hormona, citoquina u otro péptido, antígeno o vacuna inmunomodulatorio

[0019] En un tercer aspecto, la presente solicitud proporciona el uso de micropartículas formadas de un complejo de (i) un agente activo y (ii) una cantidad eficaz de dicetopiperazina, en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de dicetopiperazina con el agente activo, en la elaboración de un medicamento para tratamiento terapéutico o profiláctico por administración del agente activo a una membrana mucosal en donde el agente activo es un péptido terapéutico, profiláctico o diagnóstico. El agente activo puede, por ejemplo, ser una molécula cargada. La composición puede, por ejemplo, ser administrada a los pulmones por medio de inhalación.

[0020] En un cuarto aspecto, la presente solicitud proporciona el uso de micropartículas de una dicetopiperazina en la que la insulina monomérica o dimérica está complejada con la dicetopiperazina, en la que la insulina está sustancialmente libre de cinc, y en la que el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de dicetopiperazina con insulina, en la elaboración de un medicamento para administrar insulina a un paciente en necesidad de la misma. La composición puede, por ejemplo, estar en forma de un polvo seco para administración a los pulmones por inhalación.

- [0021] En un quinto aspecto, la presente solicitud proporciona micropartículas formadas de un complejo de (i) un agente activo y (ii) una cantidad eficaz de una dicetopiperazina, en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de dicetopiperazina con el agente activo, para uso en medicina en donde el agente activo es una hormona de péptido, citoquina u otro péptido, antígeno o vacuna inmunomodulatorio.
- 5 [0022] En un sexto aspecto, la presente solicitud proporciona micropartículas de una dicetopiperazina en las que se compleja insulina monomérica o dimérica, y en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de la dicetopiperazina con insulina, para uso en medicina. En una realización del sexto aspecto, las micropartículas son para uso en el tratamiento de diabetes de Tipo II.
- 10 [0023] En un séptimo aspecto, la presente solicitud proporciona un método para estabilizar un péptido comprendiendo: proporcionar micropartículas preformadas de una dicetopiperazina en una suspensión; proporcionar un péptido; y formar un complejo del péptido con una cantidad eficaz de las micropartículas preformadas de dicetopiperazina para estabilizar el péptido.
- [0024] En un octavo aspecto, la presente solicitud proporciona una composición para la administración de un péptido, en donde el péptido es estabilizado conforme al método del séptimo aspecto.
- 15 [0025] En un noveno aspecto, la presente solicitud proporciona una formulación para uso en medicina comprendiendo insulina complejada con una dicetopiperazina y en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de la dicetopiperazina con la insulina, que, cuando se administra a un paciente en una cantidad eficaz, produce una concentración máxima de insulina en sangre en el paciente, lo que simula una respuesta normal al alimento, en donde la formulación está en una forma adecuada para administración por inhalación u oralmente. En una realización del aspecto noveno, la formulación puede ser administrada por inhalación y opcionalmente la dicetopiperazina es dicetopiperazina de fumarilo y la concentración máxima de insulina en sangre se alcanza en unos 13 minutos tras la administración, o la concentración máxima de insulina en sangre se alcanza en un periodo de tiempo entre 3 a 10 minutos tras la administración.
- 20 [0026] En un décimo aspecto, la presente solicitud proporciona una formulación para uso en medicina comprendiendo un péptido complejado con una dicetopiperazina combinando micropartículas preformadas de la dicetopiperazina con el péptido; cuya fórmula, cuando es administrada a un paciente por administración pulmonar, proporciona concentración máxima en sangre en 2 a 10 minutos tras la administración, y en donde el péptido es insulina, calcitonina de salmón, hormona paratiroidea 1-34, octreotida, leuprolida o péptido RSV.
- 25 [0027] En un décimoprimer aspecto, la presente solicitud proporciona el uso de la composición comprendiendo insulina complejada con una dicetopiperazina y en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de la dicetopiperazina con la insulina, para la elaboración de un medicamento para tratar diabetes de Tipo II el cual, cuando es administrado a un paciente en una cantidad eficaz produce una concentración máxima de insulina en sangre en el paciente, que simula una respuesta normal al alimento, en donde la formulación está en una forma adecuada para la administración por inhalación u oralmente.
- 30 [0028] En un décimosegundo aspecto, la presente solicitud proporciona un método de complejar un péptido con una dicetopiperazina comprendiendo: (i) proporcionar una suspensión de micropartículas de dicetopiperazina, (ii) proporcionar una solución del péptido, y (iii) combinar la suspensión y la solución para formar un complejo del péptido y las micropartículas de dicetopiperazina. El método puede además comprender eliminar el disolvente por liofilización.
- 35 [0029] En un décimo tercer aspecto, la presente solicitud proporciona el uso de una formulación de administración para insulina monomérica o dimérica comprendiendo una cantidad eficaz de insulina complejada con un derivado de dicetopiperazina, en donde la formulación de administración se prepara complejando insulina con micropartículas del derivado de dicetopiperazina, y en donde las micropartículas liberan insulina monomérica o dimérica por disociación, en la elaboración de un medicamento para administrar insulina monomérica o dimérica a un paciente en necesidad
- 40 de la misma.
- 45 [0030] Por lo tanto, la presente solicitud describe métodos para puificar péptidos formando un complejo del péptido con micropartículas preformadas de una dicetopiperazina en una suspensión para facilitar la eliminación de una o más impurezas, es decir, componentes indeseables, del péptido. En una realización preferida, un péptido, tal como insulina conteniendo una o más impurezas, por ejemplo, iones de cinc, se recubre por micropartículas de dicetopiperazina para formar un precipitado de péptido/dicetopiperazina/impureza, que se lava luego con un disolvente para que la impureza sea eliminada, que es un nodisolvente para la dicetopiperazina y un nodisolvente para el péptido. Alternativamente, la impureza puede ser eliminada utilizando agentes complejantes para selectivamente acomplejar con y desplazar las impurezas, por ejemplo, tal como por diálisis.
- 50 [0031] Se describen aquí formulaciones y métodos para el transporte mejorado de agentes activos a través de membranas biológicas, dando lugar, por ejemplo, a un rápido incremento en la concentración del agente en sangre. Las formulaciones incluyen micropartículas formadas de (i) un agente activo, el cual puede ser cargado o neutro, y (ii) un mejorador de transporte que enmascara la carga del agente y/o que forma uniones de hidrógeno con la membrana biológica diana con el fin de facilitar el transporte. En una realización preferida, la insulina es
- 55

administrada por administración pulmonar de micropartículas comprendiendo dicetopiperazina de fumarilo e insulina en su forma biológicamente activa. La carga sobre la molécula de insulina es enmascarada por hidrógeno uniéndola a la dicetopiperazina, permitiendo así a la insulina pasar a través de la membrana diana. Este método de administrar insulina da lugar a un rápido incremento de la concentración de insulina en sangre que es comparable con el incremento resultante de administración intravenosa.

Breve Descripción de los Dibujos

[0032]

La Figura 1a es un gráfico de valores medios de glucosa en sangre con el tiempo (minutos). La Figura 1b es un gráfico de concentraciones medias de C-péptido durante experimentos comparando niveles de C-péptido (ng/ml) con el tiempo (minutos) cuando la insulina se administró intravenosamente, subcutáneamente, y por inhalación.

La Figura 2a es un gráfico de velocidad de infusión de glucosa (mg/kg/min) con el tiempo (minutos) comparando insulina administrada intravenosamente, subcutáneamente, y por inhalación. La Figura 2b es un gráfico de concentraciones medias de insulina (PU/ml) con el tiempo (minutos) comparando la insulina administrada intravenosamente, subcutáneamente, y por inhalación.

Descripción Detallada de la Invención

[0033] La encapsulación o atrapamiento de polimeros grandes, tales como proteínas y péptidos, en dicetopiperazinas puede usarse para eliminar impurezas o contaminantes tales como iones de metal u otras moléculas pequeñas. El primer aspecto de la presente invención se basa en la formación de un complejo entre un péptido y micropartículas preformadas de la dicetopiperazina. Las dicetopiperazinas también sirven tanto para estabilizar como para mejorar la administración de las sustancias complejadas. Se han desarrollado formulaciones para el transporte mejorado de péptidos a través de membranas biológicas. Estas formulaciones incluyen micropartículas formadas de una dicetopiperazina, y un péptido recubierto sobre ellas el cual puede ser cargado o neutro. La dicetopiperazina puede enmascarar la carga del péptido y/o puede formar uniones de hidrógeno con la membrana. Las formulaciones pueden proporcionar rápidos incrementos de la concentración del péptido en sangre tras la administración de las formulaciones.

[0034] Por ejemplo, se descubrió que puede administrarse insulina hexamérica al pulmón en formulación de fumarilo dicetopiperazina, alcanzando concentraciones máximas en sangre en 3-10 minutos. Por el contrario, la insulina administrada por vía pulmonar sin dicetopiperazina de fumarilo normalmente toma entre 25-60 minutos para alcanzar concentraciones máximas en sangre, mientras que la insulina hexamérica toma 30-90 minutos para alcanzar el nivel máximo en sangre por inyección subcutánea. Este logro se ha replicado exitosamente en diversas ocasiones y en diversas especies, incluyendo humanos.

[0035] Eliminar cinc de la insulina normalmente produce insulina inestable con un tiempo de caducidad indeseablemente corto. La purificación para eliminar el cinc, la estabilización y la administración mejorada de insulina se demuestra con los ejemplos. Las formulaciones de insulina atrapada en dicetopiperazina de fumarilo se hallaron estables y con una vida útil aceptable. La medición de los niveles de cinc demostró que el cinc había sido ampliamente eliminado durante el proceso de atrapamiento, dando insulina monomérica en una formulación estable de administración.

[0036] Se observó la rápida absorción de una serie de otros péptidos, incluyendo calcitonina de salmón, hormona paratiroidea 1-34, octreotida, leuprolida y péptido RSV, cuando el péptido es administrado por vía pulmonar en fumarilo dicetopiperazina—proporcionando concentraciones máximas en sangre en 3-10 minutos tras la administración pulmonar.

I. Material

A. Agente a Administrar

[0037] El agente a administrar es un péptido, y puede ser referido aquí como el agente activo, o molécula a ser complejada. Puede o no ser una especie cargada. Ejemplos de clases de péptidos adecuados para uso en las composiciones y métodos aquí descritos incluyen péptidos terapéuticos, profilácticos, y diagnósticos así como suplementos dietéticos.

[0038] No se conoce el mecanismo exacto por el que las dicetopiperazinas forman un complejo con las sustancias a administrar, pero se cree que las dicetopiperazinas forman un complejo con la sustancia a ser purificada. Se hace referencia a este proceso aquí como complejación.

[0039] Los péptidos son menores que 100 residuos de aminoácidos. Los péptidos a incorporar pueden tener una variedad de actividades biológicas, tales como agentes vasoactivos, oagentes neuroactivos, hormonas, anticoagulantes, agentes inmunomodulantes, agentes citóxicos, antibióticos, antivirales, antisentido, antígenos, y

anticuerpos. En algunos casos, los péptidos puede ser anticuerpos o antígenos los cuales de otro modo tendrían que ser administrados por inyección para obtener una respuesta adecuada.

5 [0040] Péptidos preferidos incluyen hormonas, citoquinas y otros péptidos inmoduladores, y antígenos/vacunas. En una realización preferida, el péptido es insulina monomérica o una forma estabilizada de insulina que se ha purificado para eliminar el cinc. En otra realización preferida, el péptido es glucagón.

[0041] El péptido, puede ser un antígeno, donde la molécula pretende obtener una respuesta inmune protectora, especialmente contra un agente que preferencialmente infecta los pulmones, tal como micoplasma, bacterias causando neumonía, y virus respiratorio sinticial. En estos casos, puede ser también útil administrar el fármaco en combinación con un adyuvante, para incrementar la respuesta inmune al antígeno.

10 [0042] Las impurezas que pueden ser eliminadas de la composición del agente activo incluyen iones de metal tal como cinc, y otros iones di- o multivalentes, y moléculas pequeñas inorgánicas y residuos disolventes.

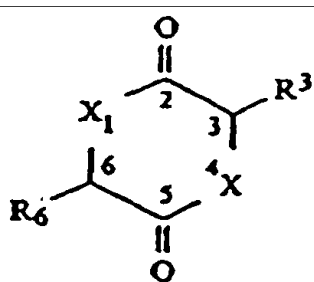
B. Dicotopiperazinas

[0043] Se describen dicetopiperazinas útiles en las presentes composiciones y métodos, por ejemplo, en la Patente US nº 6.071.497 .

15 (i): Fórmula General

[0044] Las dicetopiperazinas o sus análogos de sustitución son anillos rígidos planos con al menos seis átomos de anillo conteniendo heteroátomos y pares de electrones sin enlazar. Uno o ambos de los nitrógenos pueden ser sustituidos con oxígeno para crear los análogos de sustitución dicetomorfolina y dicetodioxano, respectivamente. Aunque es posible sustituir un nitrógeno con un átomo de azufre, esto no produce una estructura estable.

20 [0045] Abajo se muestra la fórmula general para dicetopiperazina y sus análogos.



25 [0046] R_3 y R_6 son cadenas laterales definidas como Q-T-Q-u o Q-u En donde, Q es, independientemente, un alquilo, aralquilo, alcarilo, alqueno, alquino, heteroalquilo, heterocíclico, alquilo-heterocíclico, o heterocíclico-alquilo C_{1-20} recto, ramificado o cíclico; T es $-C(O)O$, $-OC(O)$, $-C(O)NH$, NH , $-NQ$, $-OQO$, $-O$, $NHC(O)$, $-OP(O)$, $-P(O)O$, $-OP(O)_2$, $-P(O)_2O$, $-OS(O)_2$, o $-S(O)_3$; U es un grupo ácido, tal como ácido carboxílico, ácido fosfórico, ácido fosfónico y ácido sulfónico, o un grupo básico, tal como aminas primarias, secundarias y terciarias, sales de amonio cuaternarias, guanidina, anilina, derivados heterocíclicos, tales como piridina y morfolina, o una cadena zwitteriónica C_{1-20} , conteniendo al menos un grupo ácido y al menos un grupo básico, por ejemplo, los arriba descritos en donde las cadenas laterales pueden ser además funcionalizadas con un grupo alqueno o alquino en cualquier posición, uno o más de los carbonos en la cadena lateral puede ser sustituido con un oxígeno, por ejemplo, para proporcionar cadenas cortas de polietilenglicol, uno o más carbonos pueden ser funcionalizados con un grupo ácido o básico, como se describe arriba, y en donde los átomos X del anillo en posiciones 1 y 4 son bien O o N.

[0047] Ejemplos de cadenas laterales ácidas incluyen, pero no están limitadas, a cis y trans $-CH=CH-CO_2H$, $-CH(CH_3)=CH(CH_3)-CO_2H$,

35 $-(CH_2)_3-CO_2H$, $-CH_2CH(CH_3)-CO_2H$,

$-CH(CH_2CO_2H)=CH_2$. -ácido (tetrafluoro) benzoico, -ácido benzoico y

$-CH(NHC(O)CF_3)-CHrCO_2H$.

[0048] Ejemplos de cadenas laterales básicas incluyen, pero no están limitadas a, -anilina, -fenil- $C(NH)NH_2$, -fenil- $C(NH)NH$ (alquilo), -fenil- $C(NH)N$ (alquilo) $_2$ y $-(CH_2)_4NHC(O)CH(NH_2)CH(NH_2)CO_2H$.

40 [0049] Ejemplos de cadenas laterales zwitteriónicas incluyen, pero no están limitadas a, $-CH(NH_2)-CH_2-CO_2H$ y $-NH(CH_2)_{1-20}CO_2H$.

[0050] El término aralquilo hace referencia a un grupo arilo con un sustituyente alquilo.

[0051] El término heterocíclico-alquilo se refiere a un grupo heterocíclico con un sustituyente alquilo

[0052] El término alkarilo se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente arilo.

[0053] El término alquilo-heterocíclico se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente heterocíclico.

5 **[0054]** El término alqueno, como se hace referencia aquí , y a menos que se especifique de otro modo, se refiere a un grupo alqueno de C_2 a C_{10} , e incluye específicamente vinilo y alilo.

[0055] El término alquino, como se hace referencia aquí , y a menos que se especifique otra cosa, se refiere a un grupo alquino de C_2 a C_{10} .

[0056] Como aquí se usa , "dicetopiperazinas" incluye dicetopiperazinas y derivados y modificaciones de las mismas que caen dentro del ámbito de la fórmula general anterior.

10 **[0057]** Dicetopiperazina de fumarilo es la más preferida para aplicaciones pulmonares.

(ii). Síntesis

15 **[0058]** Las dicetopiperazinas pueden estar formadas por ciclodimerización de derivados de éster de aminoácido, como se describe por Katchalski, et al., J. Amer. Chem. Soc. 68:879-80 (1946), por ciclización de derivados de éster dipéptido, o por deshidratación térmica de derivados aminoácidos en disolventes de alta ebullición, como se describe por Kopple, et al., J. Org. Chem. 33(2):862-64 (1968). 2,5-diceto-3,6-di(aminobutil)piperazina (Katchalski et al. se refieren a esto como anhídrido de lisina) se preparó por ciclodimerización de N-épsilon-P-L-lisina en fenol líquido, similar al método Kopple en J. Org. Chem., seguido de la eliminación de los grupos bloqueantes (P)-con 4.3 M HBr en ácido acético. Esta ruta es preferida porque utiliza una sustancia iniciadora comercialmente disponible, implica condiciones de reacción que se informa que preservar la estereoquímica de las sustancias iniciadoras en el producto y todos los pasos pueden ser fácilmente escalados para la fabricación.

20 **[0059]** Derivados de dicetomorfolina y dicetoexetano pueden ser preparados por ciclización escalonada de un modo parecido al revelado en Katchalski, et al., J. Amer. Chem. Soc. 68:879-80 (1946).

25 **[0060]** Las dicetopiperazinas pueden ser radioetiquetadas. Se conocen medios para adjuntar radioetiquetas por los expertos en la técnica. Dicetopiperazinas radioetiquetadas pueden ser preparadas, por ejemplo, reaccionando gas de tritio con los compuestos antes listados que contienen un doble o triple enlace. Un carbono radioetiquetado carbono-14 puede ser incorporado en la cadena lateral utilizando precursores ^{14}C etiquetados que son fácilmente disponibles. Estas dicetopiperazinas radioetiquetadas pueden ser detectadas *in vivo* después de que las micropartículas resultantes sean administradas a un sujeto.

(a) Síntesis de Derivados Simétricos de Dicetopiperazina

30 **[0061]** Los derivados de dicetopiperazina son simétricos cuando ambas cadenas laterales son idénticas. Las cadenas laterales pueden contener grupos ácidos, grupos básicos, o combinaciones de los mismos.

35 **[0062]** Un ejemplo de un derivado simétrico de dicetopiperazina es 2,5-diceto-3,6-di (4-succiniloaminobutil) piperazina. 2,5-diceto-3,6-di(aminobutil) piperazina es exhaustivamente succinilado con anhídrido succínico en solución acuosa ligeramente alcalina para dar un producto que es fácilmente soluble en solución acuosa débilmente alcalina, pero que es bastante soluble en soluciones acuosas ácidas. Cuando se acidifican rápidamente soluciones concentradas del compuesto en un medio débilmente alcalino bajo condiciones apropiadas, la sustancia se separa de la solución como micropartículas.

[0063] Otros compuestos preferidos pueden ser obtenidos sustituyendo el grupo(s) succinilo en el compuesto anterior con grupos glutarilo, maleilo o fumarilo.

40 (b) Síntesis de Derivados de Dicetopiperazina Asimétricos

[0064] Un método de preparar derivados asimétricos de dicetopiperazina es proteger grupos funcionales en la cadena lateral, desproteger selectivamente una de las cadenas laterales, reaccionar el grupo funcional desprotegido para formar una primera cadena lateral, desproteger el segundo grupo funcional, y reaccionar el grupo funcional desprotegido para formar una segunda cadena lateral.

45 **[0065]** Derivados de dicetopiperazina con cadenas laterales ácidas protegidas, tales como ciclo-Lys(P)Lys(P), en donde P es un grupo benciloxicarbonilo, u otro grupo protector conocido por los expertos en la técnica, pueden ser selectivamente desprotegidos. Los grupos protectores pueden ser selectivamente escindidos utilizando reactivos limitadores, tales como HBr en el caso del grupo benciloxicarbonilo, o iones fluoruro en el caso de grupos protectores de silicio, y utilizando intervalos de tiempo controlados. De este modo, se pueden obtener mezclas de reacción que contienen derivados desprotegidos, monoprottegidos y diprottegidos de dicetopiperazina. Estos compuestos tienen diferentes solubilidades en diversos disolventes e intervalos de pH, y pueden ser separados por precipitación y extracción selectiva. Un disolvente apropiado, por ejemplo, éter, puede ser añadido a tales mezclas

de reacción para precipitar todas estas sustancias juntas. Esto puede parar la reacción de desprotección antes de que se complete por eliminación de las dicetopiperazinas de los reactantes utilizados para desproteger los grupos protectores. Removiendo el precipitado mezclado con agua, tanto las especies reaccionadas parcialmente como completamente se pueden disolver como sales en el medio acuoso. Se puede eliminar la sustancia inicial no reaccionada por centrifugación o filtración. Ajustando el pH de la solución acuosa a una condición débilmente alcalina, el producto monoprotegido asimétrico que contiene un grupo protector único precipita de la solución, dejando en solución la sustancia completamente desprotegida .

[0066] En el caso de derivados de dicetopiperazina con cadenas laterales básicas, se pueden también selectivamente desproteger los grupos básicos. Como se describe arriba, se puede parar la etapa de desprotección antes de que se complete, por ejemplo, añadiendo un disolvente adecuado a la reacción. Ajustando cuidadosamente el pH de la solución, se puede eliminar el derivado desprotegido por filtración, dejando en solución los derivados parcial y totalmente desprotegidos. Ajustando el pH de la solución a una condición ligeramente ácida, el derivado monoprotegido se precipita fuera de la solución y puede ser aislado.

[0067] Se puede selectivamente desproteger derivados zwitterionicos de dicetopiperazina, como se describe arriba. En el último paso, ajustar el pH una condición ligeramente ácida precipita el compuesto monoprotegido con un grupo ácido libre. Ajustar el pH a una condición ligeramente básica precipita el compuesto monoprotegido con un grupo básico libre.

[0068] La eliminación limitada de grupos protectores por otros mecanismos, incluyendo pero no limitado a escindir grupos protectores que se escinden por hidrogenación utilizando una cantidad limitada de gas hidrógeno en presencia de catalizadores de paladio. El product resultante es también un derivado asimétrico de dicetopiperazina desprotegido parcialmente. Se pueden aislar estos derivados esencialmente como se describe arriba.

[0069] Se reacciona la dicetopiperazina monoprotegida para producir una dicetopiperazina con una cadena lateral y grupo protector. La eliminación de grupos protectores y el acoplamiento con otras cadenas laterales da dicetopiperazinas asimétricamente sustituidas con una mezcla de cadenas laterales ácidas, básicas y zwitterionicas.

[0070] Se pueden obtener otras sustancias que presentan esta respuesta al pH funcionalizando los nitrógenos del anillo de amida del anillo de dicetopiperazina.

C. Mejoradores de Transporte

[0071] En una realización referida, el péptido es complejado con una dicetopiperazina como un mejorador de transporte que es degradable y capaz de formar enlaces de hidrógeno con la membrana biológica diana con el fin de facilitar el transporte del agente a través de la membrana. El mejorador de transporte también es capaz de formar enlaces de hidrógeno con el péptido si es cargado, con el fin de enmascarar la carga y facilitar el transporte del péptido a través de la membrana.

[0072] El mejorador de transporte preferiblemente es biodegradable y puede proporcionar liberación lineal, pulsada o en masa del agente activo.

[0073] Un mejorador de transporte preferido es dicetopiperazina de fumarilo. Otras dicetopiperazinas que pueden ser útiles como mejoradoras de transporte se describen arriba.

[0074] Como la mayoría de las proteínas y péptidos, la insulina es una molécula cargada, lo que dificulta su capacidad de atravesar membranas biológicas cargadas. Se ha descubierto que cuando el hidrógeno de la insulina se une a dicetopiperazina de fumarilo, la carga del péptido se enmascara, facilitando o mejorando por ello el paso de la insulina a través de las membranas, como las membranas mucosales, y a la sangre.

II. Métodos

A. Encapsulación

[0075] Se revela que puede encapsularse el agente activo (a) dentro de micropartículas disolviendo una dicetopiperazina con cadenas laterales ácidas en bicarbonato u otra solución básica, añadiendo el agente activo en solución o suspensión, y luego precipitando la micropartícula añadiendo ácido, tal como 1 M de ácido cítrico.

[0076] Alternativamente, pueden encapsularse los agentes activos (b) dentro de micropartículas disolviendo una dicetopiperazina con cadenas laterales básicas en una solución ácida, tal como 1 M de ácido cítrico, añadiendo el agente activo en solución o suspensión, y luego precipitando la micropartícula añadiendo bicarbonato y otra solución básica.

[0077] Alternativamente puede encapsularse el agente activo (c) dentro de micropartículas disolviendo una dicetopiperazina con tanto cadenas laterales ácidas como básicas, añadiendo el agente activo en solución o suspensión para ser encapsulado, precipitando luego la micropartícula neutralizando la solución.

[0078] Se pueden almacenar las micropartículas en el estado seco y suspenderse para administración a un paciente. En la opción (a) las micropartículas reconstituidas mantienen su estabilidad en un medio ácido y se disocian según el medio se aproxima al pH fisiológico en el intervalo entre 6 y 14. En la opción (b) las micropartículas suspendidas mantienen su estabilidad en un medio básico y se disocian a un pH entre 0 y 6. En la opción (c), las micropartículas reconstituidas mantienen su estabilidad en un medio ácido o básico y se disocian según el medio se aproxima al pH fisiológico en el intervalo entre 6 y 8.

[0079] Se eliminan normalmente las impurezas cuando se precipitan las micropartículas. Sin embargo, pueden eliminarse también las impurezas lavando las partículas para disolver las impurezas. Una solución de lavado preferida es agua o un buffer acuoso. Se pueden también usar disolventes distintos al agua para lavar las microesferas o precipitar las dicetopiperazinas, con el fin de eliminar las impurezas que no son solubles en agua. Cualquier disolvente en los que ni la carga, ni la dicetopiperazina de fumarilo es soluble es adecuado. Los Ejemplos incluyen ácido acético, etanol y tolueno.

B. Complejación

[0080] La invención actualmente reivindicada proporciona una alternativa al proceso de encapsulación discutido en la sección A. Más específicamente, la invención actualmente reivindicada emplea la complejación del péptido a micropartículas preformadas de dicetopiperazina.

[0081] En una realización, se preparan micropartículas de dicetopiperazina y se proporcionan en una suspensión, normalmente una suspensión acuosa, a la que se añade entonces una solución del péptido. Se liofiliza luego la suspensión para dar las micropartículas de dicetopiperazina con una cobertura de péptido. En una realización preferida, el péptido es insulina en una forma hexamérica. Se pueden eliminar entonces los iones de cinc lavando las micropartículas con un disolvente apropiado.

[0082] Como se usa aquí, el término "atrapado" con referencia a un agente activo en/con una dicetopiperazina se refiere al recubrimiento del péptido sobre micropartículas de la dicetopiperazina.

[0083] Se ha hallado que las micropartículas de dicetopiperazina tienen una mayor afinidad para la insulina que la que tiene el cinc. Se ha hallado que la insulina se estabiliza con una distribución reticular ordenada de dicetopiperazina de fumarilo. En este estado, en ausencia suficiente de iones de cinc, la insulina es predominantemente dimérica y monomérica, a diferencia de su estado hexamérico. La insulina por tanto se disocia más fácilmente a su estado monomérico, que es el estado en el que la insulina ejerce su actividad biológica:

[0084] Se pueden sustituir otros agentes complejantes por la dicetopiperazina. Otros agentes complejantes representativos incluyen albúmina de suero y otras proteínas, ácido alginico, anticuerpos, ciclodextrinas, fosfolípidos, y lecitina. Por ejemplo, la insulina contaminada con cinc puede complejarse con albúmina de suero bovino. Puede dializarse el complejo en tubos con un punto de corte de peso molecular por debajo de 1.000 Daltons para separar y eliminar el cinc. Una vez se han eliminado por dializado suficientes cantidades de cinc, como se prueba por su presencia en el dializado, se transfiere la dispersión a tubos de diálisis con un punto de corte de peso molecular por debajo de los 10.000 Daltons. Una insulina monomérica pasará a través del tubing al dializado, dejando detrás cualquier insulina hexamérica remanente complejada con cinc. La insulina purificada puede captarse del dializado.

[0085] Estas sustancias pueden, sin embargo, no proporcionar suficiente estabilización de fármacos inestables o lábiles.

C Administración

[0086] Pueden administrarse las composiciones de péptido complejado a micropartículas de dicetopiperazina como aquí se describe pueden administrarse a pacientes en necesidad del péptido. Se administran preferiblemente las composiciones en forma de micropartículas, que pueden ser en forma de un polvo seco para administración pulmonar o suspendidas en un vehículo farmacéutico apropiado, tal como solución salina.

[0087] Se almacenan preferiblemente las micropartículas en forma seca o liofilizada hasta inmediatamente antes de la administración. Pueden administrarse luego las micropartículas directamente como un polvo seco, tal como por inhalación utilizando, por ejemplo, inhaladores de polvo seco conocidos en la técnica. Alternativamente, pueden suspenderse las micropartículas en un volumen suficiente del vehículo farmacéutico, por ejemplo, como una solución acuosa para administración como un aerosol.

[0088] Pueden administrarse también las micropartículas por vía oral, subcutánea e intravenosa.

[0089] Pueden administrarse las composiciones a cualquier membrana biológica diana, preferiblemente una membrana mucosal de un paciente. En una realización preferida, el paciente es un humano que padece diabetes Tipo II. En una realización preferida, la composición administra insulina en forma biológicamente activa al paciente, que proporciona una concentración pico de insulina en suero que simula la respuesta normal a la comida.

[0090] En una realización preferida, se atrapa insulina hexamérica en dicetopiperazina de fumarilo para formar un precipitado sólido de insulina monomérica en la dicetopiperazina, que se lava entonces con solución acuosa para eliminar el cinc libre. Esta formulación demuestra absorción en sangre tras la administración pulmonar a una velocidad de 2.5 veces la velocidad de absorción de insulina tras inyección subcutánea, con niveles máximos en sangre que ocurren entre 7.5 y 10 minutos tras la administración.

[0091] La proporción de carga del fármaco a administrar es normalmente entre un 0.01% y 90%, dependiendo de la forma y tamaño del fármaco a administrar y el tejido diana. En una realización preferida utilizando dicetopiperazinas, el intervalo preferido es de 0.1 % a 50% de carga en peso de fármaco. Puede determinarse la dosificación apropiada, por ejemplo, por la cantidad del péptido complejado, la velocidad de su liberación de las micropartículas, y, en una realización preferida, el nivel de glucosa en sangre del paciente.

[0092] Una aplicación preferida está en el tratamiento de la hiperinsulinemia. En una realización preferida, las micropartículas de la composición en la que el péptido es glucagón pueden administrarse por infusión subcutánea continua. El glucagón es un péptido extremadamente inestable, pero puede estabilizarse en partículas de dicetopiperazina, por ejemplo. Las micropartículas estabilizadas de glucagón / dicetopiperazina pueden hacerse por complejación a micropartículas de dicetopiperazina preformadas según la presente invención, o por el no reivindicado método de encapsulación añadiendo glucagón a una solución de dicetopiperazina cuyo hidrógeno se une al glucagón y cuando se acidifica la solución, tal como añadiendo un ácido alimenticio, tanto la dicetopiperazina como el glucagón se auto-ensamblan para formar microesferas uniformes con un tamaño medio de partículas de, por ejemplo, unos 2 μm . En este proceso, aproximadamente 95% del glucagón es extraído de la solución y es uniformemente distribuido dentro de la micropartícula de dicetopiperazina. Pueden suspenderse e inyectarse fácilmente estas partículas subcutáneamente con una bomba de infusión estándar. Entonces se contactan las partículas de glucagón/dicetopiperazina con el entorno de pH casi neutro del fluido subcutáneo, donde se disuelven, liberando así el glucagón en su estado farmacológicamente activo.

[0093] Las composiciones y métodos aquí descritos son descritos además por los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1: Eliminación del Cinc de la Insulina Inyectable U.S.P.

[0094] Se analizó insulina atrapada en dicetopiperazina de fumarilo para determinar si el cinc se eliminó durante el proceso de atrapamiento. La insulina utilizada como sustancia iniciadora cumple con los criterios de U.S.P. para insulina inyectable, y conforme con el certificado de análisis, la insulina contenía un cantidad considerable de cinc: 0.41%. Se atrapó entonces la insulina en dicetopiperazina de fumarilo para formar una mezcla sólida de dicetopiperazina de fumarilo /insulina como se describe arriba.

[0095] Tras el atrapamiento de la insulina en dicetopiperazina de fumarilo , la cantidad de cinc debería teóricamente estar presente en la misma proporción en que existía en la insulina limpia. Utilizando el certificado del valor del análisis , se calculó que uno debería esperar encontrar 697 partes por millón (ppm) de cinc por gramo en la producción sólida de dicetopiperazina de fumarilo/insulina. Sorprendentemente, se midió que la cantidad de cinc presente en dicetopiperazina de fumarilo/insulina sólida era solamente 6 ppm. El cinc "desaparecido" se eliminó presumiblemente con el agua utilizada para lavar el precipitado de insulina/dicetopiperazina de fumarilo.

Ejemplo 2: Biodisponibilidad de Insulina en la Formulación Pulmonar de Dicetopiperazina

Sujetos y Métodos

[0096] Se revisó y aprobó el estudio por el comité de revisión ético de la Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, y fue conducido conforme a las regulaciones locales, la Declaración de Helsinki y las normas de la Buena Práctica Clínica.

[0097] Se realizó el estudio con 5 voluntarios masculinos sanos. Los criterios de inclusión eran buena salud, como se juzgó por examen físico, edad: 18 a 40 años, índice de masa corporal: 18 a 26 kg/m^2 , capacidad de alcanzar máximo flujo respiratorio de 4 l/seg medido por espirometría asistida por ordenador y un PEV_1 igual o mayor a 80% del normal previsto (FEV_1 = volumen espiratorio forzado en un segundo). Los criterios de exclusión fueron Diabetes Mellitus tipo 1 o 2, prevalencia de anticuerpos de insulina humana, historial de hipersensibilidad a la medicación de estudio o a fármacos con estructuras químicas similares, historial de alergias graves o múltiples, tratamiento con cualquier otro fármaco de investigación en los últimos 3 meses antes de la entrada del estudio, enfermedad fatal progresiva, historial de abuso de fármacos o alcohol, terapia actual con otras fármacos, historial significativo de enfermedad cardiovascular, respiratoria, gastrointestinal, hepática, renal, neurológica, psiquiátrica y/o hematológica, infección en curso del tubo respiratorio o sujetos definidos como fumadores con evidencia o historial de uso de tabaco o nicotina.

Realización del Estudio**[0098]** En la mañana de los días de estudio, los sujetos venían al hospital (ayunando, excepto por agua, desde la medianoche en adelante) a las 7:30. Se les restringían a los sujetos excesivas actividades físicas y una ingesta de alcohol durante 24 horas antes de cada día de tratamiento. Se les asignaba al azar una de las tres ramas del tratamiento. Los sujetos recibieron una infusión regular intravenosa de insulina humana, la cual se mantenía en $0.15 \text{ mU min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ de modo que se establecieron concentraciones de insulina en suero en 10-15 U/ml durante un periodo de 2 horas antes del momento 0. Se continuaba esta infusión de baja dosis durante el

ensayo para suprimir la secreción endógena de insulina. Se mantuvo constante la glucosa en sangre a un nivel de 90 mg/dl en el clamp de glucosa por un sistema de infusión controlada de glucosa (BIOSTATOR™). El algoritmo de clamp de glucosa se basaba en la concentración real medida de glucosa en sangre y el grado de variabilidad en los minutos antes de calcular las velocidades de infusión de glucosa para mantener la concentración constante de glucosa en sangre. La aplicación de insulina (5 U i.v. o 10 U s.c. inyección o tres inhalaciones respiratorias profundas por cápsula (2 capsulas con 50 U cada una) aplicada con un dispositivo comercial de inhalación (Boehringer Ingelheim)) tenía que ser finalizada inmediatamente antes del momento 0. La duración del experimento de clamp fue de 6 horas a partir del momento 0. Se midieron las velocidades de infusión de glucosa, glucosa en sangre, insulina de suero y péptido-C.

10 Bioeficacia y Biodisponibilidad

[0099] Para determinar la bioeficacia, se calcularon las áreas bajo la curva de los índices de infusión de glucosa durante las primeras 3 horas (AUC₀₋₁₈₀) tras la administración y durante el periodo total de observación de seis horas tras la administración (AUC₀₋₃₆₀) y se correlacionaron con la cantidad de insulina aplicada. Para determinar la biodisponibilidad, se calcularon las áreas bajo la curva de concentraciones de insulina durante las primeras 3 horas (AUC₀₋₁₈₀) tras la administración y durante el periodo total de observación de seis horas tras la administración (AUC₀₋₃₆₀) y se correlacionaron con la cantidad de insulina aplicada.

[0100] En el estudio de clamp, se toleró bien la inhalación de 100 U de TECHNOSPHERE™/Insulina y se demostró que tenía un efecto sustancial de reducción de glucosa en sangre con una biodisponibilidad relativa del 25.8% durante las tres primeras horas como calculado a partir de las concentraciones alcanzadas de insulina en suero. TECHNOSPHERES™ son micropartículas (también referidas aquí como microesferas) formadas de dicetopiperazina de los autoensamblajes en una distribución reticular ordenada a pHs particulares normalmente un pH bajo Se producen normalmente para tener un diámetro medio entre 1 y unos 5 µm.

Resultados

[0101] Los resultados farmacocinéticos se ilustran en las Figuras 1 y 2 y en la Tabla 1.

25 Resultados de Eficacia

[0102] La inhalación de 100 U of TECHNOSPHERE™/Insulina (inhalación de 100 U) reveló un pico de concentración de insulina después de 13 min (intravenoso (i.v.) (5U): 5 min, subcutáneo (s.c.) (10 U): 121 min) y un regreso de los niveles de insulina a línea base después de 180 min (i.v.: 60 min, s.c. 360 min). La acción biológica según medida por velocidad de infusión de glucosa se maximizó tras 39 min (i.v. 14 min, s.c.: 163 min) y se mantuvo durante más de 360 min (i.v.: 240 min, s.c.: > 360 min). La biodisponibilidad absoluta (comparación con la aplicación i.v.) fue 14.6±5.1% durante las primeras 3 horas y 15.5±5.6% durante las primeras 6 horas. La biodisponibilidad relativa (comparación con la aplicación s.c.) era de 25.8_11.7% durante las primeras 3 horas y 16.4±7.9% durante las primera 6 horas.

Table 1: Parámetros Farmacocinéticos

<u>Parámetros Calculados sobre Velocidad de Infusión de Glucosa</u>	<u>Administración Intravenosa</u>	<u>Inhalado</u>	<u>Administración Subcutánea</u>
T50%*	9 min	13 min	60 min
Tmax	14min	39min	163min
T-50%**	82min	240min	240min
T a línea base	240min	>360 min	>360 min
<u>Parámetros Calculados sobre Niveles de Insulina</u>	<u>Administración Intravenosa</u>	<u>Inhalada</u>	<u>Administración Subcutánea</u>

T50%*	2min	2.5min	27min
Tmax	5min	13min	121min
T-50%**	6min	35min	250min
T a línea base	60min	180min	360min
* tiempo desde línea base a valores mitad de máximos			
** tiempo desde línea base a valores mitad de máximos tras pasar Tmax			

Resultados de Seguridad

[0103] Se mostró que la TECHNOSPHERE™/Insulina era segura en todos los pacientes. Un paciente estaba tosiendo durante la inhalación sin más síntomas o signos de deterioro del sistema respiratorio.

5 Conclusiones

[0104] Se toleró bien la inhalación de 100 U de TECHNOSPHERE™/Insulina y se demostró que tenía un efecto sustancial de reducción de la glucosa en sangre con una biodisponibilidad relativa de 25.8% durante las primeras 3 horas como se calculó a partir de las concentraciones alcanzadas de insulina en suero.

Resumen

10 [0105] En este estudio, se demostró que la inhalación de TECHNOSPHERE™/Insulina (la formulación del ejemplo 1) en sujetos humanos sanos tenía un perfil de acción en el tiempo con un máximo rápido de concentración de insulina (Tmax: 13 min) y rápido comienzo de la acción (Tmax: 39 min) y una acción sostenida durante más de 6 horas. El efecto metabólico total medido tras la inhalación de 100 U de TECHNOSPHERE™/Insulina era mayor que tras la inyección subcutánea de 10 U de insulina. Se calculó que la bioeficacia relativa de TECHNOSPHERE™/Insulina era 19.0%, mientras la biodisponibilidad relativa se determinó que era del 25.8% en las primeras tres horas.

15 [0106] Los datos también muestran que la inhalación de TECHNOSPHERE™/Insulina dio lugar a un comienzo más rápido de la acción que la inyección de insulina s.c. que estaba cercana al comienzo de la acción de la inyección de insulina of i.v., mientras que la duración de la acción de TECHNOSPHERE™/Insulina era comparable a la de la inyección de insulina s.c.

20 [0107] El fármaco se toleró bien y no se informó de ningún suceso adverso durante toda la prueba.

Ejemplo 3: Eliminación de Impurezas del Péptido Registrado

25 [0108] Un péptido registrado que contiene una impureza se atrapó en dicetopiperazina de fumarilo, formando un precipitado de péptido/dicetopiperazina de fumarilo. Se lavó el precipitado con agua para eliminar la impureza. El péptido es bastante inestable y atrapararlo en dicetopiperazina de fumarilo mejora marcadamente su estabilidad; tanto como un polvo seco como en suspensión acuosa para inyección.

Ejemplo 4: Formulaciones Estabilizadas de Glucagón

Formulación

30 [0109] Se formuló glucagón en condiciones estériles, en un complejo estabilizado por precipitación en solución acidica con dicetopiperazina de fumarilo (3,6-bis[N-fumarilo-N-(n-butil)amino]-2,5-dicetopiperazina). Se lavó y liofilizó el complejo dando una formulación en polvo seco estéril de dicetopiperazina/glucagón (referida en adelante como "TG") conteniendo desde 1.2 a 8.2% de glucagón en peso, dependiendo de los parámetros deseados de formulación (permitiendo a los médicos incrementar la dosis manteniendo sin embargo el volumen constante. Se suspendió el

polvo TG en un medio apropiado adecuado para la administración subcutánea en una bomba de infusión MiniMed 507C.

Protocolo de Estabilidad

5 [0110] Se suspendieron glucagón y TG en medio de infusión y se incubaron a 40 °C en un baño de agua para duraciones variables de tiempo hasta 150 horas.

Análisis HPLC de Glucagón

10 [0111] Se empleó una adaptación del método USP para análisis del glucagón. Se utilizaron una columna Waters Symmetry Shield RP8 (5 µm, 3.9 x 150 mm) y precolumna RP8 (5 µm, 3.9 x 20 mm) con un caudal de 1 mL/min. y una longitud de onda de detección de 214 nm. El método gradiente consistió en fase móvil A: 9.8 g NaH₂PO₄ (0.0816 M) y 170 mg de L-cisteína (1.4 mM) por litro de agua grado HPLC, pH ajustado a 2.6 con ácido fosfórico; y B: acetonitrilo. Se diluyeron soluciones de glucagón según era necesario con agua y se inyectaron. Se prepararon muestras de TG añadiendo 1/10^o de volumen 1 M Tris pH 10.0 a la muestra para solubilizar la dicetopiperazina de fumarilo.

Protocolo de Estudio en Ratas

15 [0112] Ratas Sprague Dawley 200-250 g fueron puestas en ayunas durante la noche y se les administraron inyecciones subcutáneas de glucagón o TG (0.75 mg/kg en un medio apropiado que se había mantenido a 25 °C durante 0, 24, o 48 horas. Se tomaron muestras de sangre a -10, -5, 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, y 60 minutos tras la dosis y se analizaron para glucosa en sangre (HemCue B-analizador de glucosa, Hemocue AB, Angelholm Suecia).
20 Se determinó la línea base media (mediciones pre-dosis) y se restó de los datos posteriores y se trazó respecto al tiempo. Esto se hizo para asegurar que la formulación TG, la cual pareció no degradarse significativamente, mostraba actividad farmacológicamente apropiada.

Resultados

25 [0113] Tras incubación a 40 °C, el análisis HPLC mostró un incremento en los productos de degradación en la preparación de glucagón. Por el contrario, TG tiene solamente un pico menor de degradación (RT=6) que se correlacionaba con la forma oxidativa ligeramente menos activa de glucagón. El glucagón sin dicetopiperazina (por ejemplo sin TECHNOSPHERES™) tenía muchos picos de degradación, algunos de los cuales contribuían a un efecto mejorado y otros que reducían la potencia del glucagón.

[0114] El polvo liofilizado esteril TG fue enviado congelado a un hospital, donde se resuspendió en medio estéril. La sustancia resuspendió bien y cada vial se inyectó continuamente durante un periodo de 72 horas.

30 Conclusión

35 [0115] Las preparaciones estándar de glucagón no son adecuadas para la regulación de glucosa en sangre por infusión subcutánea continua. La administración de tales preparaciones que contienen cantidades variables de las formas desamidadas e hidrolizadas resultaron en altos niveles de glucosa en sangre. Las suspensiones de TECHNOSPHERES™/glucagón, que es estabilizada, no se agrega y contiene cantidades clínicamente irrelevantes de productos de degradación. Por ello TG puede ser y ha sido usado como una terapia para la hiperinsulinemia, proporcionando a lo largo del tiempo niveles constantes, elevados de glucosa cuando se administran subcutáneamente.

REIVINDICACIONES

1. Un método de purificar un péptido que comprende proporcionar micropartículas preformadas de una dicetopiperazina en una suspensión; proporcionando una composición de péptido conteniendo una impureza a eliminar;
- 5 formar un complejo del péptido con las micropartículas preformadas de la dicetopiperazina; y eliminar esencialmente todas las impurezas del complejo lavando con un no-disolvente para el péptido y dicetopiperazina.
El método de la Reivindicación 1 en donde el péptido o proteína se selecciona del grupo consistiendo en insulina, calcitonina de salmón, hormona paratiroidea1-34, octreotida, leuprolida, y péptido RSV.
- 10 3. El método de la Reivindicación 1 en donde la impureza es un ión multivalente.
4. El método de la Reivindicación 2 en donde el péptido es un complejo de insulina y la impureza es un ión de cinc.
5. Una composición para la administración de un péptido a un paciente, que comprende un péptido complejado con una dicetopiperazina; en donde la composición se obtiene combinando el péptido con micropartículas preformadas de la dicetopiperazina para formar una cobertura del péptido sobre las micropartículas y el péptido es una hormona, citoquina u otro péptido inmunomodulatorio, antígeno o vacuna.
- 15 6. La composición de la Reivindicación 5 en donde el péptido es insulina dimérica o monomérica.
7. La composición de la Reivindicación 5 en donde el péptido es glucagón.
8. La composición de la Reivindicación 6 en donde el péptido está sustancialmente libre de iones de cinc.
9. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 5-8 en donde las micropartículas se proporcionan en forma de un polvo seco.
- 20 10. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 5-8 en donde las micropartículas se proporcionan como una suspensión acuosa en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 5, 8 o 9 la cual está en una forma adecuada para administración pulmonar.
- 25 12. La composición de la Reivindicación 5 hecha por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
13. Uso de micropartículas formadas de un complejo de (i) un agente activo y (ii) una cantidad eficaz de dicetopiperazina, en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de dicetopiperazina con el agente activo, en la elaboración de un medicamento para tratamiento terapéutico o profiláctico por administración del agente activo a una membrana mucosal en donde el agente activo es un péptido terapéutico, profiláctico o diagnóstico.
- 30 14. Micropartículas formadas de un complejo de (i) un agente activo y (ii) una cantidad eficaz de dicetopiperazina, en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de dicetopiperazina con el agente activo, para uso en tratamiento terapéutico o profiláctico por administración del agente activo a una membrana mucosal en donde el agente activo es un péptido terapéutico, profiláctico o diagnóstico.
- 35 15. El uso de la Reivindicación 13 o las micropartículas de la Reivindicación 14, en donde el agente activo es una molécula cargada.
16. El uso de cualquiera de las Reivindicaciones 13 o 15 o las micropartículas de cualquiera de las Reivindicaciones 14 o 15, en donde la composición se administra a los pulmones por medio de inhalación.
- 40 17. El uso de micropartículas de una dicetopiperazina en el que se compleja insulina monomérica o dimérica con la dicetopiperazina, en donde la insulina está sustancialmente libre de cinc, y en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de la dicetopiperazina con insulina, en la elaboración de un medicamento para administrar insulina a un paciente en necesidad de la misma.
- 45 18. Micropartículas de una dicetopiperazina en las que la insulina monomérica o dimérica se compleja con la dicetopiperazina, en donde la insulina está sustancialmente libre de cinc, y en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de la dicetopiperazina con insulina para uso en la administración de insulina a un paciente en necesidad de la misma.
19. El uso de la Reivindicación 17 o las micropartículas de la Reivindicación 18, en donde la composición está en forma de un polvo seco adecuada para administración a los pulmones por medio de inhalación.

20. Micropartículas formadas de un complejo de (i) un agente activo y (ii) una cantidad eficaz de una dicetopiperazina, en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de dicetopiperazina con el agente activo, para uso en medicina en donde el agente activo es una hormona de péptido, citoquina u otro péptido inmunomodulatorio, antígeno o vacuna.
- 5 21. Micropartículas de una dicetopiperazina en las que se compleja insulina monomérica o dimérica, y en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de la dicetopiperazina con insulina, para uso en medicina.
22. Micropartículas de la Reivindicación 21 para uso en el tratamiento de diabetes de Tipo II.
23. Un método para estabilizar un péptido que comprende
- 10 proporcionar micropartículas preformadas de una dicetopiperazina en una suspensión;
proporcionar un péptido;
formar un complejo del péptido con una cantidad eficaz de las micropartículas preformadas de dicetopiperazina para estabilizar el péptido.
- 15 24. Una composición para la administración de un péptido, en donde el péptido es estabilizado según el método de la Reivindicación 23.
25. Una formulación para el uso en medicina que comprende insulina complejada con una dicetopiperazina y en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de la dicetopiperazina con la insulina, que cuando es administrado a un paciente en una cantidad eficaz, produce una concentración máxima de insulina en sangre en el paciente, lo que simula una respuesta normal al alimento, en donde la formulación está en una forma adecuada para la administración por inhalación u oralmente.
- 20 26. La formulación de la Reivindicación 25 administrada por inhalación.
27. La formulación de la Reivindicación 26, en donde la dicetopiperazina es dicetopiperazina de fumarilo y la concentración máxima de insulina en sangre se alcanza en unos 13 minutos tras la administración.
28. La formulación de la Reivindicación 26 que comprende insulina, en donde la concentración máxima de insulina en sangre se logra en un periodo de tiempo entre 3 a 10 minutos tras la administración.
- 25 29. Una formulación para uso en medicina que comprende un péptido complejado con una dicetopiperazina por combinación de micropartículas preformadas de la dicetopiperazina con el péptido; cuya formulación, cuando se administra a un paciente por administración pulmonar, proporciona una concentración máxima en sangre entre 3 a 10 minutos tras la administración, y en donde el péptido es insulina, calcitonina de salmón, hormona paratiroidea1-34, octreotida, leuprolida o péptido RSV.
- 30 30. La formulación de cualquiera de las Reivindicaciones 25 a 29 en la forma de un polvo seco.
31. Uso de una composición comprendiendo insulina complejada con una dicetopiperazina y en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de la dicetopiperazina con la insulina, para la elaboración de un medicamento para tratar diabetes de Tipo II el cual, cuando se administra a un paciente en una cantidad eficaz produce una concentración máxima de insulina en sangre, lo que simula una respuesta normal a la comida, en donde la formulación está en una forma adecuada para administración por inhalación u oralmente.
- 35 32. Una composición comprendiendo insulina complejada con una dicetopiperazina y en donde el complejo se forma combinando micropartículas preformadas de la dicetopiperazina con la insulina, para uso en tratar diabetes de Tipo II que, cuando se administra a un paciente en una cantidad eficaz produce una concentración máxima de insulina en sangre en el paciente, lo que simula una respuesta normal a la comida, en donde la formulación está en una forma adecuada para administración por inhalación u oralmente.
- 40 33. Un método de complejar un péptido con una dicetopiperazina que comprende:
- (i) proporcionar una suspensión de micropartículas de dicetopiperazina,
(ii) proporcionar una solución del péptido, y
- 45 (iii) combinar la suspensión y la solución para formar un complejo del péptido y las micropartículas de dicetopiperazina.
34. El método de la Reivindicación 33 que además comprende eliminar el disolvente por liofilización.
35. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 2, 23, 33 o 34 o el uso o las micropartículas de la Reivindicación 15, o la composición de la Reivindicación 24, en donde el agente activo es insulina.

- 36.** El método de la Reivindicación 35 cuando depende de cualquiera de las Reivindicaciones 33 a 34, en donde la insulina complejada es insulina monomérica o dimérica.
- 37.** El método de la Reivindicación 35 cuando depende de cualquiera de las Reivindicaciones 33 a 34, o la Reivindicación 36, en donde la insulina es estable.
- 5 **38.** El uso de una formulación de administración para insulina monomérica o dimérica comprendiendo una cantidad eficaz de insulina complejada con un derivado de dicetopiperazina, en donde la formulación de administración se prepara complejando insulina con micropartículas del derivado de dicetopiperazina, y en donde las micropartículas liberan insulina monomérica o dimérica por disociación, en la elaboración de un medicamento para administrar insulina monomérica o dimérica a un paciente en necesidad de la misma.
- 10 **39.** Una formulación de administración para insulina monomérica o dimérica comprendiendo una cantidad eficaz de insulina complejada con un derivado de dicetopiperazina, en donde la formulación de administración se prepara complejando insulina con micropartículas del derivado de dicetopiperazina, y en donde las micropartículas liberan insulina monomérica o dimérica por disociación, para uso en la medicina.
- 15 **40.** El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 5-12, el uso de cualquiera de las Reivindicaciones 13 o 15 a 17 o 19, las micropartículas para uso conforme a cualquiera de las Reivindicaciones 14, 18 o 20 a 22, el método de la Reivindicación 23, la composición de la Reivindicación 24, la formulación de cualquiera de las Reivindicaciones 25 a 30, el uso de la Reivindicación 31, la composición de la Reivindicación 32, el método de cualquiera de las Reivindicaciones 33-37, el uso de la Reivindicación 38 o la formulación de la Reivindicación 39, en donde la dicetopiperazina es dicetopiperazina de fumarilo .
- 20 **41.** El método de la Reivindicación 1 o 23, la composición de la Reivindicación 5, el uso de la Reivindicación 13, 16 o 38, la formulación de la Reivindicación 39, o las micropartículas de cualquiera de las Reivindicaciones 14, 18 o 20 en donde el derivado de dicetopiperazina tiene la fórmula 2,5- diceto-3,6-di(4-X-aminobutil)piperazina, en donde X es seleccionado del grupo consistente de fumarilo, succinilo, maleilo, y glutarilo.
- 25 **42.** El uso de la reivindicación 17, 19 o 38, o las micropartículas de la Reivindicación 18 o 19 o la fórmula de la Reivindicación 39, en donde la formulación de administración está en forma de un polvo seco adecuado para administración a los pulmones por inhalación.
- 43.** El uso de la reivindicación 17, 19 o 38, o las micropartículas de la Reivindicación 18 o 19 o la formulación de la Reivindicación 39, en donde el paciente es un diabético de Tipo II.
- 30 **44.** El uso de la reivindicación 43, las micropartículas de la reivindicación 43 o la formulación de la reivindicación 43 en donde la composición o formulación de administración es para administración al paciente concurrentemente con, o menos de unos 20 minutos antes de que el paciente tome una comida.
- 45.** El uso de la reivindicación 17, 19 o 38, las micropartículas de la Reivindicación 18 o 19 o la formulación de la Reivindicación 39, en donde la formulación de administración se provee en una o más dosis unitarias de insulina, cada dosis equivalente a unas 6 IU de insulina.

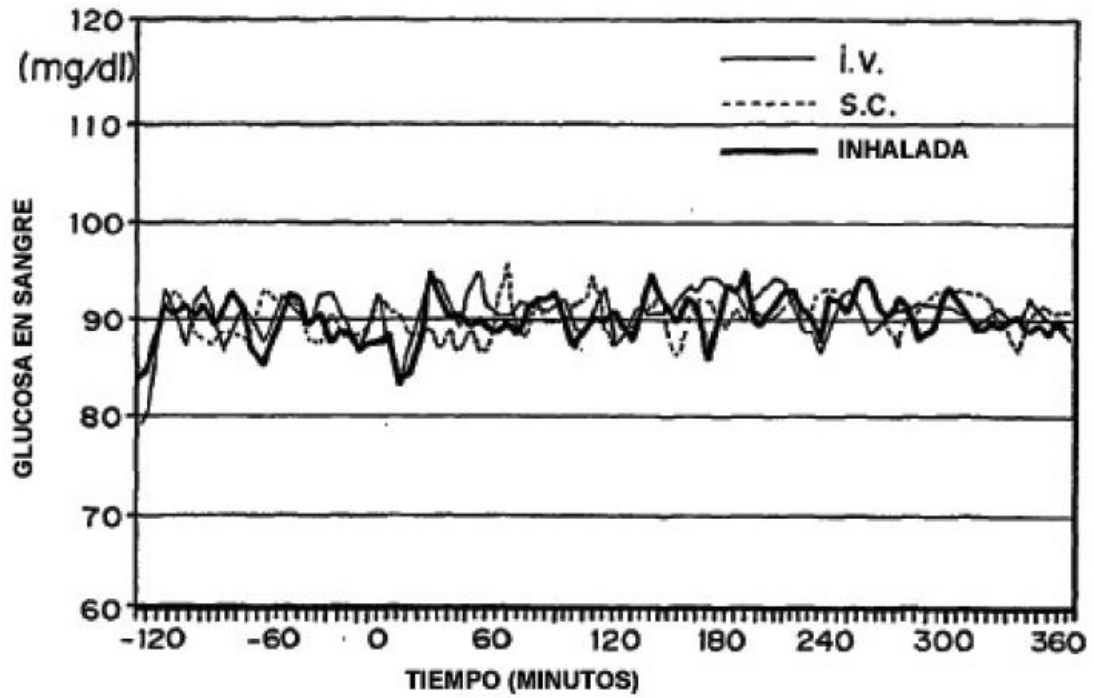


FIG. 1A

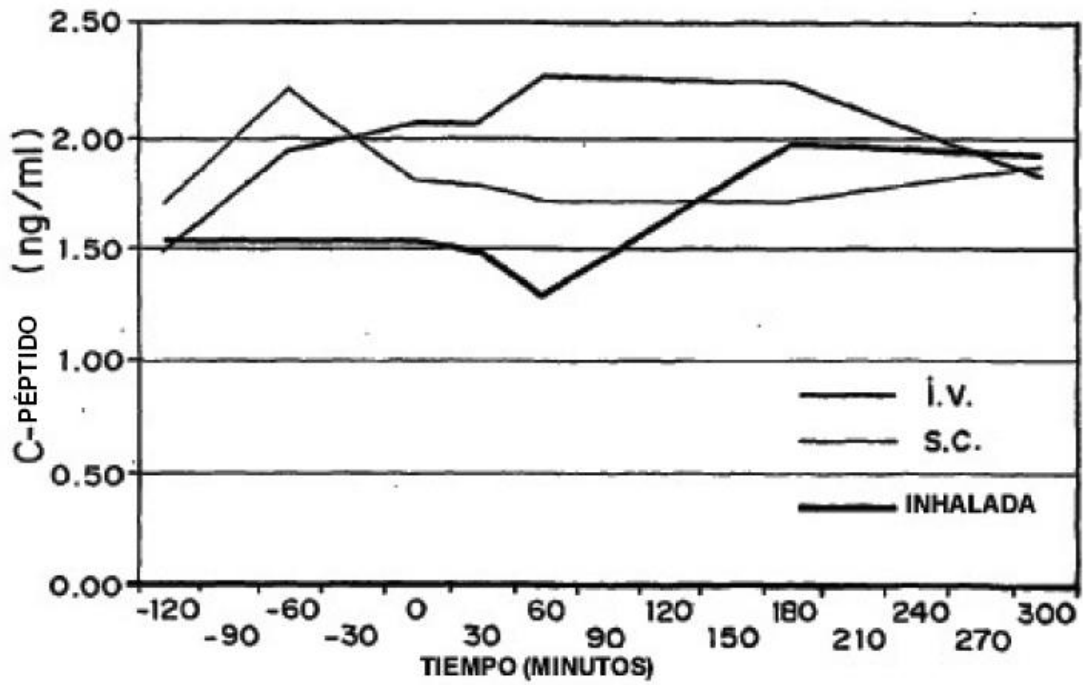


FIG. 1B

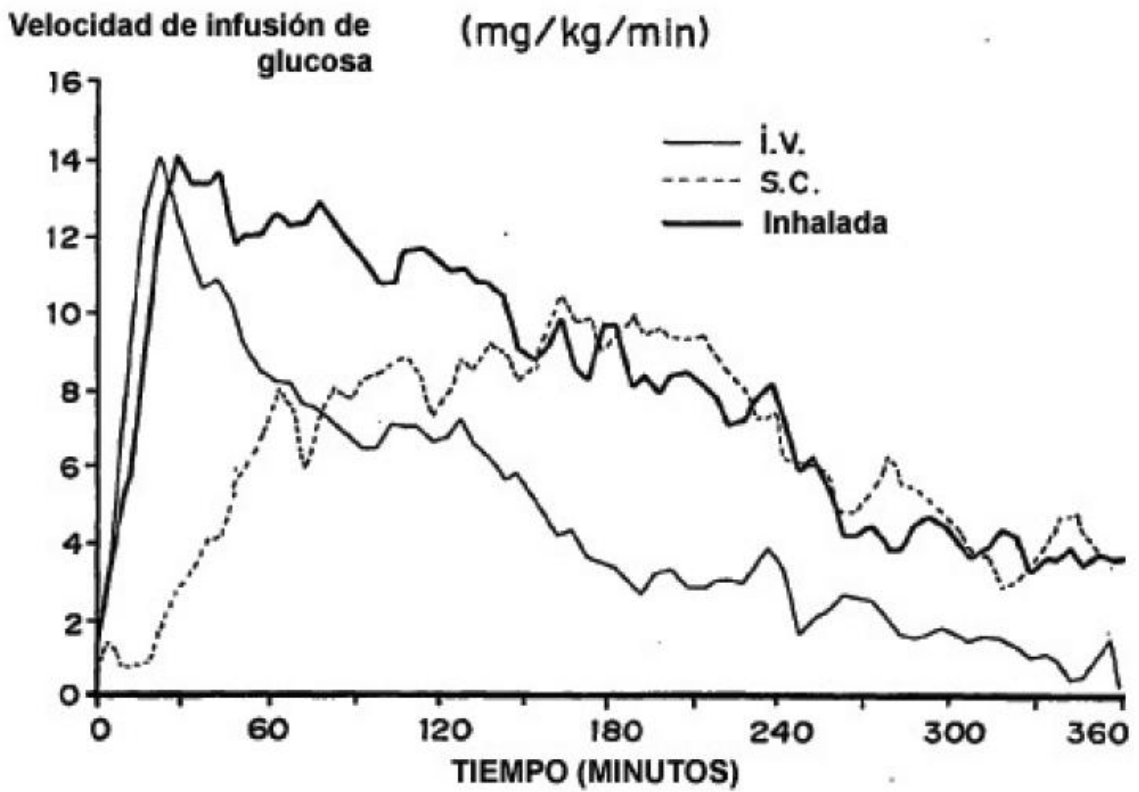


FIG. 2A

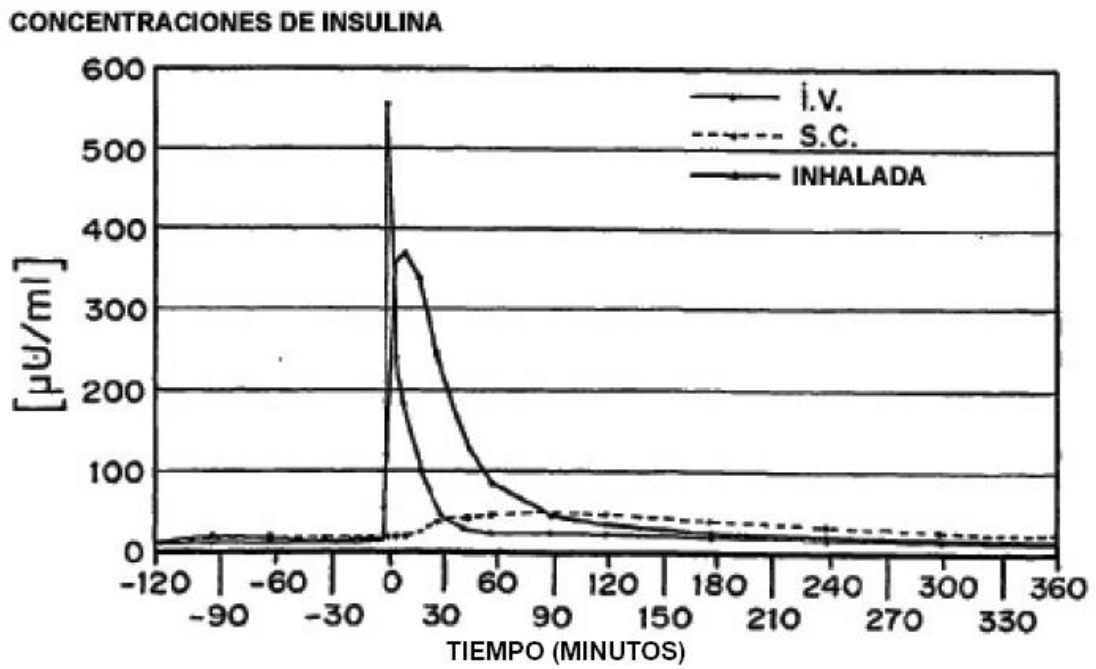


FIG. 2B