

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 707**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/28** (2006.01)  
**A61K 47/00** (2006.01)  
**C07K 1/36** (2006.01)  
**C07D 241/08** (2006.01)  
**A61K 9/14** (2006.01)  
**A61K 9/72** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2000 E 07075344 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 1808438**

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

30 Prioridad:

**29.06.1999 US 141433 P**

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

**14.01.2015**

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:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 526 707 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 péptidos y proteínas en agentes farmacéuticos

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención está en general en el campo de las formulaciones farmacéuticas, y se refiere más particularmente a métodos y composiciones para purificar y estabilizar péptidos y proteínas, tales como insulina, que se usan en aplicaciones farmacéuticas.

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

20 Los diabéticos de Tipo II normalmente presentan una respuesta retardada a incrementos en los niveles de glucosa en sangre. Mientras que las personas normales generalmente 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.

30 La pérdida de secreción de insulina provocada por glucosa es una de las alteraciones más tempranas de la función de las células  $\beta$  (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  $\beta$  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 alteraciones de la secreción de insulina parecen ser adquiridas y pueden ser reversibles al menos parcialmente 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 estado temprano, aquéllos que no tienen pérdida excesiva de función de las células  $\beta$ , es restaurar la liberación de insulina después de las comidas.

40 La mayoría de los diabéticos Tipo II de fase temprana se tratan con agentes orales, pero con poco éxito. Las inyecciones subcutáneas de insulina también raramente son eficaces para proporcionar insulina a los diabéticos Tipo II y, de hecho, pueden empeorar la acción de la insulina debido a un comienzo de acción retrasado, variable, y superficial. Se ha demostrado, sin embargo, que si se administra insulina por vía intravenosa con una comida, los diabéticos Tipo II de estado temprano experimentan la interrupción de la glucogénesis hepática y presentan un control fisiológico aumentado de la glucosa. Además, sus niveles de ácidos grasos libres se reducen a un ritmo mayor que sin la terapia de insulina. Aunque posiblemente sea útil para tratar la diabetes de Tipo II, la administración por vía intravenosa de insulina no es una solución razonable, ya que no es seguro o factible que los pacientes se administren insulina por vía intravenosa con cada comida.

50 La insulina, un polipéptido con un peso molecular nominal de 6,000 Dalton, se ha producido 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, esto es, seis moléculas de insulina recombinante se asocian de manera no covalente en un complejo hexamérico cuando se disuelve en agua en presencia de iones de cinc. La insulina hexamérica no se absorbe rápidamente. Para que la insulina humana se absorba 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 torrente sanguíneo. El retraso en la absorción requiere que la insulina humana recombinante se administre aproximadamente media hora antes de la hora de la comida con el fin de producir el nivel terapéutico de insulina en sangre, lo que puede ser laborioso para los pacientes, que tienen que anticipar con precisión las horas a las que comerán. Para superar este retraso, se han desarrollado análogos de la insulina recombinante humana, tales como HUMALOG™, que se disocian rápidamente en una forma virtualmente monomérica totalmente tras administración subcutánea. Los estudios clínicos han demostrado que HUMALOG™ se absorbe cuantitativamente más rápido que la insulina humana recombinante tras administración subcutánea. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.547.929 de Anderson Jr., et al.

65 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 por vía pulmonar. Por ejemplo, la Patente

de los Estados Unidos N° 5.888.477 de Gonda, et al. divulga hacer que un paciente inhale una formulación de insulina monomérica en aerosol para depositar partículas de insulina en el tejido pulmonar del paciente. Sin embargo, la formulación monomérica es inestable y pierde actividad rápidamente, mientras que la velocidad de captación permanece inalterada.

5 Aunque sería deseable producir insulina rápidamente absorbible derivada de fuentes naturales, la transformación de la forma hexamérica en la forma monomérica, tal como mediante la eliminación del cinc del complejo, produce una insulina que es inestable y tiene una vida útil indeseablemente corta. Por lo tanto, sería deseable proporcionar formar monoméricas de insulina a la vez que se mantiene su estabilidad en ausencia de cinc. También sería ventajoso  
10 proporcionar a los pacientes diabéticos composiciones de insulina monomérica que sean adecuadas para la administración pulmonar, proporcionen rápida absorción, y que puedan producirse en formulaciones listas para usar que tengan una vida útil comercialmente viable.

15 Estos problemas con impurezas, iones metálicos que afectan a la estabilidad o biodisponibilidad, suceden con muchas otras proteínas y péptidos.

La Patente de los Estados Unidos N° 6.071.497 de Steiner, et al., divulga sistemas de administración de fármacos en micropartículas en los que el fármaco se encapsula 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 a un pH tanto ácido como básico, pero que son  
20 inestables a un pH de entre aproximadamente 6,4 y 8. La patente no describe composiciones de insulina monomérica que sean adecuadas para administración pulmonar, que proporcionen rápida absorción, y que puedan producirse en formulaciones listas para usar que tengan una vida útil comercialmente viable.

Sería por tanto ventajoso desarrollar composiciones alternativas de administración de insulina para diabéticos Tipo II  
25 que proporcionen elevación más rápida de los niveles de insulina en sangre y que administren con facilidad para asegurar el cumplimiento por parte del paciente. También sería deseable aplicar las composiciones y métodos de administración a otros agentes biológicamente activos.

30 La presente solicitud describe métodos mejorados para purificar péptidos y proteínas, especialmente en la preparación de composiciones adecuadas para administración pulmonar.

La presente solicitud describe composiciones estables de péptidos monoméricos adecuadas para administración pulmonar.

35 La presente solicitud describe métodos y composiciones para el transporte facilitado de insulina y otros agentes biológicamente activos a través de membranas biológicas.

La presente solicitud describe métodos y composiciones para la absorción mejorada de insulina u otros agentes biológicamente activos en el torrente sanguíneo.  
40

La presente solicitud describe métodos y composiciones para la absorción mejorada de insulina u otros agentes biológicamente activos en el torrente sanguíneo caracterizados por su facilidad de administración.

**Sumario de la invención**

45 La presente invención proporciona una formulación en polvo seco para su uso en medicina que comprende micropartículas de dicetopiperazina recubiertas con un principio activo, en las que el principio activo es una proteína o péptido terapéutico, profiláctico o diagnóstico, y en la que el recubrimiento se forma combinando el principio activo con micropartículas preformadas de la dicetopiperazina. La formulación en polvo seco puede proporcionarse para su  
50 uso en medicina mediante administración a un sujeto con un inhalador de polvo seco y/o para su uso en medicina mediante dispensación al sujeto por inhalación. La formulación en polvo seco puede proporcionarse para su uso en medicina mediante dispensación pulmonar a un sujeto.

55 La proteína o péptido terapéutico, profiláctico o diagnóstico puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en un agente vasoactivo, un agente neuroactivo, una hormona, un anticoagulante, un agente inmunomodulador, un agente citotóxico, un antibiótico, un antiviral, un antígeno o un anticuerpo; o seleccionarse del grupo que consiste en una hormona, citocina u otro péptido inmunomodulador, un antígeno o una vacuna. En una realización preferida, es insulina humana natural o recombinante. En otra realización preferida, es una forma estabilizada de insulina que se ha purificado para retirar el cinc.  
60

El recubrimiento puede, de manera opcional, formarse mediante un método que comprende proporcionar una suspensión de micropartículas de dicetopiperazina, añadir una solución de principio activo que es insulina en una forma hexamérica, retirar los iones de cinc lavando con un disolvente y después liofilizar o criodesecar para proporcionar las micropartículas de dicetopiperazina recubiertas.  
65

Las micropartículas en la formulación en polvo seco de la presente invención pueden comprender de manera opcional del 0,1 % al 50 % en peso del péptido o proteína terapéutica, profiláctica o diagnóstica.

En una realización preferida de la presente invención, la dicetopiperazina es dicetopiperazina de fumarilo.

5 La presente invención también proporciona un inhalador de polvo seco que comprende una formulación de polvo seco de acuerdo con la presente invención. Adicionalmente, el inhalador de polvo seco se proporciona para su uso en medicina, mediante dispensación de la formulación de polvo seco a un sujeto por inhalación.

10 En el presente documento se describen métodos para purificar péptidos y proteínas incorporando el péptido o proteína en una dicetopiperazina o un agente de complejación competitivo para facilitar la retirada de una o más impurezas, es decir, componentes no deseados, del péptido o proteína.

15 En una realización preferida, un péptido, tal como insulina que contiene una o más impurezas, por ejemplo, iones de cinc, se atrapa en dicetopiperazina para formar un precipitado de péptido/dicetopiperazina/impureza, que después se lava con un disolvente para eliminar la impureza, que es una sustancia no disolvente para la dicetopiperazina y una sustancia no disolvente para el péptido. Como alternativa, la impureza puede eliminarse usando agentes complejantes para que formen complejos de manera selectiva con y desplacen a las impurezas, por ejemplo, mediante diálisis.

20 También se describen formulaciones y métodos para el transporte mejorado de principios activos a través de membranas biológicas, que dan como resultado, por ejemplo, un rápido aumento en la concentración del agente en sangre. Las formulaciones incluyen micropartículas formadas de (i) un principio activo, el cual puede ser cargado o neutro, y (ii) un mejorador de transporte que enmascara la carga del agente y/o que forma enlaces de hidrógeno con la membrana biológica diana para facilitar el transporte.

25 La presente invención proporciona una formulación en polvo seco para su uso en medicina que comprende micropartículas de dicetopiperazina recubiertas con un principio activo, en la que el principio activo es un péptido o proteína terapéutica, profiláctica o diagnóstica, y en la que el recubrimiento se forma combinando al principio activo con micropartículas preformadas de dicetopiperazina. En una realización preferida, el principio activo es insulina, y la formulación en polvo seco se administra mediante dispensación pulmonar de micropartículas que comprenden dicetopiperazina de fumarilo e insulina en su forma biológicamente activa. La carga sobre la molécula de insulina se enmascara mediante el hidrógeno uniéndola a la dicetopiperazina, permitiendo así a la insulina pasar a través de la membrana diana. Este método de dispensar insulina da como resultado un rápido aumento de la concentración de insulina en sangre que es comparable con el incremento resultante de administración intravenosa.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a es un gráfico de valores medios de glucosa en sangre con el tiempo (minutos).

40 La Figura 1b es un gráfico de concentraciones medias de péptido C durante experimentos que comparan niveles de péptido C (ng/ml) con el tiempo (minutos) cuando se administró insulina por vía intravenosa, subcutánea, y por inhalación.

La Figura 2a es un gráfico de velocidad de infusión de glucosa (mg/kg/min) con el tiempo (minutos) que compara insulina administrada por vía intravenosa, subcutánea y por inhalación.

45 La Figura 2b es un gráfico de concentraciones medias de insulina ( $\mu$ U/ml) con el tiempo (minutos) que compara la insulina administrada por vía intravenosa, subcutánea y por inhalación.

### Descripción Detallada de la Invención

50 Tal como se describe en el presente documento, la encapsulación o atrapamiento de polímeros grandes, tales como proteínas y péptidos, en dicetopiperazinas puede usarse para eliminar impurezas o contaminantes tales como iones metálicos u otras moléculas pequeñas. La presente invención se basa en un proceso de combinación de un principio activo con micropartículas preformadas de dicetopiperazina, formando de este modo un recubrimiento del principio activo en las micropartículas de dicetopiperazina, en el que el principio activo es un péptido o proteína terapéutica, profiláctica o diagnóstica. En esta forma, el principio activo de péptido o proteína está complejado a las micropartículas de dicetopiperazina. Las dicetopiperazinas también sirven tanto para estabilizar como para mejorar la dispensación de los péptidos o proteínas complejadas. También se han desarrollado formulaciones para el transporte mejorado de principios activos de péptido o proteína a través de membranas biológicas. Estas formulaciones incluyen micropartículas formadas de micropartículas preformadas de dicetopiperazina y principios activos de péptido o proteína recubierto sobre ellas, que pueden ser cargados o neutros. La dicetopiperazina puede enmascarar la carga del principio activo de péptido o proteína y/o puede formar enlaces de hidrógeno con la membrana. Las formulaciones pueden proporcionar aumentos rápidos de la concentración del principio activo de péptido o proteína en sangre tras la administración de las formulaciones.

65 Por ejemplo, se descubrió que puede administrarse insulina hexamérica al pulmón en formulación de dicetopiperazina de fumarilo, alcanzando concentraciones máximas en sangre en 3-10 minutos. Por el contrario, la insulina administrada por vía pulmonar sin dicetopiperazina de fumarilo normalmente tarda entre 25-60 minutos en alcanzar

concentraciones máximas en sangre, mientras que la insulina hexamérica tarda 30-90 minutos en alcanzar el nivel máximo en sangre por inyección subcutánea. Este logro se ha replicado exitosamente en diversas ocasiones y en diversas especies, incluyendo seres humanos.

5 La eliminación del cinc de la insulina normalmente produce insulina inestable con una vida útil indeseablemente corta. La purificación para eliminar el cinc, la estabilización y la administración mejorada de insulina se demuestra con los ejemplos. Se descubrió que las formulaciones de insulina atrapada en dicetopiperazina de fumarilo son estables y que tienen una vida útil aceptable. La medición de los niveles de cinc demostró que el cinc había sido ampliamente eliminado durante el proceso de atrapamiento, produciendo insulina monomérica en una formulación de administración estable.

10 Se ha observado una rápida absorción de una serie de péptidos distintos, incluyendo calcitonina de salmón, hormona paratiroidea 1-34, octreotida, leuprolida y péptido RSV, cuando el péptido se administra por vía pulmonar en dicetopiperazina de fumarilo proporcionando concentraciones máximas en sangre en 3-10 minutos tras la administración pulmonar.

## **I. Materiales**

### **A. Agente a administrar**

20 De acuerdo con la divulgación de la presente solicitud, el agente a administrar se cita en el presente documento como el principio activo, o molécula a encapsular o atrapar. Para los fines de la invención reivindicada en el presente documento, es un péptido o proteína terapéutica, profiláctica o diagnóstica, que se atrapa recubriendo el péptido sobre micropartículas preformadas de dicetopiperazina. El péptido o proteína por lo tanto está complejada a las micropartículas de dicetopiperazina. El péptido o proteína puede ser o no una especie cargada.

25 No se conoce el mecanismo exacto por el que las dicetopiperazinas forman un complejo con el principio activo de péptido o proteína a administrar, pero se cree que las dicetopiperazinas forman un complejo con el principio activo de péptido o proteína a purificar. Este proceso se cita en el presente documento de manera intercambiable como atrapamiento o complejación.

30 Los materiales que pueden complejarse con dicetopiperazina pueden ser cualquier polímero o moléculas orgánicas grandes, más preferentemente péptidos y proteínas. Para los propósitos de la invención reivindicada en el presente documento, es un péptido o proteína terapéutica, profiláctica o diagnóstico. También se divulgan compuestos inorgánicos y orgánicos sintéticos, polisacáridos y otros azúcares, lípidos y secuencias de ácidos nucleicos que tienen actividades terapéuticas, profilácticas o diagnósticas. Las proteínas se definen como consistentes en 100 restos de aminoácidos o más; los péptidos son de menos de 100 restos de aminoácidos. A menos que se indique lo contrario, el término proteína se refiere tanto a proteínas como a péptidos. El péptido o proteína a complejar de acuerdo con la presente invención puede tener varias actividades biológicas, tales como de agentes vasoactivos, agentes neuroactivos, hormonas, anticoagulantes, agentes inmunomoduladores, agentes citotóxicos, antibióticos, antivirales, antígenos, y anticuerpos. En algunos casos, los principios activos de péptido o proteína pueden ser anticuerpos o antígenos que de otro modo tendrían que administrarse por inyección para obtener una respuesta adecuada.

45 Los péptidos y proteínas preferidas incluyen hormonas, citocinas y otros péptidos inmunomoduladores, y antígenos/vacunas. En una realización preferida, el principio activo de péptido o proteína es insulina monomérica o una forma estabilizada de insulina que se ha purificado para eliminar el cinc. En otra realización preferida, el principio activo de péptido o proteína es glucagón.

50 El principio activo de péptido o proteína, o fármaco puede ser un antígeno, donde se pretende que la molécula suscite una respuesta inmune protectora, especialmente contra un agente que preferencialmente infecta los pulmones, tal como micoplasma, bacterias que causan neumonía, y virus respiratorio sincitial. En estos casos, también puede ser útil administrar el fármaco en combinación con un adyuvante, para aumentar la respuesta inmune al antígeno.

55 Las impurezas que pueden eliminarse de la composición del principio activo de péptido o proteína incluyen iones de metal, tales como cinc, y otros iones di- o multivalentes, y moléculas pequeñas inorgánicas y restos de disolventes.

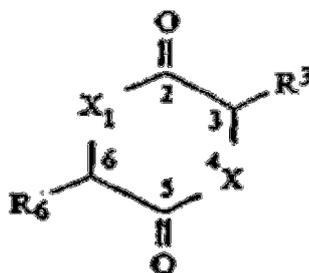
### **B. Dicetopiperazinas**

60 Se describen dicetopiperazinas y métodos útiles en las presentes composiciones, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 6.071.497.

#### **(i): Fórmula general**

65 Las dicetopiperazinas son anillos rígidos planos con al menos seis átomos de anillo conteniendo heteroátomos y pares de electrones sin enlazar. También se divulgan dicetomorfolino y dicetodioxano. Aunque es posible sustituir un

nitrógeno con un átomo de azufre, esto no produce una estructura estable.  
La fórmula general para dicetopiperazina y sus análogos se muestra a continuación.



5 En la que  $R_3$  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 cuaternario, guanidina, anilina, derivados heterocíclicos, tales como piridina y morfolina, o una cadena zwitteriónica  $C_{1-20}$ , que contiene al menos un grupo ácido y al menos un grupo básico, por ejemplo, los arriba descritos en los que las cadenas laterales pueden además funcionalizarse con un oxígeno o alquino en cualquier posición, uno o más de los carbonos en la cadena lateral puede sustituirse con un oxígeno, por ejemplo, para proporcionar cadenas cortas de polietilenglicol, uno o más carbonos pueden funcionalizarse con un grupo ácido o básico, como se describe anteriormente, y en donde los átomos X del anillo en posiciones 1 y 4 son O N.

10 Los ejemplos de cadenas laterales ácidas incluyen, pero sin limitación, a cis y trans  $-CH=CH-CO_2H$ ,  $-CH(CH_3)=CH(CH_3)-CO_2H$ ,  $-(CH_2)_3-CO_2H$ ,  $-CH_2CH(CH_3)-CO_2H$ ,  $-CH(CH_2CO_2H)=CH_2$ . ácido (tetrafluoro) benzoico, ácido benzoico y  $-CH(NHC(O)CF_3)-CHrCO_2H$ . Los 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  $-(CH_2)_4NHC(O)CH(NH_2)CH(NH_2)CO_2H$ .

Ejemplos de cadenas laterales zwitteriónicas incluyen, pero sin limitación,  $-CH(NH_2)-CH_2-CO_2H$  y  $-NH(CH_2)_{1-20}CO_2H$ .

25 El término aralquilo hace referencia a un grupo arilo con un sustituyente alquilo.

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

El término alcarilo se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente arilo.

30 El término alquilo-heterocíclico se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente heterocíclico.

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.

35 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  $C_{10}$ .

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

Dicetopiperazina de fumarilo es la más preferida para aplicaciones pulmonares.

#### (ii). Síntesis

45 Las dicetopiperazinas pueden formarse por ciclodimerización de derivados de éster de aminoácido, como se describe por Katchalski, et al., J. Amer. Chem. Soc. 68:879-80 (1946), por ciclación de derivados de éster dipéptido, o por deshidratación térmica de derivados de aminoácidos en disolventes de elevado punto de ebullición, como se describe por Kopple, et al., J. Org. Chem. 33(2):862-64 (1968). La 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 de Kopple en J. Org. Chem., seguido de la eliminación de los grupos bloqueantes (P) con HBr 4,3 M en ácido acético. Se prefiere esta ruta porque usa un material de partida comercialmente disponible, implica condiciones de reacción que se informa que conservan la estereoquímica de los materiales de partida en el producto y todas las etapas pueden escalarse fácilmente para la fabricación.

55 Los derivados de dicetomorfolina y dicetooxetano pueden prepararse mediante ciclación paso a paso de un modo similar al divulgado en Katchalski, et al., J. Amer. Chem. Soc. 68:879-80 (1946).

Las dicetopiperazinas pueden marcarse radiactivamente. Los medios para unir marcadores radiactivos son conocidos por los expertos en la técnica. Pueden prepararse dicetopiperazinas marcadas radiactivamente pueden ser preparadas, por ejemplo, reaccionando gas de tritio con los compuestos antes listados que contienen un doble o triple enlace. Un carbono marcado radiactivamente con carbono 14 puede incorporarse en la cadena lateral utilizando precursores marcados con  $^{14}\text{C}$  que están fácilmente disponibles. Estas dicetopiperazinas marcadas radiactivamente pueden detectarse *in vivo* después de que las micropartículas resultantes se administren a un sujeto.

(a) Síntesis de Derivados Simétricos de Dicetopiperazina

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.

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 se succinila exhaustivamente 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 en condiciones apropiadas, la sustancia se separa de la solución como micropartículas.

Otros compuestos preferidos pueden obtenerse sustituyendo el grupo (o los grupos) succinilo en el compuesto anterior con grupos glutarilo, maleilo o fumarilo.

(b) Síntesis de Derivados de Dicetopiperazina Asimétricos

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

Los Derivados de dicetopiperazina con cadenas laterales ácidas protegidas, tales como ciclo-Lys(P)Lys(P), en los que P es un grupo benciloxicarbonilo, u otro grupo protector conocido por los expertos en la técnica, pueden desprotegerse selectivamente. Los grupos protectores pueden escindirse selectivamente 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, pueden obtenerse 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 separarse por precipitación y extracción selectiva. Un disolvente apropiado, por ejemplo, éter, puede añadirse a dichas mezclas de reacción para precipitar todas estas sustancias juntas. Esto puede detener la reacción de desprotección antes de que se complete por eliminación de las dicetopiperazinas de los reactantes utilizados para desproteger los grupos protectores. Al agitar el precipitado mezclado con agua, las especies reaccionadas parcialmente y completamente pueden disolverse como sales en el medio acuoso. Puede eliminarse la sustancia inicial no reaccionada por centrifugación o filtración. Ajustando el pH de la solución acuosa a una condición débilmente alcalina, el producto monoprottegido asimétrico que contiene un grupo protector único precipita de la solución, dejando en solución la sustancia completamente desprotegida.

En el caso de derivados de dicetopiperazina con cadenas laterales básicas, también pueden desprotegerse de manera selectiva los grupos básicos Como se describe anteriormente, puede detenerse 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, puede eliminarse 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 monoprottegido se precipita fuera de la solución y puede aislarse.

Se pueden desproteger de manera selectiva derivados zwitteriónicos de dicetopiperazina, como se describe anteriormente. En el último paso, al ajustar el pH a una condición ligeramente ácida precipita el compuesto monoprottegido con un grupo ácido libre. Al ajustar el pH a una condición ligeramente básica se precipita el compuesto monoprottegido con un grupo básico libre.

La eliminación limitada de grupos protectores por otros mecanismos, incluyendo, pero sin limitación, a escindir grupos protectores que se escinden por hidrogenación utilizando una cantidad limitada de gas hidrógeno en presencia de catalizadores de paladio. El producto resultante es también un derivado asimétrico de dicetopiperazina desprotegido parcialmente. Estos derivados pueden aislarse esencialmente como se describe anteriormente.

Se hace reaccionar la dicetopiperazina monoprottegida 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 zwitteriónicas.

Pueden obtenerse otras sustancias que presentan esta respuesta al pH funcionalizando los nitrógenos del anillo de amida del anillo de dicetopiperazina.

## 5 **Mejoradores de Transporte**

En una realización preferida, el principio activo de péptido o proteína se compleja con una dicetopiperazina como un mejorador de transporte que es degradable y capaz de formar enlaces de hidrógeno con la membrana biológica diana para facilitar el transporte del agente a través de la membrana. El mejorador de transporte también es capaz de formar enlaces de hidrógeno con el principio activo de péptido o proteína si está cargado, para enmascarar la carga y facilitar el transporte del agente a través de la membrana.

El mejorador de transporte de dicetopiperazina es preferentemente biodegradable y puede proporcionar liberación lineal, pulsada o en masa del principio activo de péptido o proteína.

Un mejorador de transporte preferido es dicetopiperazina de fumarilo. Anteriormente se describen otras dicetopiperazinas que pueden ser útiles como mejoradoras de transporte.

Como la mayoría de las proteínas y péptidos, la insulina es una molécula cargada, lo que dificulta su capacidad para 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 de este modo el paso de la insulina a través de las membranas, tales como las membranas mucosales, y a la sangre.

## 25 **II. Métodos**

### 25 **A. Encapsulación**

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

Como alternativa, un principio activo puede encapsularse (b) dentro de micropartículas disolviendo una dicetopiperazina con cadenas laterales básicas en una solución acídica, tal como ácido cítrico 1 M, añadiendo el principio activo en solución o suspensión, y luego precipitando la micropartícula añadiendo bicarbonato u otra solución básica.

Como alternativa puede encapsularse un principio activo (c) dentro de micropartículas disolviendo una dicetopiperazina con cadenas laterales acídicas y básicas, añadiendo el principio activo en solución o suspensión para encapsularse, precipitando luego la micropartícula neutralizando la solución.

Las micropartículas pueden almacenarse en estado seco y suspenderse para su administración a un paciente. En la opción (a) las micropartículas reconstituidas mantienen su estabilidad en un medio acídico y se disocian a medida que el medio se aproxima al pH fisiológico en el intervalo entre 6 y 14. En la opción de realización (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 acídico o básico y se disocian a medida que el medio se aproxima al pH fisiológico en el intervalo entre 6 y 8.

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

### 55 **B. Atrapamiento /Complejación**

La invención reivindicada en el presente documento proporciona una alternativa al proceso de encapsulación discutido en la sección A. Más específicamente, la invención reivindicada en el presente documento proporciona micropartículas preformadas de dicetopiperazina recubiertas con el principio activo de péptido o proteína, en las que el principio activo de péptido o proteína está complejado a la dicetopiperazina.

En una realización, se preparan micropartículas de dicetopiperazina y se proporcionan en una suspensión, normalmente una suspensión acuosa, a la que se añade a continuación una solución del principio activo de péptido o proteína. Posteriormente, la solución se liofiliza o criodeseca para dar las micropartículas de dicetopiperazina con una cobertura de péptido. En una realización preferida, el principio activo de péptido o proteína es insulina en una forma hexamérica. Entonces pueden eliminarse los iones de cinc lavando las micropartículas con un disolvente apropiado.

Tal como se usa en el presente documento, el término "atrapado" con referencia a un principio activo de péptido proteína en/con una dicetopiperazina se refiere al recubrimiento del principio activo de péptido o proteína sobre micropartículas de la dicetopiperazina.

- 5 Se ha descubierto que las micropartículas de dicetopiperazina tienen una mayor afinidad por la insulina que la que tiene el cinc. Se ha descubierto 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:

10

### C Administración

Las composiciones de polvo seco de principio activo de péptido o proteína recubierta sobre micropartículas de dicetopiperazina preformadas como se describe en el presente documento pueden administrarse a pacientes en necesidad del principio activo. Las composiciones en forma de micropartículas se administran preferiblemente en forma de un polvo seco, que puede ser para administración pulmonar, o suspendidas en un vehículo farmacéutico apropiado, tal como solución salina.

15

Las micropartículas se almacenan preferiblemente en forma seca o liofilizada hasta inmediatamente antes de la administración. Posteriormente pueden administrarse las micropartículas directamente como un polvo seco, tal como por inhalación utilizando, por ejemplo, inhaladores de polvo seco conocidos en la técnica. Como alternativa, las micropartículas pueden suspenderse en un volumen suficiente de vehículo farmacéutico, por ejemplo, tal como una solución acuosa para administración como un aerosol.

20

- 25 Las micropartículas también pueden administrarse por vía oral, subcutánea e intravenosa.

Las composiciones pueden administrarse a cualquier membrana biológica diana, preferiblemente una membrana mucosal de un paciente. En una realización preferida, el paciente es un ser 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.

30

En una realización preferida, la insulina hexamérica se atrapa 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.

35

La proporción de carga del fármaco a administrar es normalmente entre un 0,01 % y un 90 %, dependiendo de la forma y tamaño del fármaco a administrar y del tejido diana.

40

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 principio activo de péptido o proteína complejada/atrapada, la velocidad de su liberación de las micropartículas, y, en una realización preferida, el nivel de glucosa en sangre del paciente.

- 45 Una aplicación preferida está en el tratamiento de la hiperinsulinemia. En una realización preferida, el principio activo de péptido o proteína es glucagón que puede administrarse por infusión subcutánea continua. El glucagón es un péptido extremadamente inestable, pero puede estabilizarse en complejación a partículas de dicetopiperazina, por ejemplo. Las composiciones y métodos descritos en el presente documento se describen adicionalmente por los siguientes ejemplos.

50

#### Ejemplo 1: Eliminación del cinc de la insulina inyectable U.S.P.

Se analizó insulina atrapada en dicetopiperazina de fumarilo para determinar si el cinc se eliminó durante el proceso de atrapamiento. La insulina utilizada como material de partida 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 tal como se describe anteriormente.

55

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 neta. Utilizando el certificado del valor del análisis, se calculó que se 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.

60

65

**Ejemplo 2: Biodisponibilidad de insulina en la formulación pulmonar de dicetopiperazina**Sujetos y Métodos

- 5 Se revisó y aprobó el estudio por el comité de revisión ético de la Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, y se llevó a cabo conforme a las regulaciones locales, a la Declaración de Helsinki y a las normas de la Buena Práctica Clínica.

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<sup>2</sup>, capacidad de alcanzar máximo flujo respiratorio de 4 l/seg medido por espirometría asistida por ordenador y un PEV<sub>1</sub> igual o mayor a 80% del normal previsto (FEV<sub>1</sub> = 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 otros fármacos, historial significativo de enfermedad cardiovascular, respiratoria, gastrointestinal, hepática, renal, neurológica, psiquiátrica y/o hematológica, infección en curso del tracto respiratorio o sujetos definidos como fumadores con evidencia o historial de uso de tabaco o nicotina.

Realización del Estudio

20 En la mañana de los días de estudio, los sujetos venían al hospital (en ayunas, 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 constante intravenosa de insulina humana, la cual se mantenía en 0,15 mU min<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> 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 pinza de glucosa por un sistema de infusión controlada de glucosa (BIOSTATOR™). El algoritmo de pinza 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 pinza 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.

Bioeficacia y Biodisponibilidad

40 Para determinar la bioeficacia, se calcularon las áreas bajo la curva de los índices de infusión de glucosa durante las primeras 3 horas (ABC<sub>0-180</sub>) tras la administración y durante el periodo total de observación de seis horas tras la administración (ABC<sub>0-360</sub>) 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 (ABC<sub>0-180</sub>) tras la administración y durante el periodo total de observación de seis horas tras la administración (ABC<sub>0-360</sub>) y se correlacionaron con la cantidad de insulina aplicada.

45 En el estudio de pinza, 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 pH particulares normalmente un pH bajo Se producen normalmente para tener un diámetro medio entre 1 y unos 5 µm.

Resultados

55 Los resultados farmacocinéticos se ilustran en las Figuras 1 y 2 y en la Tabla 1.

Resultados de Eficacia

60 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 los iniciales después de 180 min (i.v.: 60 min, s.c. 360 min). La acción biológica 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.

**Tabla 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	14 min	39 min	163 min
T-50%**	82 min	240 min	240 min
T a línea base	240 min	>360 min	>360 min
<u>Parámetros Calculados sobre Niveles de Insulina</u>	<u>Administración Intravenosa</u>	<u>Inhalada</u>	<u>Administración Subcutánea</u>
T50%*	2 min	2,5 min	27 min
T máx	5 min	13 min	121 min
T-50%**	6 min	35 min	250 min
T a inicial	60 min	180 min	360 min
* tiempo desde inicio a valores semimáximos			
** tiempo desde inicio a valores semimáximos tras pasar Tmax			

### Resultados de Seguridad

5 Se demostró 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.

### Conclusiones

10 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

15 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.

20 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.

25 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**

30 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 atraparlo 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

40 Se formuló glucagón en condiciones estériles, en un complejo estabilizado por precipitación en solución ácida con dicetopiperazina de fumarilo (3,6-bis[N-fumarilo-N-(n-butyl)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") que contiene entre un 1,2 a un 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

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.

#### 5 Análisis HPLC de Glucagón

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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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 de volumen de Tris 1 M pH 10,0 a la muestra para solubilizar la dicetopiperazina de fumarilo.

#### 15 Protocolo de Estudio en Ratas

Se pusieron en ayunas ratas Sprague Dawley de 200-250 g 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). Se determinó el valor inicial medio (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.

#### 25 Resultados

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.

El polvo liofilizado estéril 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.

#### 35 Conclusión

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**

- 5 1. Una formulación en polvo seco para su uso en medicina que comprende micropartículas de dicetopiperazina recubiertas con un principio activo, en la que el principio activo es un péptido o una proteína terapéuticos, profilácticos o diagnósticos, y en la que el recubrimiento se forma recubriendo el principio activo con micropartículas preformadas de dicetopiperazina.
- 10 2. La formulación en polvo seco de la reivindicación 1, para su uso en medicina mediante administración a un sujeto con un inhalador de polvo seco.
3. La formulación en polvo seco de las reivindicaciones 1 o 2, para su uso en medicina mediante administración a un sujeto por inhalación.
- 15 4. La formulación en polvo seco de cualquier reivindicación anterior, para su uso en medicina mediante dispensación pulmonar a un sujeto.
- 20 5. La formulación en polvo seco para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que el principio activo es un agente vasoactivo, un agente neuroactivo, una hormona, un anticoagulante, un agente inmunomodulador, un agente citotóxico, un antibiótico, un antiviral, un antígeno o un anticuerpo.
- 25 6. La formulación en polvo seco para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que la proteína o el péptido terapéuticos, profilácticos o diagnósticos son una hormona, una citocina u otro péptido inmunomodulador, un antígeno o una vacuna.
- 30 7. La formulación en polvo seco para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que el principio activo es insulina humana natural o recombinante.
8. La formulación en polvo seco para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que el principio activo es una forma estabilizada de insulina que se ha purificado para eliminar el cinc.
- 35 9. La formulación en polvo seco para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que el recubrimiento se forma mediante un método que comprende proporcionar una suspensión de micropartículas de dicetopiperazina, añadir una solución de principio activo que es insulina en una forma hexamérica, retirar iones de cinc lavando con un disolvente, y después liofilizar o criodesecar para dar las micropartículas de dicetopiperazina recubiertas.
- 40 10. La formulación en polvo seco para el uso de la reivindicación 1, en la que las micropartículas comprenden del 0,1 % al 50 % en peso del péptido o de la proteína terapéuticos, profilácticos o diagnósticos.
11. La formulación en polvo seco para el uso de cualquier reivindicación anterior, en la que la dicetopiperazina es dicetopiperazina de fumarilo.
- 45 12. Un inhalador de polvo seco que comprende una formulación en polvo seco como se define en cualquier reivindicación anterior.
13. El inhalador de polvo seco de la reivindicación 12 para su uso en medicina, mediante dispensación de la formulación en polvo seco a un sujeto por inhalación.

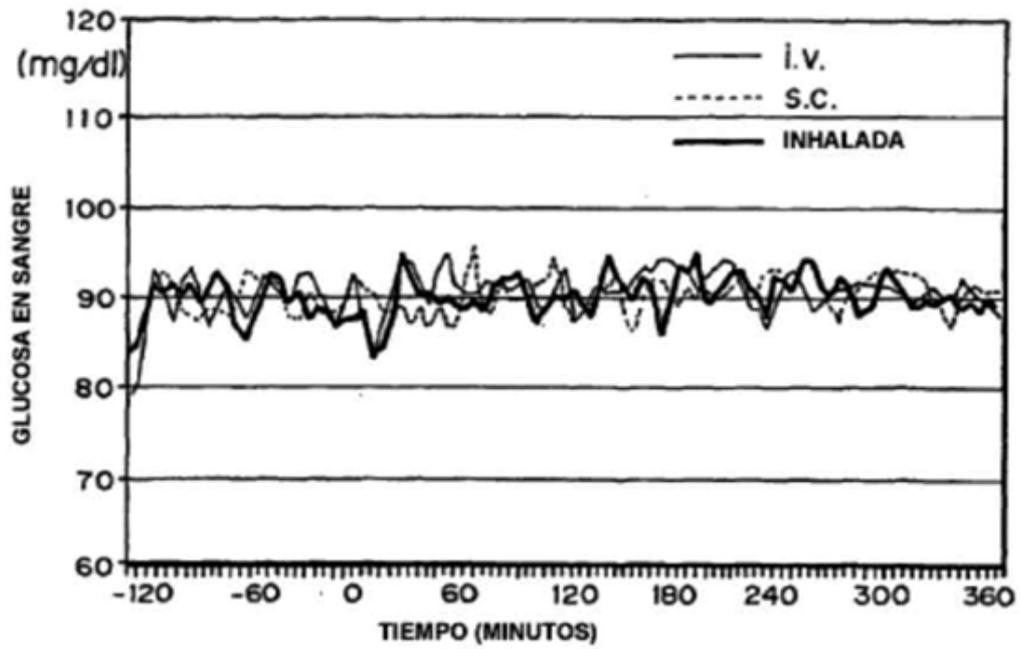


FIG. 1A

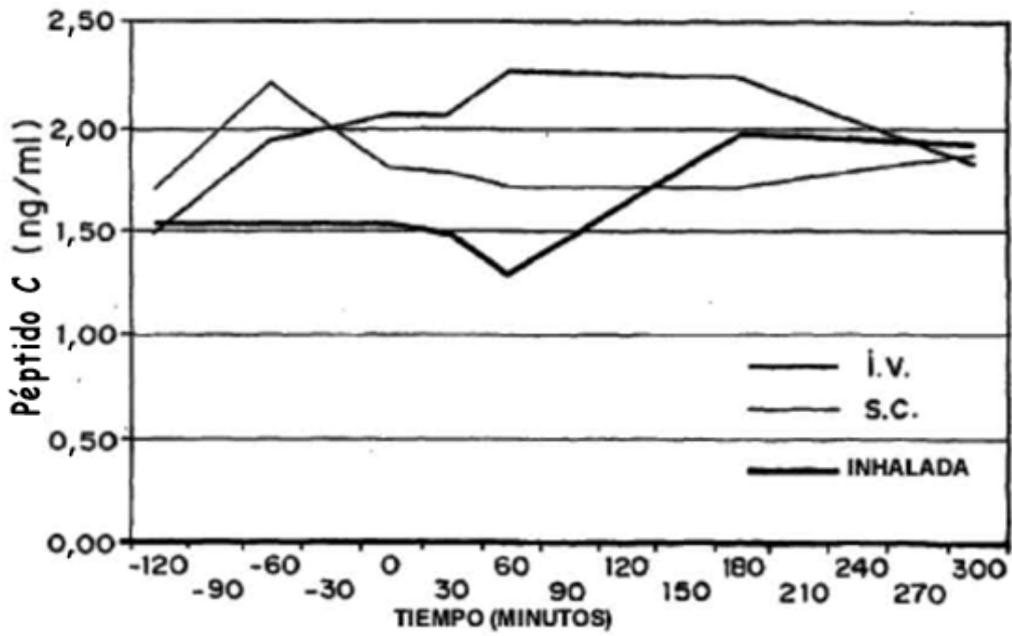
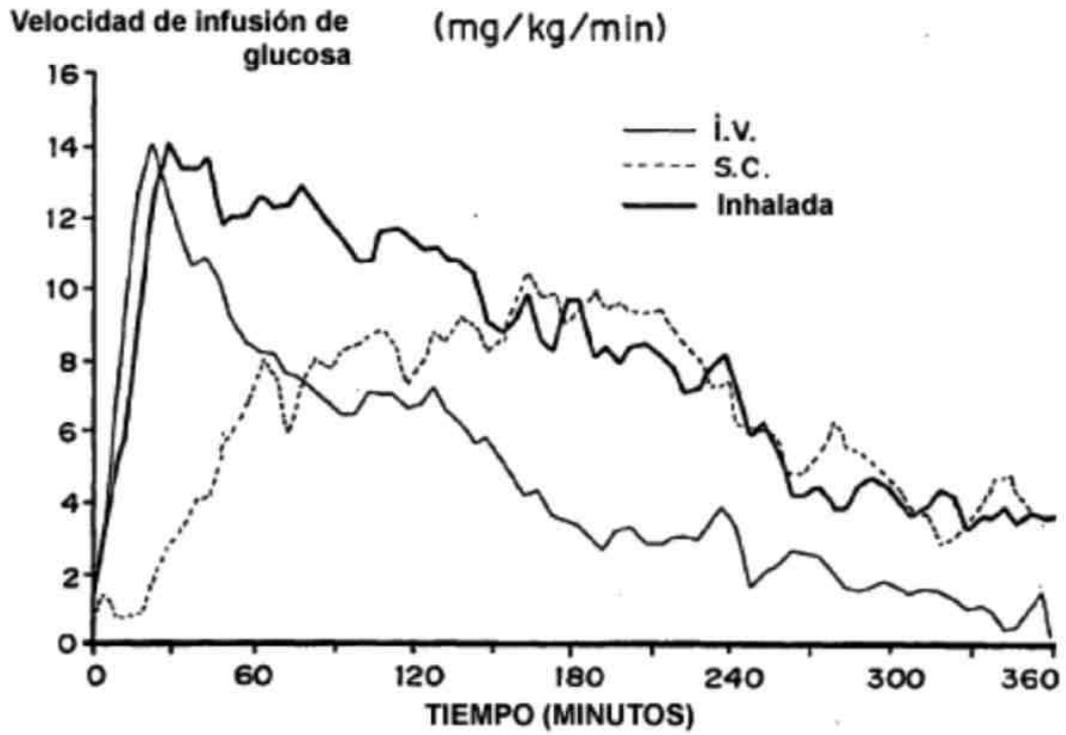
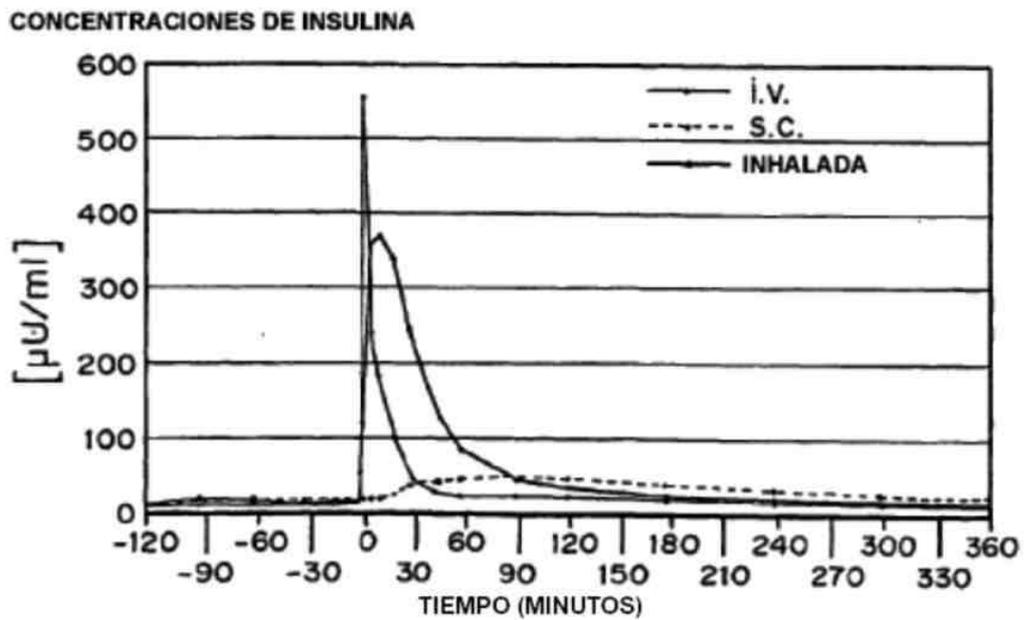


FIG. 1B



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**