

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 529**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 31/495** (2006.01)

**A61K 38/26** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2008 E 08841194 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2211842**

54 Título: **Formulación en polvo seco inhalable que comprende GLP-1 para usar en el tratamiento de la hiperglucemia y diabetes por administración pulmonar**

30 Prioridad:

**24.10.2007 US 982368 P**

**05.11.2007 US 985620 P**

**04.03.2008 US 33740 P**

**09.05.2008 US 52127 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.10.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RICHARDSON, PETER;  
BAUGHMAN, ROBERT A. y  
COSTELLO, DONALD**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 547 529 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

Formulación en polvo seco inhalable que comprende GLP-1 para usar en el tratamiento de la hiperglucemia y diabetes por administración pulmonar

### CAMPO TÉCNICO

- 5 Se da a conocer en la presente memoria una composición para uso en un método para prevenir o reducir efectos adversos tales como sudoración profusa, náuseas y vómitos que están normalmente asociados a la administración subcutánea e intravenosa de terapia de péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1). En particular, el método comprende la administración de GLP-1 a la circulación pulmonar tal como mediante inhalación en los capilares alveolares pulmonares usando un sistema de suministro de fármaco en polvo seco.

### 10 ANTECEDENTES

- Los sistemas de suministro de fármaco para el tratamiento de enfermedades que introducen ingredientes activos en la circulación son numerosos e incluyen administración oral, transdérmica, subcutánea e intravenosa. Aunque estos sistemas se han usado durante bastante tiempo y pueden suministrar suficiente medicación para el tratamiento de muchas enfermedades, existen numerosos desafíos asociados a estos mecanismos de suministro de fármaco. En particular, el suministro de cantidades eficaces de proteínas y péptidos para tratar una enfermedad diana ha sido problemático. Están implicados muchos factores en la introducción de la cantidad correcta de agente activo, por ejemplo, la preparación de la formulación de suministro de fármaco apropiada para que la formulación contenga una cantidad de agente activo que alcance su sitio o sitios diana de acción a una cantidad eficaz.

- 20 El agente activo debe ser estable en la formulación de suministro de fármaco y la formulación debería permitir la absorción del agente activo en la circulación y que permanezca activo de modo que pueda alcanzar el sitio o sitios de acción a niveles terapéuticos eficaces. Por tanto, en la técnica farmacológica, son de la máxima importancia sistemas de suministro de fármaco que puedan suministrar un agente activo estable.

- 25 Elaborar formulaciones de suministro de fármaco terapéuticamente adecuadas para tratar enfermedades depende de las características del ingrediente o agente activo para suministrar al paciente. Dichas características pueden incluir de manera no limitante pH, estabilidad, toxicidad, velocidad de liberación y facilidad de expulsión del cuerpo por procesos fisiológicos normales. Por ejemplo, en la administración oral, si el agente es sensible a ácido, se han desarrollado recubrimientos entéricos que usan materiales farmacéuticamente aceptables que pueden prevenir que el agente activo se libere al pH bajo (ácido) del estómago. Por tanto, se usan polímeros que no son solubles a pH ácido para formular y suministrar una dosis que contiene agentes sensibles a ácido al intestino delgado, donde el pH es neutro. A pH neutro, el recubrimiento polimérico puede disolverse liberando el agente activo, que se absorbe entonces en la circulación sistémica entérica. Los agentes activos administrados por vía oral entran en la circulación sistémica y pasan a través del hígado. En ciertos casos, se metaboliza y/o desactiva cierta porción de la dosis en el hígado antes de alcanzar los tejidos diana. En algunas ocasiones, los metabolitos pueden ser tóxicos para el paciente o pueden producir efectos secundarios indeseados.

- 35 De forma similar, la administración subcutánea e intravenosa de agentes farmacéuticamente activos no está desprovista de degradación e inactivación. Con la administración intravenosa de fármacos, los fármacos o ingredientes activos pueden metabolizarse también, por ejemplo en el hígado, antes de alcanzar el tejido diana. Con la administración subcutánea de ciertos agentes activos, incluyendo diversas proteínas y péptidos, existe adicionalmente una degradación y desactivación por las enzimas del tejido periférico y vascular en el sitio de suministro de fármaco durante el recorrido a través de la corriente sanguínea venosa. Para suministrar una dosis que produzca una cantidad aceptable para tratar enfermedades con la administración subcutánea e intravenosa de un agente activo, los regímenes de dosificación tendrán siempre que contar con la inactivación del agente activo por tejido venoso periférico y vascular y en última instancia el hígado.

### SUMARIO

- 45 Se da a conocer una composición para uso en un método para prevenir o reducir efectos adversos tales como sudoración profusa, náuseas y vómitos que están asociados normalmente a la administración subcutánea e intravenosa de terapia de péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1). En particular, la composición para uso comprende GLP-1 administrado a la circulación pulmonar tal como por inhalación en capilares alveolares pulmonares usando un sistema de suministro de fármaco en polvo seco.
- 50 En una realización, se proporciona un método para el tratamiento de hiperglucemia y/o diabetes en un paciente que comprende la etapa de administrar de forma prandial a un paciente necesitado de tratamiento una formulación de polvo seco inhalable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de GLP-1; en el que la administración no da como resultado al menos un efecto secundario seleccionado del grupo consistente en náuseas, vómitos y sudoración profusa.
- 55 En otra realización, el paciente es un mamífero que padece diabetes sacarina de tipo 2. En otra realización, la formulación de GLP-1 comprende de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 3 mg de GLP-1 en la

formulación. En aún otra realización, la formulación de polvo seco inhalable comprende adicionalmente un inhibidor de DPP-IV.

5 En una realización, se proporciona una composición para uso en la reducción de los niveles de glucosa en un paciente diabético de tipo 2 que padece hiperglucemia, comprendiendo el método la etapa de administrar al paciente necesitado de tratamiento una formulación de polvo seco inhalable para administración pulmonar que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de GLP-1, y una dicetopiperazina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

10 En otra realización, la formulación de polvo seco inhalable comprende una dicetopiperazina. En otra realización, la dicetopiperazina es 2,5-diceto-3,6-di(4-X-aminobutil)piperazina; en la que X se selecciona del grupo de succinilo, glutarilo, maleilo y fumarilo; o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En otra realización, la molécula de GLP-1 se selecciona del grupo consistente en un GLP-1 nativo, un metabolito de GLP-1, un derivado de GLP-1, un GLP-1 de acción prolongada, un mimético de GLP-1, una exendina o un análogo de los mismos o combinaciones de los mismos.

15 En otra realización, el método comprende adicionalmente administrar una formulación que comprende un análogo de GLP-1 de acción prolongada.

En otra realización, la formulación de polvo seco inhalable carece de inhibición del vaciado gástrico.

20 En otra realización, los niveles de glucosa se reducen en aproximadamente 0,1 mmol/l a aproximadamente 3 mmol/l durante un periodo de aproximadamente 4 horas después de la administración de la formulación inhalable al paciente. En otra realización, la formulación inhalable se administra al paciente diabético de tipo 2 de forma prandial, preprandial, prandial, postprandial o en estado de ayuno. En otra realización, la formulación de GLP-1 comprende de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 2 mg de GLP-1 en la formulación.

25 En una realización, se proporciona un kit para el tratamiento de diabetes y/o hiperglucemia que comprende: a) un cartucho de medicamento configurado operativamente para encajar en un inhalador de polvo seco y que contiene una formulación de polvo seco que comprende una molécula de GLP-1 y una dicetopiperazina de fórmula: 2,5-diceto-3,6-di(4-X-aminobutil)piperazina; en la que X se selecciona del grupo consistente en succinilo, glutarilo, maleilo y fumarilo o una sal de los mismos, y b) un dispositivo de inhalación configurado operativamente para aceptar/mantener y fijar con seguridad el cartucho.

30 En otra realización, se proporciona un kit para el tratamiento de hiperglucemia en un paciente diabético de tipo 2 que comprende un sistema de suministro pulmonar de fármaco que comprende: a) un cartucho de medicamento configurado operativamente para encajar en un inhalador de polvo seco y que contiene una formulación de polvo seco que comprende una molécula de GLP-1 y una dicetopiperazina de fórmula: 2,5-diceto-3,6-di(4-X-aminobutil)piperazina; en la que X se selecciona del grupo consistente en succinilo, glutarilo, maleilo y fumarilo o una sal de los mismos, y b) un dispositivo de inhalación configurado operativamente para adaptar y fijar con seguridad el cartucho.

### 35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 reproduce la concentración plasmática media de péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) en sujetos tratados con una formulación de polvo seco inhalable que contiene una dosis de GLP-1 de 1,5 mg medida en diversos momentos después de la inhalación.

40 La FIG. 2A reproduce la concentración plasmática media de insulina en sujetos tratados con una formulación de polvo seco inhalable que contiene una dosis de GLP-1 de 1,5 mg medida en diversos momentos después de la inhalación.

La FIG. 2B reproduce la concentración plasmática de GLP-1 en sujetos tratados con una formulación de polvo seco inhalable que contiene una dosis de GLP-1 de 1,5 mg medida en diversos momentos después de la inhalación en comparación con sujetos tratados con una administración subcutánea de GLP-1.

45 La FIG. 2C reproduce la concentración plasmática de insulina en sujetos tratados con una formulación de polvo seco inhalable que contiene una dosis de GLP-1 de 1,5 mg medida en diversos momentos después de la inhalación en comparación con sujetos tratados con una dosis intravenosa de GLP-1 de 50 µg y sujetos tratados con una dosis subcutánea de GLP-1.

50 La FIG. 3 reproduce la concentración plasmática media de péptido C en sujetos tratados con una formulación de polvo seco inhalable que contiene una dosis de GLP-1 de 1,5 mg medida en diversos momentos después de la inhalación.

La FIG. 4 reproduce la concentración plasmática media de glucosa en sujetos tratados con una formulación de polvo seco inhalable que contiene dosis de GLP-1 de 0,05 mg, 0,45 mg, 0,75 mg, 1,05 mg y 1,5 mg, medida en diversos momentos después de la inhalación.

La FIG. 5 reproduce las concentraciones plasmáticas medias de insulina en pacientes tratados con una formulación de polvo seco inhalable que contiene dosis de GLP-1 de 0,05 mg, 0,45 mg, 0,75 mg, 1,05 mg y 1,5 mg. Los datos muestran que la secreción de insulina en respuesta a la administración pulmonar de GLP-1 es dependiente de la dosis.

- 5 La FIG. 6 reproduce las concentraciones plasmáticas medias de glucagón en pacientes tratados con una formulación de polvo seco inhalable que contiene dosis de GLP-1 de 0,05 mg, 0,45 mg, 0,75 mg, 1,05 mg y 1,5 mg.

- 10 La FIG. 7 reproduce las concentraciones plasmáticas medias de exendina en ratas obesas diabéticas Zucker (ZDF) que reciben polvo de exendina 4/FDKP (fumarildicetopiperazina) por insuflación pulmonar frente a exendina 4 administrada por vía subcutánea (SC). Los cuadrados negros representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de polvo de exendina 4/FDKP. Los cuadrados blancos representan la respuesta después de la administración SC de exendina 4. Los datos se grafican como medias  $\pm$  DE.

- 15 La FIG. 8 reproduce los cambios en la concentración sanguínea de glucosa desde el valor de referencia en ratas ZDF macho que reciben control de aire, polvo de exendina 4/FDKP o polvo de GLP-1/FDKP por insuflación pulmonar frente a exendina 4 administrada por vía subcutánea. La gráfica muestra también un experimento de combinación en que se administró a ratas por insuflación pulmonar un polvo de inhalación que comprendía GLP-1/FDKP, seguido de un polvo de inhalación que comprendía exendina 4/FDKP. En la gráfica, los rombos negros representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de polvo de exendina 4/FDKP. Los círculos negros representan la respuesta después de la administración de exendina 4 subcutánea. Los triángulos representan la respuesta después de la administración de polvo de GLP-1/FDKP. Los cuadrados representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de aire solo. Las estrellas representan la respuesta dada por 2 mg de GLP-1/FDKP procurados a las ratas por insuflación seguido de 2 mg de polvo de exendina 4/FDKP administrado también por insuflación.

- 20 La FIG. 9A reproduce las concentraciones plasmáticas medias de oxintomodulina en ratas ZDF macho que reciben polvo de oxintomodulina/FDKP por insuflación pulmonar frente a la oxintomodulina intravenosa (IV). Los cuadrados representan la respuesta después de la administración IV de oxintomodulina sola. Los triángulos hacia arriba representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de polvo de oxintomodulina al 5 %/FDKP (0,15 mg de oxintomodulina). Los círculos representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de polvo de oxintomodulina al 15 %/FDKP (0,45 mg de oxintomodulina). Los triángulos hacia abajo representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de polvo de oxintomodulina al 30 %/FDKP (0,9 mg de oxintomodulina). Los datos se grafican como medias  $\pm$  DE.

- 25 La FIG. 9B reproduce el consumo acumulado de alimento en ratas ZDF macho que reciben polvo de oxintomodulina al 30 %/FDKP (0,9 mg de oxintomodulina) por insuflación pulmonar (1), oxintomodulina sola (1 mg de oxintomodulina) por inyección IV (2) o control de aire (3).

- 30 La FIG. 10A reproduce las concentraciones plasmáticas medias de oxintomodulina en ratas ZDF macho que reciben polvo de oxintomodulina/FDKP por insuflación pulmonar frente al control de aire. Los cuadrados representan la respuesta después de la administración de control de aire. Los círculos representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de polvo de oxintomodulina/FDKP (0,15 mg de oxintomodulina). Los triángulos hacia arriba representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de polvo de oxintomodulina/FDKP (0,45 mg de oxintomodulina). Los triángulos hacia abajo representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de polvo de oxintomodulina/FDKP (0,9 mg de oxintomodulina). Los datos se grafican como medias  $\pm$  DE.

- 35 La FIG. 10B reproduce los datos de experimentos que muestran el consumo acumulado de alimento en ratas ZDF macho que reciben polvo de oxintomodulina al 30 %/FDKP a dosis variables que incluye 0,15 mg de oxintomodulina (1); 0,45 mg de oxintomodulina (2) o 0,9 mg de oxintomodulina (3) por insuflación pulmonar en comparación con control de aire (4). Los datos se grafican como medias  $\pm$  DE. Un asterisco (\*) designa significación estadística.

- 40 La FIG. 11 reproduce los valores de glucosa obtenidos a partir de 6 pacientes diabéticos de tipo 2 en ayunas después de la administración de una sola dosis de formulación de polvo seco inhalable que contiene GLP-1 en diversos momentos.

La FIG. 12 reproduce los valores medios de glucosa para el grupo de 6 pacientes diabéticos de tipo 2 en ayunas de la FIG. 11, en que los valores de glucosa se expresan como el cambio de los niveles de glucosa desde tiempo 0 (dosificación) para los 6 pacientes.

- 45 La FIG. 13 reproduce los datos obtenidos de experimentos en que se administró a ratas ZDF exendina 4 en una formulación que comprendía una dicetopiperazina o una sal de una dicetopiperazina, en la que la exendina 4 se proporcionó por diversas rutas de administración (instilación líquida (ISL), SC, insuflación pulmonar (INS)) en una prueba de tolerancia a glucosa intraperitoneal (PTGIP). En un grupo, se trataron ratas con exendina 4 en combinación con GLP-1 por insuflación pulmonar.

- 50 La FIG. 14 reproduce el consumo acumulado de alimento en ratas ZDF macho que reciben control de aire por insuflación pulmonar, proteína YY(3-36) (PYY) sola por inyección IV, PYY sola por instilación pulmonar, polvo de PYY al 10 %/FDKP (0,3 mg de PYY) por insuflación pulmonar y polvo de PYY al 20 %/FDKP (0,6 mg de PYY) por

insuflación pulmonar. Para cada grupo, se midió el consumo de alimento 30 minutos después de la dosificación, 1 hora después de la dosificación, 2 horas después de la dosificación y 4 horas después de la dosificación. Los datos se grafican como media  $\pm$  DE.

5 La FIG. 15 reproduce la concentración sanguínea de glucosa en ratas ZDF hembra administradas con polvo de PYY/FDKP por insuflación pulmonar frente a PYY administrada por vía intravenosa en diversos momentos después de la administración de la dosis.

10 La FIG. 16 reproduce las concentraciones plasmáticas medias de PYY en ratas ZDF hembra que reciben polvo de PYY/FDKP por insuflación pulmonar frente a PYY administrada por vía intravenosa. Los cuadrados representan la respuesta después de la administración intravenosa de PYY sola (0,6 mg). Los círculos representan la respuesta después de la instilación líquida de PYY sola (1 mg). Los triángulos hacia abajo representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de polvo de PYY al 20 %/FDKP (0,6 mg de PYY). Los triángulos hacia arriba representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de polvo de PYY al 10 %/FDKP (0,3 mg de PYY). Los triángulos apuntando a la izquierda representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de aire solo. Los datos se grafican como  $\pm$  DE.

15 La FIG 17 reproduce la exposición relativa a fármaco y el bioefecto relativo de las presentes formulaciones administradas por inhalación pulmonar y que contienen insulina, exendina, oxintomodulina o PYY en comparación con la administración subcutánea e intravenosa.

La FIG. 18 reproduce los niveles plasmáticos de GLP-1 en pacientes administrados con diversas formulaciones inhaladas de GLP-1 y de control.

20 La FIG. 19 reproduce los niveles plasmáticos de insulina en pacientes administrados con diversas formulaciones inhaladas de GLP-1 y de control.

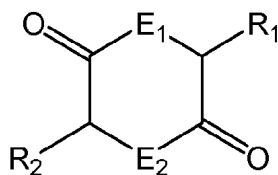
La FIG. 20 reproduce el vaciado gástrico en respuesta a una formulación inhalada de GLP-1 en pacientes administrados con diversas formulaciones inhaladas de GLP-1 y de control.

#### DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

25 Antes de exponer la invención, puede ser útil proporcionar una relación de ciertos términos que se usarán en adelante en la presente memoria:

Agentes activos: Como se usa en la presente memoria, "agente activo" hace referencia a fármacos, sustancias farmacéuticas y agentes bioactivos. Los agentes activos pueden ser macromoléculas orgánicas incluyendo ácidos nucleicos, compuestos orgánicos sintéticos, polipéptidos, péptidos proteínas, polisacáridos y otros azúcares, ácidos grasos y lípidos. Los péptidos, proteínas y polipéptidos son todas cadenas de aminoácidos ligados por enlaces peptídicos. Se considera generalmente que los péptidos son de menos de 30 residuos aminoácidos, pero pueden incluir más. Las proteínas son polímeros que pueden contener más de 30 residuos aminoácidos. El término polipéptido, como es conocido en la materia y como se usa en la presente memoria, puede hacer referencia a un péptido o proteína u otra cadena de aminoácidos de cualquier longitud que contenga múltiples enlaces peptídicos, aunque generalmente contiene al menos 10 aminoácidos. Los agentes activos pueden entrar dentro de una variedad de clases de actividad biológica, tales como agentes vasoactivos, agentes neuroactivos, hormonas, anticoagulantes, agentes inmunomoduladores, agentes citotóxicos, antibióticos, agentes antivíricos, antígenos y anticuerpos. Más particularmente, los agentes activos pueden incluir, de manera no limitante, insulina y análogos de la misma, hormona de crecimiento, hormona paratiroidea (PTH), grelina, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), péptido similar a glucagón de tipo 1 (GLP-1), rojo Texas, alquinos, ciclosporinas, clopidogrel y PPACK (D-fenilalanil-L-prolil-L-arginilclorometilcetona), anticuerpos y fragmentos de los mismos incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos humanizados o quiméricos; F(ab), F(ab)<sub>2</sub> o anticuerpo monocatenario solo o fusionado con otros polipéptidos; anticuerpos monoclonales terapéuticos o de diagnóstico de antígenos del cáncer, citocinas, agentes infecciosos, mediadores inflamatorios, hormonas y antígenos de superficie celular. En algunas ocasiones, los términos "fármaco" y "agente activo" se usan intercambiamente.

35 Dicotopiperazina: Como se usa en la presente memoria, "dicotopiperazina" o "DKP" incluye dicotopiperazinas y sales, derivados, análogos y modificaciones de las mismas que entran dentro del alcance de la fórmula general 1, en la que los átomos de anillo E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> en posiciones 1 y 4 son O o N y al menos una de las cadenas laterales R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> localizadas en las posiciones 3 y 6 contiene respectivamente un grupo ácido carboxílico (carboxilato). Los compuestos según la fórmula 1 incluyen, sin limitación, dicotopiperazinas, dicetomorfolinas y dicetodioxanos y sus análogos de sustitución.



Fórmula 1

Las dicetopiperazinas, además de dar micropartículas aerodinámicamente adecuadas, facilita también el suministro de fármacos al acelerar la absorción en la circulación. Las dicetopiperazinas pueden conformarse en partículas que incorporan un fármaco o partículas en que puede adsorberse un fármaco. La combinación de un fármaco y una dicetopiperazina puede conferir una estabilidad mejorada al fármaco. Estas partículas pueden administrarse por diversas vías de administración. Como polvos secos, estas partículas pueden suministrarse por inhalación a áreas específicas del sistema respiratorio, dependiendo del tamaño de partícula. Adicionalmente, las partículas pueden hacerse suficientemente pequeñas para incorporación a una forma de dosificación en suspensión intravenosa. El suministro oral es también posible con las partículas incorporadas a una suspensión, comprimidos o cápsulas. Las dicetopiperazinas pueden facilitar también la absorción de un fármaco asociado.

En una realización, la dicetopiperazina es 3,6-di(fumaril-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina (fumarildicetopiperazina, FDKP). La FDKP puede comprender micropartículas en su forma ácida o formas salinas que pueden aerosolizarse o administrarse en suspensión.

En otra realización, la DKP es un derivado de 3,6-di(4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina que puede formarse mediante condensación (térmica) del aminoácido lisina. Los derivados ejemplares incluyen 3,6-di(succinil-4-aminobutil)-, 3,6-di(maleil-4-aminobutil)-, 3,6-di(glutaril-4-aminobutil)-, 3,6-di(malonil-4-aminobutil)-, 3,6-di(oxalil-4-aminobutil)- y 3,6-di(fumaril-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina. El uso de DKP para el suministro de fármacos es conocido en la material (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.352.461, 5.503.852, 6.071.497 y 6.331.318). El uso de sales de DKP se describe en la solicitud de patente de EE.UU. en tramitación junto con la presente nº 11/210.710 presentada el 23 de agosto de 2005. Se da a conocer el suministro pulmonar de fármacos usando micropartículas de DKP en la patente de EE.UU. nº 6.428.771. Pueden encontrarse detalles adicionales relacionados con la adsorción de agentes activos sobre partículas de DKP cristalinas en las solicitudes de patente de EE.UU. en tramitación junto con la presente nº 11/532.063 y 11/532.065.

Sistema de suministro de fármaco: Como se usa en la presente memoria, "sistema de suministro de fármaco" hace referencia a un sistema para el suministro de uno o más agentes activos.

Polvo seco: Como se usa en la presente memoria, "polvo seco" hace referencia a una composición particulada fina que no está suspendida ni disuelta en un propelente, portador ni otro líquido. No pretende implicar necesariamente la ausencia completa de todas las moléculas de agua.

Fase temprana: Como se usa en la presente memoria, "fase temprana" hace referencia a la rápida elevación de la concentración sanguínea de insulina inducida en respuesta a una comida. Se hace referencia a veces a esta elevación temprana de insulina en respuesta a una comida como primera fase. En fuentes más recientes, se usa a veces primera fase para hacer referencia a la elevación más rápida de la concentración sanguínea de insulina del perfil cinético conseguible con una inyección IV en embolada de glucosa, a diferencia de la respuesta relacionada con la comida.

Enfermedad endocrina: El sistema endocrino es un sistema de señales de información que libera hormonas de las glándulas para proporcionar mensajeros químicos específicos que regulan muchas y variadas funciones de un organismo, p.ej. ánimo, crecimiento y desarrollo, función y metabolismo de tejidos, así como para enviar mensajes y actuar sobre ellos. Las enfermedades del sistema endocrino incluyen, pero sin limitación, diabetes sacarina, enfermedad tiroidea y obesidad. La enfermedad endocrina se caracteriza por una liberación hormonal desregulada (un adenoma pituitario productivo), una respuesta inapropiada a la señalización (hipotiroidismo), la falta o destrucción de una glándula (diabetes sacarina de tipo 1, eritropoyesis reducida en insuficiencia renal crónica), una sensibilidad reducida a la señalización (resistencia a insulina de la diabetes sacarina de tipo 2) o un agrandamiento estructural en un sitio crítico tal como el cuello (bocio multinodular tóxico). Puede tener lugar la hipofunción de las glándulas endocrinas como resultado de la pérdida de reservas, hiposecreción, agénesis, atrofia o destrucción activa. Puede tener lugar la hiperfunción como resultado de hipersecreción, pérdida de supresión, cambio hiperplásico o neoplásico o hiperestimulación. El término enfermedad endocrina engloba trastornos metabólicos.

Fluctuación: Como se usa en la presente memoria, "fluctuación" puede hacer referencia a concentraciones sanguíneas de glucosa que caen por encima o por debajo del valor de referencia antes de la comida u otro punto de partida. Las fluctuaciones se expresan generalmente como el área bajo la curva (AUC) de un gráfico de glucosa sanguínea frente al tiempo. El AUC puede expresarse en una variedad de formas. En algunas ocasiones, habrá tanto una caída por debajo como una elevación por encima del valor de referencia, creando un área positiva y otra negativa. Algunos cálculos restarán el AUC negativo del positivo, mientras que otros añadirán sus valores absolutos.

- Los AUC positivos y negativos pueden considerarse también separadamente. Pueden usarse también evaluaciones estadísticas más sofisticadas. En algunas ocasiones, puede hacerse referencia también a concentraciones sanguíneas de glucosa que se elevan o caen fuera del intervalo normal. Una concentración sanguínea de glucosa normal está habitualmente entre 70 y 110 mg/dl en un individuo en ayunas, menos de 120 mg/dl 2 horas después de una comida y menos de 180 mg/dl después de comer. Aunque la fluctuación se ha descrito en la presente memoria en términos de glucosa sanguínea, en otros contextos el término puede aplicarse de forma similar a otros analitos.
- Velocidad de eliminación de glucosa: Como se usa en la presente memoria, “velocidad de eliminación de glucosa” es la velocidad a la que desaparece la glucosa de la sangre. Se determina comúnmente por la cantidad de infusión de glucosa requerida para mantener una glucosa sanguínea estable, a menudo alrededor de 120 mg/dl durante el periodo de estudio. Esta velocidad de eliminación de glucosa es igual a la velocidad de infusión de glucosa, abreviada como VIG.
- Hiper glucemia: Como se usa en la presente memoria, “hiper glucemia” es una concentración sanguínea de glucosa en ayunas mayor de lo normal, habitualmente de 126 mg/dl o mayor. En algunos estudios, los episodios hiper glucémicos se definían como concentraciones sanguíneas de glucosa superiores a 280 mg/dl (15.6 mM).
- Hipog lucemia: Como se usa en la presente memoria, “hipog lucemia” es una concentración sanguínea de glucosa menor de lo normal, habitualmente menor de 63 mg/dl o 3,5 mM). La hipog lucemia clínicamente relevante se define como una concentración sanguínea de glucosa menor de 63 mg/dl o que causa síntomas en el paciente tales como hipotonía, rubor y debilidad que son síntomas reconocidos de hipog lucemia y que desaparecen con una ingesta calórica apropiada. La hipog lucemia grave se define como un episodio hipog lucémico que requiera inyecciones de glucagón, infusiones de glucosa o ayuda por otra parte.
- En proximidad a: Como se usa en la presente memoria, “en proximidad a”, como se usa con relación a una comida, hace referencia a un periodo cercano en el tiempo al comienzo de una comida o refrigerio.
- Micro partículas: Como se usa en la presente memoria, el término “micro partículas” incluye partículas generalmente de 0,5 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, y particularmente aquellas de menos de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. Diversas realizaciones conllevarán intervalos de tamaño más específicos. Las micro partículas pueden ser colecciones de placas cristalinas con superficies irregulares y vacíos internos como es típico en aquellas elaboradas mediante el proceso de precipitación controlado por el pH de los ácidos de DKP. En dichas realizaciones, los agentes activos pueden atraparse por el proceso de precipitación o recubrirse sobre las superficies cristalinas de la micro partícula. Las micro partículas pueden ser también cubiertas esféricas o cubiertas esféricas colapsadas que comprenden sales de DKP con el agente activo dispersado a través. Típicamente, dichas partículas pueden obtenerse mediante secado por pulverización de una codisolución de DKP y agente activo. La sal de DKP en dichas partículas puede ser amorfa. Las descripciones anteriores deberían entenderse como ejemplares. Se contemplan y engloban por el término otras formas de micro partículas.
- Obesidad: Es una afección en que se ha acumulado grasa corporal en exceso en tal medida que puede afectar negativamente a la salud. La obesidad se valora típicamente por el IMC (índice de masa corporal), con un IMC mayor de 30  $\text{kg}/\text{m}^2$ .
- Tejido periférico: Como se usa en la presente memoria, “tejido periférico” hace referencia a cualquier tejido conectivo o intersticial que está asociado a un órgano o vaso.
- Peri prandial: Como se usa en la presente memoria, “peri prandial” hace referencia a un periodo de tiempo que empieza poco antes y termina poco después de la ingestión de una comida o refrigerio.
- Post prandial: Como se usa en la presente memoria, “post prandial” hace referencia a un periodo de tiempo después de la ingestión de una comida o refrigerio. Como se usa en la presente memoria, post prandial tardío hace referencia a un periodo de tiempo 3, 4 o más horas después de la ingestión de una comida o refrigerio.
- Potenciación: Generalmente, potenciación hace referencia a una condición o acción que aumenta la eficacia o actividad de algún agente por encima del nivel que alcanzaría el agente de otro modo. De forma similar, puede hacer referencia directamente al efecto o actividad aumentados. Como se usa en la presente memoria, “potenciación” hace referencia particularmente a la capacidad de concentraciones sanguíneas de insulina elevadas de estimular la eficacia de los niveles de insulina posteriores, por ejemplo, elevando la velocidad de eliminación de glucosa.
- Prandial: Como se usa en la presente memoria, “prandial” hace referencia a una comida o refrigerio.
- Pre prandial: Como se usa en la presente memoria, “pre prandial” hace referencia a un periodo de tiempo antes de la ingestión de una comida o refrigerio.
- Inhalación pulmonar: Como se usa en la presente memoria, “inhalación pulmonar” se usa para hacer referencia a la administración de preparaciones farmacéuticas mediante inhalación de modo que alcancen los pulmones, y en realizaciones particulares, las regiones alveolares del pulmón. Típicamente, la inhalación es a través de la boca, pero realizaciones alternativas pueden conllevar la inhalación a través de la nariz.

Reducción de efectos secundarios: Como se usa en la presente memoria, el término “reducción”, cuando se usa con respecto a efectos secundarios, hace referencia a disminuir la gravedad de uno o más efectos secundarios perceptibles por el paciente o el sanitario bajo cuyo cuidado se encuentra, o la mejora de uno o más efectos secundarios de tal modo que los efectos secundarios no sean ya debilitantes o ya no perceptibles por el paciente.

- 5 Efectos secundarios: Como se usa en la presente memoria, el término “efectos secundarios” hace referencia a consecuencias no pretendidas e indeseables que surgen de la terapia con agente activo. En un ejemplo no limitante, los efectos secundarios comunes del GLP-1 incluyen, pero sin limitación, náuseas, vómitos y sudoración profusa.

- 10 Cantidad terapéuticamente eficaz: Como se usa en la presente memoria, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” de una composición, cuando se administra a un paciente humano o no humano para proporcionar un beneficio terapéutico tal como la mejora de síntomas, p.ej. una cantidad eficaz para estimular la secreción de insulina endógena. En ciertas circunstancias, un paciente que padece un trastorno puede no presentar síntomas de estar afectado. Por tanto, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición es también una cantidad suficiente para prevenir el inicio de los síntomas de una enfermedad.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 15 El péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) se ha estudiado como tratamiento para hiperglucemia asociada a diabetes sacarina de tipo 2 por diversas vías de administración. El GLP-1, como se da a conocer en la bibliografía, es una hormona de incretina de 30 o 31 aminoácidos liberada por las células L endocrinas intestinales en respuesta a la grasa, carbohidratos y proteínas alimentarias. El GLP-1 se produce como resultado de la escisión proteolítica de proglucagón y la forma activa se identifica como GLP-1 (7-36) amida. La secreción de esta hormona peptídica se encuentra alterada en individuos con diabetes sacarina de tipo 2, haciendo a esta hormona peptídica el candidato principal para tratamientos potenciales de esta y otras enfermedades relacionadas.

- 20 En estado no patológico, el GLP-1 se secreta por las células L intestinales en respuesta a nutrientes ingeridos por vía oral, particularmente azúcares. El GLP-1 tiene efecto sobre el tracto gastrointestinal (GI) y el cerebro, incluyendo la liberación de insulina inducida por comida por el páncreas. El efecto del GLP-1 en el páncreas es dependiente de la glucosa de modo que el riesgo de hipoglucemia inducida por GLP-1 es mínimo cuando la hormona se administra exógenamente. El GLP-1 promueve también todas las etapas de la biosíntesis de insulina y estimula directamente el crecimiento, supervivencia y diferenciación de células  $\beta$ . La combinación de estos efectos da como resultado una masa aumentada de células  $\beta$ . Además, la señalización del receptor de GLP-1 da como resultado la reducción de la apoptosis de células  $\beta$  y contribuye adicionalmente a la masa aumentada de células  $\beta$ .

- 30 En el tracto gastrointestinal, el GLP-1, como se reseña en la bibliografía, inhibe la motilidad, aumenta la secreción de insulina en respuesta a la glucosa y reduce la secreción de glucagón. Estos efectos se combinan reduciendo las fluctuaciones de glucosa postprandial. Los experimentos en roedores en que se procuró GLP-1 por administración central (intracerebroventricular o icv) han mostrado que el GLP-1 inhibe la ingesta de alimento, sugiriendo que el GLP-1 liberado periféricamente puede entrar en la circulación sistémica y puede tener su efecto sobre el cerebro. Este efecto puede ser el resultado de que el GLP-1 en circulación accede a los receptores de GLP-1 en el órgano subfornical y el área postrema del cerebro. Estas áreas del cerebro son conocidas por estar implicadas en la regulación del apetito y la homeostasia de energía. De forma interesante, la distensión gástrica activa las neuronas que contienen GLP-1 en el núcleo caudado del tracto solitario, prediciendo un papel para el GLP-1 expresado centralmente como supresor del apetito. Estas hipótesis se apoyaron en estudios que emplean el antagonista de receptor de GLP-1 exendina (9-39), en que se observaron los efectos opuestos. En seres humanos, el GLP-1 administrado tiene efecto saciante, y cuando se procura por infusión subcutánea continua durante un régimen de 6 semanas, los pacientes con diabetes exhibían una reducción de apetito que conduce a reducciones significativas del peso corporal.

- 45 Se ha mostrado también que el GLP-1 aumenta la secreción de insulina y normaliza tanto la glucosa sanguínea en ayuno como postprandial cuando se procura como una infusión intravenosa continua a pacientes con diabetes de tipo 2. Además, se ha mostrado que la infusión de GLP-1 disminuye los niveles de glucosa en pacientes tratados anteriormente con mediación oral no insulínica y en pacientes que requieran terapia con insulina después del fracaso de la terapia con sulfonilurea. Sin embargo, los efectos de una sola inyección subcutánea de GLP-1 proporcionaron resultados decepcionantes, como se observa en la materia y se discute a continuación en la presente memoria. Aunque se consiguieron altos niveles plasmáticos de GLP-1 inmunorreactivo, la secreción de insulina volvió rápidamente a los valores pretratamiento y las concentraciones sanguíneas de glucosa no se normalizaron. Se requerían administraciones subcutáneas repetidas para conseguir concentraciones sanguíneas de glucosa en ayuno comparables a aquellas observadas con la administración intravenosa. La administración subcutánea continua de GLP-1 durante 6 semanas ha mostrado reducir las concentraciones de glucosa en ayunas y postprandial y disminuir los niveles de HbA1c. La eficacia de corta vida de las inyecciones subcutáneas únicas de GLP-1 está relacionada con su inestabilidad circulatoria. El GLP-1 se metaboliza en plasma *in vitro* por la dipeptidilpeptidasa IV (DPP-IV). El GLP-1 se degrada rápidamente por DPP-IV mediante la retirada de los aminoácidos 7 y 8 del extremo N. El producto de degradación, GLP-1 (9-36) amida, no es activo. La DPP-4 circula por los vasos sanguíneos y está unida a membrana en los vasos del tracto gastrointestinal y riñón, y se ha identificado en linfocitos en el pulmón.



Se ha estudiado durante más de 20 años la utilidad de GLP-1 y análogos de GLP-1 como tratamiento para hiperglucemia asociada a diabetes sacarina de tipo 2. Clínicamente, el GLP-1 reduce la glucosa sanguínea, las fluctuaciones de glucosa postprandial y la ingesta de alimento. Aumenta también la saciedad. Tomadas en conjunto, estas acciones definen el perfil único y altamente deseable de un agente antidiabético con el potencial de promover la pérdida de peso. A pesar de estas ventajas, la utilidad del GLP-1 como tratamiento de diabetes está dificultado porque requiere administración por inyección y el GLP-1 tiene una semivida en circulación muy corta porque se inactiva rápidamente por la enzima dipeptidilpeptidasa (DPP)-IV. Por tanto, para conseguir concentraciones terapéuticamente eficaces de GLP-1, se requieren dosis altas de GLP-1. Sin embargo, basándose en la extensa evaluación bibliográfica, cuando las concentraciones de GLP-1 activo superan 100 pmol/l en plasma sanguíneo, se observa típicamente una combinación de efectos secundarios/efectos adversos, incluyendo sudoración profusa, náuseas y vómitos.

Para enfrentarse al reto de la semivida limitada del GLP-1, se han desarrollado o están actualmente en desarrollo varios análogos de GLP-1 de acción prolongada. Los análogos de GLP-1 de acción prolongada que incluyen liraglutida (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), exenatida (exendina 4; Byetta<sup>®</sup>) (Amylin Inc., San Diego, CA) y exenatida-LAR (Eli Lilly, Indianápolis, IN)) y que son resistentes a la degradación se llaman "miméticos de incretina" y se han investigado en ensayos clínicos. La exenatida es una terapia aprobada para diabetes de tipo 2. Estos productos son formulaciones para administración subcutánea, y estas formulaciones son conocidas por tener limitaciones significativas debido a la degradación en tejido periférico, tejido vascular y/o el hígado. Por ejemplo, la exenatida (Byetta<sup>®</sup>, Amylin Pharmaceuticals), un compuesto con aproximadamente un 50 % de homología aminoacídica con GLP-1, tiene una semivida en circulación más larga que el GLP-1. Este producto se ha aprobado por la Food and Drug Administration para el tratamiento de hiperglucemia asociada a diabetes sacarina de tipo 2. Aunque la semivida en circulación de la exenatida es más larga que la del GLP-1, sigue requiriendo que los pacientes se inyecten el fármaco dos veces al día. La terapia de exenatida se complica adicionalmente por un mal perfil de efectos secundarios, incluyendo una incidencia significativa de náuseas. Adicionalmente, aunque el enfoque terapéutico de acción prolongada puede proporcionar conveniencia al paciente y facilitar el cumplimiento, los perfiles farmacocinéticos para análogos de GLP-1 de acción prolongada administrados por inyección pueden ser radicalmente diferentes de aquellos de las hormonas secretadas endógenamente. Este régimen puede ser eficaz, pero no imita la fisiología normal.

Aunque los enfoques/avances actuales para tratar diabetes y/ hiperglucemia usando análogos de GLP-1 de acción prolongada administrados por inyecciones subcutáneas han podido proporcionar un tratamiento aceptable para la diabetes, los tratamientos no imitan la fisiología natural del cuerpo. Por ejemplo, en individuos sanos, el GLP-1 endógeno se secreta solo después de una comida y solo en ráfagas cortas, según sea necesario. En contraposición, los análogos de GLP-1 de acción prolongada proporcionan exposición al fármaco durante periodos de tiempo que superan la fase postprandial. Por tanto, la terapia de GLP-1 ideal podría ser aquella en que se administra un fármaco a la hora de comer con exposición limitada al periodo postprandial. La vía pulmonar de administración de fármaco tiene el potencial de proporcionar dicho tratamiento pero, a nuestro entender, no se ha explorado anteriormente debido a la presencia de DPP-IV en los pulmones.

Un enfoque alternativo para prolongar la semivida en circulación del GLP-1 implica el desarrollo de inhibidores de DPP-IV, porque la DPP-IV es la enzima responsable del metabolismo de GLP-1. Se ha mostrado que la inhibición de DPP-IV aumenta la semivida del GLP-1 endógeno. Los inhibidores de dipeptidilpeptidasa IV incluyen vildagliptina (Galvus<sup>®</sup>) desarrollada por Novartis (Basilea, Suiza) y Januvia<sup>®</sup> (sitagliptina) desarrollada por (Whitehouse Station, NJ).

En contraposición con los individuos sanos, los métodos actuales para tratar pacientes con hiperglucemia y diabetes de tipo 2 usan análogos de GLP-1 de acción prolongada e inhibidores de DPP-IV que proporcionan exposición a fármaco durante periodos de tiempo que superan la fase postprandial. Por consiguiente, estos métodos actuales no están desprovistos de efectos secundarios perjudiciales o negativos tales como sudoración profusa, náuseas y vómitos, que afectan a la calidad de vida del paciente. Por lo tanto, los inventores han identificado la necesidad de desarrollar nuevos métodos de tratamiento de enfermedades usando un sistema de suministro de fármaco que aumenta la respuesta farmacodinámica al fármaco a menor exposición sistémica, evitando los efectos secundarios indeseados. Adicionalmente, los inventores han identificado la necesidad de suministrar fármacos directamente a la circulación arterial usando un método no invasivo.

En realizaciones de la presente memoria, se da a conocer un método para el tratamiento de enfermedades que incluyen enfermedades endocrinas, tales como diabetes, hiperglucemia y obesidad. Los inventores han identificado la necesidad de suministrar fármacos directamente a la circulación sistémica, en particular la circulación arterial, de modo no invasivo de forma que el fármaco alcance el órgano u órganos diana antes de volver a través del sistema venoso. Este enfoque puede dar como resultado paradójicamente una mayor exposición de pico del órgano diana a agentes activos que la resultante de una administración comparable por vía intravenosa, subcutánea u otra parenteral. Puede obtenerse una ventaja similar frente a la administración oral ya que, incluso con formulaciones que proporcionan protección de la degradación en el tracto digestivo, tras la absorción el agente activo entrará en la circulación venosa.

- En una realización, el sistema de suministro de fármaco puede usarse con cualquier tipo de agente activo que se metabolice y/o degrade rápidamente por contacto directo con las enzimas degradativas locales u otros mecanismos degradativos, por ejemplo oxidación, fosforilación o cualquier modificación de la proteína o péptido en el tejido venoso periférico o vascular encontrados con otras vías de administración, tales como administración oral, intravenosa, transdérmica y subcutánea. En esta realización, el método puede comprender la etapa de identificar y seleccionar un agente activo cuya actividad se metabolice o degrade por administración oral, subcutánea o intravenosa. Por ejemplo, debido a la labilidad, la inyección subcutánea de GLP-1 no ha conducido a niveles eficaces de GLP-1 en la sangre. Esto contrasta con péptidos tales como insulina, que puede suministrarse eficazmente mediante dichos modos de administración.
- En ciertas realizaciones, el método de tratamiento de una enfermedad o trastorno comprende la etapa de seleccionar un portador adecuado para inhalación y suministrar una sustancia activa a los alvéolos pulmonares. En esta realización, el portador puede estar asociado a uno o más agentes activos, formando un complejo de fármaco/portador que puede administrarse como composición que evita la degradación rápida del agente activo en el tejido venoso periférico y vascular del pulmón. En una realización, el portador es una dicetopiperazina.
- El método descrito en la presente memoria puede utilizarse para suministrar muchos tipos de agentes activos, incluyendo biológicos. En realizaciones particulares, el método utiliza un sistema de suministro de fármaco que suministra eficazmente una cantidad terapéutica de un agente activo, incluyendo hormonas peptídicas, rápidamente a la circulación arterial. En una realización, el uno o más agentes activos incluyen, pero sin limitación, péptidos tales como péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1), proteínas, lipocinas, productos farmacéuticos de molécula pequeña, ácidos nucleicos y similares que son sensibles a la degradación o desactivación; formular el agente activo en una composición en polvo seco que comprende una dicetopiperazina y suministrar el agente o agentes activos a la circulación sistémica por inhalación pulmonar usando un cartucho y un inhalador de polvo seco. En una realización, el método comprende seleccionar un péptido que es sensible a enzimas en el tejido vascular o periférico local, por ejemplo, de dermis y pulmones. El presente método permite que el agente activo evite o reduzca el contacto con tejido periférico y el metabolismo/degradación venoso o hepático. En otra realización, para suministro sistémico el agente activo no debería tener receptores específicos en los pulmones.
- En realizaciones alternativas, el sistema de suministro de fármaco puede usarse también para suministrar péptidos o proteínas terapéuticos de origen natural, recombinantes o de origen sintético para tratar enfermedades o trastornos, incluyendo, pero sin limitación, adiponectina, colecistocinina (CCK), secretina, gastrina, glucagón, motilina, somatostatina, péptido natriurético cerebral (BNP), péptido natriurético auricular (ANP), hormona paratiroidea, péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP), IGF-1, factor de liberación de hormona de crecimiento (GHRF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), anticuerpos anti-IL-8, antagonistas de IL-8 incluyendo ABX-IL-8; antagonista de receptor de precursor de integrina  $\beta 4$  (ITB4), encefalinas, nociceptina, nocistatina, orfanina FQ2, calcitonina, CGRP, angiotensina, sustancia P, neurocinina A, polipéptido pancreático, neuropéptido Y, péptido inductor del sueño  $\delta$ , prostaglandinas incluyendo PG-12, bloqueantes de receptor de LTB incluyendo LY29311, BIIL 284 y CP105696; péptido intestinal vasoactivo; triptanos tales como sumatriptano y lipocinas tales como C16:1n7 o palmitoleato. En aún otra realización, el agente activo es un fármaco de molécula pequeña.
- En una realización, el método de administración está dirigido al tratamiento de diabetes, hiperglucemia y/u obesidad usando, por ejemplo, formulaciones que comprenden péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1), oxintomodulina (OXN) o péptido YY(3-36) (PYY) solos o en combinación entre sí, o en combinación con uno o más agentes activos.
- En una realización ejemplar, un método para tratar obesidad, diabetes y/o hiperglucemia comprende administrar a un paciente necesitado de tratamiento una composición o formulación en polvo que comprende GLP-1 que estimula la secreción rápida de insulina endógena de células  $\beta$  pancreáticas sin causar efectos secundarios indeseados tales como sudoración profusa, náuseas y vómitos. En una realización, el método de tratamiento de la enfermedad puede aplicarse a un paciente, incluyendo un mamífero, que padece obesidad, diabetes sacarina de tipo 2 y/o hiperglucemia a dosificaciones en el intervalo de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 3 mg de GLP-1 en la formulación en una sola dosis. El método de tratamiento de hiperglucemia, diabetes y/u obesidad puede diseñarse para que el paciente pueda recibir al menos una dosis de una formulación de GLP-1 en proximidad a una comida o refrigerio. En esta realización, la dosis de GLP-1 puede seleccionarse dependiendo de los requisitos del paciente. En una realización, la administración pulmonar de GLP-1 puede comprender una dosis de GLP-1 mayor de 3 mg, por ejemplo, en el tratamiento de pacientes con diabetes de tipo 2.
- En realizaciones de la invención, la formulación de GLP-1 se administra por inhalación tal como por administración pulmonar. En esta realización, la administración pulmonar puede lograrse proporcionando el GLP-1 en una formulación de polvo seco para inhalación. La formulación de polvo seco es una composición estable y puede comprender micropartículas que son adecuadas para inhalación y que se disuelven rápidamente en el pulmón y suministran rápidamente GLP-1 a la circulación pulmonar. Los tamaños de partícula adecuados para administración pulmonar pueden ser de menos de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, y preferiblemente menos de 5  $\mu\text{m}$ . Los tamaños de partícula ejemplares que pueden alcanzar los alvéolos pulmonares oscilan de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5,8  $\mu\text{m}$  de diámetro. Dichos tamaños hacen referencia particularmente al diámetro aerodinámico, pero a menudo corresponden también con el diámetro físico real también. Dichas partículas pueden alcanzar los capilares

pulmonares y pueden evitar un contacto extenso con el tejido periférico en el pulmón. En esta realización, el fármaco puede suministrarse a la circulación arterial de manera rápida y evitar la degradación del ingrediente activo por enzimas u otros mecanismos antes de alcanzar su diana o sitio de acción en el cuerpo. En una realización, las composiciones de polvo seco para inhalación pulmonar que comprenden GLP-1 y FDKP pueden comprender micropartículas en las que de aproximadamente un 35 % a aproximadamente un 75 % de las micropartículas tienen un diámetro aerodinámico de menos de 5,8 µm.

En una realización, la formulación de polvo seco para uso con los métodos comprende partículas que comprenden una molécula de GLP-1 y una dicetopiperazina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En esta y otras realizaciones, la composición de polvo seco de la presente invención comprende una o más moléculas de GLP-1 seleccionadas del grupo consistente en un GLP-1 nativo, un metabolito de GLP-1, un GLP-1 de acción prolongada, un derivado de GLP-1, un mimético de GLP-1, una exendina o un análogo de los mismos. Los análogos de GLP-1 incluyen, pero sin limitación, proteínas de fusión de GLP-1 tales como albúmina ligada a GLP-1.

En una realización ejemplar, el método comprende la administración de la hormona peptídica GLP-1 a un paciente para el tratamiento de hiperglucemia y/o diabetes y obesidad. El método comprende administrar a un paciente necesitado de tratamiento una cantidad eficaz de una composición o formulación inhalable que comprende una formulación de polvo seco que comprende GLP-1 que estimula la secreción rápida de insulina endógena de células β pancreáticas sin causar efectos secundarios indeseados, incluyendo sudoración profusa, náuseas y vómitos. En una realización, el método de tratamiento de enfermedades puede aplicarse a un paciente, incluyendo un mamífero, que padece diabetes sacarina de tipo 2 y/o hiperglucemia a dosificaciones que oscilan de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 3 mg, o de aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 2 mg de GLP-1 en la formulación de polvo seco. En una realización, el paciente o sujeto para tratar es un ser humano. El GLP-1 puede administrarse inmediatamente antes de una comida (preprandial), con la comida (prandial) y/o aproximadamente 15, 30 o 45 minutos después de la comida (postprandial). En una realización, puede administrarse una dosis única de GLP-1 inmediatamente antes de una comida y puede administrarse otra dosis después de una comida. En una realización particular, pueden administrarse de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 1,5 mg de GLP-1 inmediatamente antes de una comida, seguido de 0,5 mg a aproximadamente 1,5 mg aproximadamente 30 minutos después de una comida. En esta realización, el GLP-1 puede formularse con partículas de inhalación tales como dicetopiperazinas con o sin portadores y excipientes farmacéuticos. En una realización, la administración pulmonar de la formulación de GLP-1 puede proporcionar concentraciones plasmáticas de GLP-1 mayores de 100 pmol/l sin inducir efectos secundarios adversos, tales como sudoración profusa, náuseas y vómitos, en el paciente.

En otra realización, se proporciona un método para tratar un paciente que incluye un ser humano con diabetes de tipo 2 e hiperglucemia, comprendiendo el método administrar al paciente una formulación inhalable de GLP-1 que comprende GLP-1 a una concentración de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 3 mg en micropartículas de FDKP, en el que los niveles de glucosa en la sangre del paciente se reducen a concentraciones plasmáticas de glucosa en ayunas de 85 a 70 mg/dl al cabo de aproximadamente 20 minutos después de dosificar sin inducir náuseas ni vómitos en el paciente. En una realización, la administración pulmonar de GLP-1 a una concentración mayor de 0,5 mg en una formulación que comprende micropartículas de FDKP carece de inhibición del vaciado gástrico.

En una realización, el GLP-1 puede administrarse solo como ingrediente activo en la composición o con un inhibidor de dipeptidilpeptidasa (DPP-IV) tal como sitagliptina o vildagliptina, o con uno o más de otros agentes activos. La DPP-IV es una serinproteasa de expresión ubicua que exhibe actividad peptidasa posprolina o alanina, generando así péptidos biológicamente inactivos mediante escisión en la región N-terminal después de X-prolina o X-alanina, en las que X hace referencia a cualquier aminoácido. Debido a que tanto GLP-1 como GIP (péptido insulínico dependiente de glucosa) tienen un residuo de alanina en posición 2, son sustratos de DPP-IV. Los inhibidores de DPP-IV son fármacos administrados por vía oral que mejoran el control glucémico al prevenir una degradación rápida de las hormonas incretinas, dando así como resultado aumentos postprandiales de los niveles de GLP-1 y GIP intactos biológicamente activos.

En esta realización, puede prolongarse o aumentarse adicionalmente *in vivo* la acción del GLP-1, si es necesario, usando inhibidores de DPP-IV. La combinación de GLP-1 e inhibidor de DPP-IV para el tratamiento de hiperglucemia y/o diabetes permite la reducción de la cantidad de GLP-1 activo que puede ser necesaria para inducir una respuesta de insulina apropiada por las células β en el paciente. En otra realización, el GLP-1 puede combinarse, por ejemplo, con otras moléculas distintas de un péptido, tales como por ejemplo metformina. En una realización, puede administrarse el inhibidor de DPP-IV u otras moléculas, incluyendo metformina, por inhalación en una formulación de polvo seco junto con el GLP-1 en una coformulación, o separadamente en su propia formulación de polvo seco que puede administrarse simultáneamente a o antes de la administración de GLP-1. En una realización, puede administrarse el inhibidor de DPP-IV u otras moléculas, incluyendo metformina, por otras vías de administración, incluyendo la oral. En una realización, puede administrarse el inhibidor de DPP-IV al paciente en dosis que oscilan de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, dependiendo de la necesidad del paciente. Puede usarse una concentración menor de inhibidor de DPP-IV cuando se coadministra, o coformula, con GLP-1. En esta realización, puede mejorarse la eficacia de la terapia de GLP-1 a intervalos de dosificación reducidos en comparación con las formas de dosificación actuales.

En realizaciones descritas en la presente memoria, puede administrarse el GLP-1 con la comida (en proximidad al tiempo de una comida o refrigerio). En esta realización, la exposición a GLP-1 puede limitarse al periodo postprandial, de modo que no cause los efectos de acción prolongada de las terapias actuales. En realizaciones en las que se coadministra el inhibidor de DPP-IV, puede procurarse el inhibidor de DPP-IV al paciente antes de la administración de GLP-1 con la comida. Las cantidades de inhibidor de DPP-IV para administrar pueden oscilar, por ejemplo, de aproximadamente 0,10 mg a aproximadamente 100 mg, dependiendo de la vía de administración seleccionada. En una realización adicional, pueden administrarse una o más dosis de GLP-1 después del inicio de la comida en lugar de, o además de, una dosis administrada en proximidad al inicio de la comida o refrigerio. Por ejemplo, pueden administrarse una o más dosis de 15 a 120 minutos después del inicio de una comida, tal como a los 30, 45, 60 o 90 minutos.

En una realización, puede utilizarse el sistema de suministro de fármacos en un método para tratar la obesidad para controlar o reducir el consumo de alimento en un animal tal como un mamífero. En esta realización, se administra a los pacientes necesitados de tratamiento o que padecen obesidad una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición o formulación inhalable que comprende GLP-1, una exendina, oxintomodulina, péptido YY(3-36) o combinaciones de los mismos, o análogos de los mismos, con o sin supresores del apetito adicionales conocidos en la materia. En esta realización, el método está orientado a reducir el consumo de alimento, inhibir la ingesta de alimento en el paciente, reducir o suprimir el apetito y/o controlar el peso corporal.

En una realización, la formulación inhalable comprende una formulación de polvo seco que comprende el ingrediente activo anteriormente mencionado con una dicetopiperazina, incluyendo 2,5-diceto-3,6-di(4-X-aminobutil)piperazina; en la que X se selecciona del grupo consistente en succinilo, glutarilo, maleilo y fumarilo, o una sal de dicetopiperazina. En esta realización, la formulación inhalable puede comprender micropartículas para inhalación que comprenden el ingrediente activo con las características aerodinámicas descritas anteriormente. En una realización, la cantidad de ingrediente activo puede determinarse por un especialista en la materia, sin embargo, las presentes micropartículas pueden cargarse con diversas cantidades de ingrediente activo según sea necesario para el paciente. Por ejemplo, para oxintomodulina, las micropartículas pueden comprender de aproximadamente 1 % (p/p) a aproximadamente 75 % (p/p) del ingrediente activo en la formulación. En ciertas realizaciones, las formulaciones inhalables pueden comprender de aproximadamente 10 % (p/p) a aproximadamente 30 % (p/p) de la composición farmacéutica y pueden comprender también un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un tensioactivo, tal como polisorbato 80. En esta realización, puede administrarse oxintomodulina al paciente de 1 a aproximadamente 4 veces al día o según sea necesario para el paciente, con dosis que oscilan de aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 5 mg en la formulación. En realizaciones particulares, la dosificación para administrar a un sujeto puede oscilar de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 3,0 mg de oxintomodulina. En una realización, la formulación inhalable puede comprender de aproximadamente 50 pmol a aproximadamente 700 pmol de oxintomodulina en la formulación.

En realizaciones dadas a conocer en la presente memoria en las que se usa PYY como ingrediente activo, puede elaborarse una formulación de polvo seco para suministro pulmonar que comprende de aproximadamente 0,10 mg a aproximadamente 3,0 mg de PYY por dosis. En ciertas realizaciones, la formulación puede comprender un polvo seco que comprende PYY en una cantidad que oscila de aproximadamente 1 % a aproximadamente 75 % (p/p) del péptido en la formulación. En realizaciones particulares, la cantidad de PYY en la formulación puede ser de 5, 10, 15 o 20 % (p/p) y comprender adicionalmente una dicetopiperazina. En una realización, la PYY se administra en una formulación que comprende una dicetopiperazina, tal como FDKP o una sal de la misma, incluyendo sales de sodio. En ciertas realizaciones, puede administrarse PYY a un sujeto en formas de dosificación de modo que las concentraciones plasmáticas de PYY después de la administración sean de aproximadamente 4 pmol/l a aproximadamente 100 pmol/l, o de aproximadamente 10 pmol/l a aproximadamente 50 pmol/l. En otra realización, puede administrarse la cantidad de PYY, por ejemplo, en cantidades que oscilan de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 30 mg, o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg en la formulación. Pueden determinarse otras cantidades de PYY como se describe, por ejemplo, en Savage *et al.* Gut, febrero de 1987; 28(2): 166-70; cuya divulgación se incorpora como referencia a la presente memoria. La formulación de PYY y/o análogo, u oxintomodulina y/o análogo puede administrarse de forma preprandial, prandial, periprandial o postprandial a un sujeto, o según necesite y dependiendo de la condición fisiológica del paciente.

En una realización, puede administrarse la formulación que comprende el ingrediente activo al paciente en una formulación de polvo seco por inhalación usando un inhalador de polvo seco tal como el inhalador dado a conocer, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 7.305.986 y la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 10/655.153 (US 2004/0182387). Puede administrarse también una inhalación repetida de la formulación de polvo seco que comprende el ingrediente activo entre comidas y diariamente, según sea necesario. En algunas realizaciones, la formulación puede administrarse una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces al día.

En todavía otra realización adicional, el método de tratamiento de hiperglucemia y/o diabetes comprende la administración de una composición de polvo seco inhalable que comprende una dicetopiperazina que tiene la fórmula 2,5-diceto-3,6-di(4-X-aminobutil)piperazina, en la que X se selecciona del grupo consistente en succinilo, glutarilo, maleilo y fumarilo. En esta realización, la composición de polvo seco puede comprender una sal de dicetopiperazina. En todavía otra realización de la presente invención, se proporciona una composición de polvo

seco en la que la dicetopiperazina es 2,5-diceto-3,6-di-(4-fumarilaminobutil)piperazina con o sin un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 En ciertas realizaciones, el método de tratamiento puede comprender una formulación de polvo seco para inhalación que comprende GLP-1, en la que la molécula de GLP-1 es GLP-1 nativo o una molécula de GLP-1 amidada, en la que la molécula de GLP-1 amidada es GLP-1 (7-36) amida, o combinaciones de las mismas. En una realización, el GLP-1 puede ser un análogo tal como exenatida.

10 En una realización, se administra a un paciente una formulación inhalable de GLP-1 en un intervalo de dosificación en el que la cantidad de GLP-1 es de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 3 mg, o de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 2,5 mg, o de aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 2 mg de la formulación. En una realización, puede procurarse a un paciente de diabetes de tipo 2 una dosis de GLP-1 mayor de 3 mg. En esta realización, el GLP-1 puede formularse con partículas de inhalación tales como dicetopiperazinas con o sin portadores y excipientes farmacéuticos. En una realización, la administración pulmonar de la formulación de GLP-1 puede proporcionar concentraciones plasmáticas de GLP-1 mayores de 100 pmol/l sin inducir efectos secundarios adversos indeseados, tales como sudoración profusa, náuseas y vómitos, en el paciente.

15 En otra realización, puede administrarse GLP-1 con insulina como terapia de combinación y procurarse de forma prandial para el tratamiento de hiperglucemia y/o diabetes, por ejemplo diabetes sacarina de tipo 2. En esta realización, pueden coformularse GLP-1 e insulina en una formulación de polvo seco o administrarse separadamente a un paciente en su propia formulación. En una realización, en la que se coadministran GLP-1 e insulina, pueden coformularse ambos ingredientes activos, por ejemplo, GLP-1 e insulina pueden prepararse en una  
20 formulación de polvo seco para inhalación usando una partícula de dicetopiperazina como se describe anteriormente. Como alternativa, GLP-1 e insulina pueden formularse separadamente, siendo cada formulación para inhalación y comprendiendo una partícula de dicetopiperazina. En una realización, las formulaciones de GLP-1 e insulina pueden mezclarse conjuntamente en su forma de polvo individual a la dosificación apropiada antes de la administración. En esta realización, la insulina puede ser insulina de acción corta, intermedia o prolongada y puede  
25 administrarse de forma prandial.

En una realización para el tratamiento de diabetes de tipo 2 usando coadministración de GLP-1 e insulina, puede administrarse una formulación inhalable de GLP-1 a un paciente de forma prandial, simultánea o secuencial a una formulación inhalable de insulina tal como insulina/FDKP. En esta realización, en un diabético de tipo 2, el GLP-1 puede estimular la secreción de insulina del páncreas del paciente, que puede retardar la progresión de la  
30 enfermedad al conservar la función de células  $\beta$  (tal como promoviendo el crecimiento de células  $\beta$ ), mientras que puede usarse insulina administrada de forma prandial como reemplazo de insulina que imita la respuesta normal del cuerpo a una comida. En ciertas realizaciones de la terapia de combinación, la formulación de insulina puede administrarse por otras vías de administración. En esta realización, la terapia de combinación puede ser eficaz para reducir los requisitos de insulina en un paciente para mantener el estado euglucémico. En una realización, la terapia  
35 de combinación puede aplicarse a pacientes que padecen obesidad y/o diabetes de tipo 2 que han tenido diabetes durante menos de 10 años y no está bien controlada por dieta y ejercicio o secretagogos. En una realización, la población de pacientes que reciben la terapia de combinación de GLP-1 e insulina puede caracterizarse por tener una función de células  $\beta$  aproximadamente un 25 % mayor que la de un individuo sano normal y/o una resistencia a insulina de menos de aproximadamente un 8 % y/o pueden tener un vaciado gástrico normal. En una realización, la  
40 terapia de combinación inhalable de GLP-1 e insulina puede comprender una insulina de acción rápida o insulina de acción prolongada tal como insulina glulisina (APIDRA<sup>®</sup>), insulina lispro (HUMALOG<sup>®</sup>) o insulina aspart (NOVOLOG<sup>®</sup>), o una insulina de acción prolongada tal como insulina detemir (LEVEMIR<sup>®</sup>) o insulina glargina (LANTUS<sup>®</sup>), que puede administrarse por un polvo de inhalación que comprende también FDKP o por otras vías de administración.

45 En otra realización, una terapia de combinación para tratar diabetes de tipo 2 puede comprender administrar a un paciente necesitado de tratamiento una cantidad eficaz de una formulación inhalable de insulina que comprende una insulina y una dicetopiperazina, en la que la insulina puede ser un péptido de insulina nativa o un péptido de insulina recombinante, y administrar adicionalmente al paciente un análogo de insulina de acción prolongada que puede proporcionarse por inhalación en una formulación que comprende una dicetopiperazina, o por otra vía de  
50 administración tal como inyección subcutánea. El método puede comprender adicionalmente la etapa de administrar al paciente una cantidad eficaz de un inhibidor de DPP IV. En una realización, el método puede comprender administrar a un paciente necesitado de tratamiento una formulación que comprende una molécula de insulina de acción rápida o de acción prolongada y una dicetopiperazina en combinación con una formulación que comprende un GLP-1 de acción prolongada, que pueden administrarse separada y/o secuencialmente. La terapia de GLP-1 para  
55 tratar diabetes, en particular diabetes de tipo 2, puede ser ventajosa puesto que la administración de GLP-1 solo en una formulación inhalable de polvo seco o en combinación con terapias de insulina o sin insulina puede reducir el riesgo de hipoglucemia.

60 En otra realización, pueden administrarse una formulación de GLP-1 de acción rápida y dicetopiperazina en combinación con un GLP-1 de acción prolongada, tal como exendina, para el tratamiento de diabetes, que pueden administrarse ambas por inhalación pulmonar. En esta realización, puede administrarse a un paciente diabético que padezca, por ejemplo diabetes de tipo 2, de forma prandial una cantidad eficaz de una formulación inhalable que

comprende GLP-1 para estimular la secreción de insulina, mientras que se administra secuencialmente, o a veces después tal como hasta 45 minutos después de la comida, una dosis de exendina 4. La administración de GLP-1 inhalable puede prevenir la progresión de la enfermedad al conservar la función de células  $\beta$ , mientras que la exendina 4 puede administrarse dos veces al día separadas aproximadamente 10 horas, lo que puede proporcionar niveles basales de GLP-1 que pueden imitar la fisiología normal del sistema de incretina en un paciente. Tanto el GLP-1 de acción rápida como el GLP-1 de acción prolongada pueden administrarse en formulaciones inhalables separadas. Como alternativa, el GLP-1 de acción prolongada puede administrarse mediante otros métodos de administración incluyendo, por ejemplo, transdérmica, intravenosa o subcutánea. En una realización, la administración prandial de una combinación de GLP-1 de acción corta y de acción prolongada puede dar como resultado una secreción de insulina aumentada, una mayor supresión de glucagón y un mayor retardo en el vaciado gástrico en comparación con el GLP-1 de acción prolongada administrado solo. La cantidad de GLP-1 de acción prolongada administrado puede variar dependiendo de la vía de administración. Por ejemplo, para suministro pulmonar, puede administrarse el GLP-1 de acción prolongada en dosis de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg por administración, inmediatamente antes de una comida o con la comida, dependiendo de la forma de GLP-1 administrada al paciente.

En una realización, el presente método puede aplicarse al tratamiento de la obesidad. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación inhalable de GLP-1 a un paciente necesitado de tratamiento, en la que la formulación de GLP-1 en polvo seco inhalable comprende GLP-1 y una dicetopiperazina como se describe anteriormente. En esta realización, puede administrarse la formulación inhalable de GLP-1 sola o en combinación con una o más hormonas endocrinas y/o agentes activos antiobesidad para el tratamiento de la obesidad. Las hormonas endocrinas y/o agentes activos antiobesidad ejemplares incluyen, pero sin limitación, péptido YY, oxintomodulina, amilina, análogos de amilina tales como acetato de pramlintida y similares. En una realización, pueden administrarse los agentes antiobesidad en coformulación en una composición inhalable de polvo seco sola o en combinación con GLP-1 conjuntamente o en una composición en polvo seco inhalable separada para inhalación. Como alternativa, en la combinación de GLP-1 con uno o más agentes antiobesidad o agentes que pueden causar saciedad, puede administrarse la formulación de GLP-1 en una formulación de polvo seco y puede administrarse el agente antiobesidad por vías alternativas de administración. En esta realización, puede administrarse un inhibidor de DPP-IV para potenciar o estabilizar el suministro de GLP-1 a la circulación arterial pulmonar. En otra realización, puede proporcionarse el inhibidor de DPP-IV en combinación con una formulación de insulina que comprende una dicetopiperazina. En esta realización, puede formularse el inhibidor de DPP-IV con dicetopiperazina para inhalación o puede administrarse en otra formulación por otras vías de administración tales como inyección subcutánea o administración oral.

En una realización, se proporciona un kit para tratar diabetes y/o hiperglucemia que comprende un cartucho de medicamento para inhalación que comprende una formulación de GLP-1 y un dispositivo de inhalación que está configurado para adaptar o fijar con seguridad el cartucho. En esta realización, el kit puede comprender adicionalmente un inhibidor de DPP-IV coformulado con GLP-1, o en una formulación separada para inhalación o administración oral como se describe anteriormente. En variaciones de esta realización, el kit no incluye el dispositivo de inhalación, que puede proporcionarse separadamente.

En una realización, la presente terapia de combinación que usa el sistema de suministro de fármaco puede aplicarse para tratar trastornos o síndromes metabólicos. En esta realización, la formulación de suministro de fármaco puede comprender una formulación que comprende una dicetopiperazina y un agente activo, incluyendo GLP-1 y/o un GLP-1 de acción prolongada solo o en combinación con uno o más agentes activos tales como un inhibidor de DPP-IV y exendina, orientada a tratar el síndrome metabólico. En esta realización, puede administrarse por inhalación pulmonar al menos uno de los agentes activos para proporcionar al sujeto necesitado de tratamiento y que puede exhibir resistencia a insulina.

En otra realización, puede usarse la administración pulmonar de la formulación en polvo seco inhalable que comprende GLP-1 y una dicetopiperazina como herramienta de diagnóstico para diagnosticar el nivel o grado de progresión de la diabetes de tipo 2 en un paciente aquejado de diabetes, para identificar el régimen de tratamiento particular adecuado para el paciente para tratar. En esta realización, se da un método para diagnosticar el nivel de progresión de la diabetes en un paciente identificado por tener diabetes, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad predeterminada de la formulación inhalable de polvo seco que comprende GLP-1 y una dicetopiperazina, y medir la producción o respuesta de insulina endógena. La administración de la formulación inhalable de polvo seco que comprende GLP-1 puede repetirse con cantidades predeterminadas de GLP-1 hasta obtener los niveles apropiados de respuesta de insulina para ese paciente para determinar el régimen de tratamiento requerido por el paciente. En esta realización, si una respuesta de insulina del paciente es inadecuada, el paciente puede requerir terapias alternativas. Los pacientes que son sensibles o que responden a la insulina pueden tratarse con una formulación de GLP-1 que comprende una dicetopiperazina como terapia. De esta manera, puede administrarse la cantidad específica de GLP-1 a un paciente para conseguir una respuesta de insulina apropiada para evitar la hipoglucemia. En esta y otras realizaciones, el GLP-1 puede inducir una liberación rápida de insulina endógena que imita la fisiología normal de liberación de insulina en un paciente.

En una realización, el presente sistema de suministro de fármaco puede aplicarse para tratar trastornos o síndromes metabólicos. En esta realización, la formulación de suministro de fármaco puede comprender una formulación que

comprende una dicetopiperazina y un agente activo, incluyendo GLP-1 y/o un GLP-1 de acción prolongada solo o en combinación con uno o más agentes activos tales como un inhibidor de DPP-IV y exendina, orientada a tratar el síndrome metabólico. En esta realización, puede administrarse por inhalación pulmonar al menos uno de los agentes activos para proporcionar al sujeto necesitado de tratamiento y que puede exhibir resistencia a insulina.

## 5 EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### Administración de GLP-1 en un polvo seco inhalable a hombres adultos sanos

Se ha mostrado que el GLP-1 controla la glucosa sanguínea elevada en seres humanos cuando se procura por infusiones intravenosa (iv) o subcutánea (sc) o por múltiples inyecciones subcutáneas. Debido a la vida útil extremadamente corta de la hormona, se requeriría una infusión subcutánea continua o múltiples inyecciones subcutáneas diarias para conseguir eficacia clínica. Ninguna de estas vías es práctica para un uso clínico prolongado. Los solicitantes han encontrado en animales experimentales que, cuando se administraba GLP-1 por inhalación, podían conseguirse niveles terapéuticos. Los resultados de estos estudios pueden encontrarse, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. n° 11/735.957.

En individuos sanos, varias de las acciones del GLP-1, incluyendo la reducción del vaciado gástrico, saciedad aumentada y supresión de la secreción inapropiada de glucagón, parecen estar ligadas a la descarga de GLP-1 liberado cuando empieza la comida. Al suplementar esta oleada temprana de GLP-1 con una formulación de GLP-1 y 2,5-diceto-3,6-di(4-fumarilaminobutil)piperazina (FDKP) como polvo de inhalación, puede desencadenarse en animales diabéticos una respuesta farmacodinámica, incluyendo la producción de insulina endógena y la reducción de los niveles de glucagón y glucosa. Además, la oleada tardía de GLP-1 nativo ligada a una secreción aumentada de insulina puede imitarse por la administración postprandial del polvo de inhalación de GLP-1/FDKP.

Se diseñó un estudio clínico de fase 1a de polvo de inhalación de GLP-1/FDKP para ensayar la seguridad y tolerabilidad de las dosis seleccionadas de un nuevo producto terapéutico de control glucémico inhalado por primera vez en sujetos humanos. Se administró el polvo de inhalación de GLP-1/FDKP usando el dispositivo inhalador MedTone<sup>®</sup>, anteriormente probado. Se diseñaron los experimentos para identificar la seguridad y tolerabilidad de diversas dosis del polvo de inhalación de GLP-1/FDKP por inhalación pulmonar. Se seleccionaron las dosis para uso humano basándose en los resultados del estudio de seguridad animal de estudios no clínicos en ratas y primates usando GLP-1/FDKP administrado por inhalación como se describe en la solicitud de EE.UU. n° de serie 11/735.957.

Se inscribieron 26 sujetos en 5 cohortes para proporcionar hasta 4 sujetos evaluables en cada una de las cohortes 1 y 2 y hasta 6 sujetos evaluables en cada una de las cohortes 3 a 5 que satisfacían los criterios de elegibilidad y completaron el estudio. Se dosificó a cada sujeto una vez con GLP-1 como polvo de inhalación de GLP-1/FDKP a los siguientes niveles de dosis: cohorte 1: 0,05 mg; cohorte 2: 0,45 mg; cohorte 3: 0,75 mg; cohorte 4: 1,05 mg y cohorte 5: 1,5 mg de GLP-1. No se reemplazaron los abandonos. Estas dosificaciones suponían una masa corporal de 70 kg. Los especialistas en la materia pueden determinar niveles de dosificación adicionales basándose en los estudios dados a conocer en la presente memoria.

En estos experimentos, se determinaron la seguridad y tolerabilidad de dosis crecientes de polvo de inhalación de GLP-1/FDKP en sujetos masculinos adultos sanos. Se determinó la tolerabilidad de dosis crecientes del polvo de inhalación de GLP-1/FDKP monitorizando los efectos farmacológicos o adversos con variables que incluyen los eventos adversos (EA) reseñados, signos vitales, exámenes físicos, pruebas de laboratorio clínico y electrocardiogramas (ECG).

Se evaluaron también parámetros de seguridad y farmacocinéticos adicionales. Se estudió la seguridad pulmonar expresada como la incidencia de eventos adversos pulmonares y otros y de cambios en la función pulmonar entre la visita 1 (revisión) y la visita 3 (seguimiento). Se midieron los parámetros farmacocinéticos (PK) de GLP-1 plasmático y fumarildicetopiperazina (FDKP) sérica después de dosificación con polvo de inhalación de GLP-1/FDKP como AUC<sub>0-120 min</sub> de GLP-1 plasmático y AUC<sub>0-480 min</sub> de FDKP sérica. Los parámetros PK adicionales de GLP-1 plasmático incluían el tiempo en alcanzar la concentración plasmática máxima de GLP-1, T<sub>máx</sub> plasmática de GLP-1, la concentración plasmática máxima de GLP-1, C<sub>máx</sub> plasmática de GLP-1 y la mitad del tiempo total en alcanzar la concentración plasmática máxima de GLP-1, T<sub>1/2</sub> plasmático de GLP-1. Los parámetros PK adicionales de FDKP sérica incluían el T<sub>máx</sub> de FDKP sérica, la C<sub>máx</sub> de FDKP sérica y el T<sub>1/2</sub> de FDKP sérica. Los criterios de valoración clínica del ensayo estaban basados en una comparación de los siguientes parámetros farmacológicos y de seguridad determinados en la población sujeto de ensayo. Los criterios de valoración primarios incluían la incidencia e intensidad de los EA reseñados, incluyendo tos y disnea, náuseas y/o vómitos, así como los cambios desde la revisión de signos vitales, pruebas de laboratorio clínico y exámenes físicos. Los criterios de valoración secundarios incluían la disposición farmacocinética de GLP-1 plasmático y FDKP sérica (AUC<sub>0-120 min</sub> de GLP-1 plasmático y AUC<sub>0-480 min</sub> de FDKP sérica), GLP-1 plasmático (T<sub>máx</sub> de GLP-1 plasmático, C<sub>máx</sub> de GLP-1 plasmático y T<sub>1/2</sub> de GLP-1 plasmático); FDKP sérica (T<sub>máx</sub> de FDKP sérica, C<sub>máx</sub> de FDKP sérica); pruebas de la función pulmonar (PFP) y ECG.

El ensayo clínico consistía en 3 visitas clínicas: 1) una visita de revisión (visita 1); 2) una visita de tratamiento (visita 2) y 3) una visita de seguimiento (visita 3) 8-14 días después de la visita 2. Se administró una sola dosis de polvo de inhalación de GLP-1/FDKP en la visita 2.

Se valoraron 5 dosis de polvo de inhalación de GLP-1/FDKP (0,05, 0,45, 0,75, 1,05 y 1,5 mg de GLP-1). Para acomodar todas las dosis, se mezcló GLP-1/FDKP formulado con partículas que contienen polvo de inhalación de FDKP sin agente activo. Se usaron cartuchos monodosis que contenían 10 mg de polvo seco consistentes en polvo de inhalación de GLP-1/FDKP (GLP-1 al 15 %/FDKP p/p) tal cual o mezclado con la cantidad apropiada de polvo de inhalación de FDKP para obtener la dosis deseada de GLP-1 (0,05 mg, 0,45 mg, 0,75 mg, 1,05 mg y 1,5 mg). Se evaluaron los dos primeros niveles de dosis más bajas en 2 cohortes de 4 sujetos cada una y se evaluaron los tres niveles de dosis más altas en 3 cohortes de 6 sujetos cada una. Cada sujeto recibió solo 1 dosis de los 5 niveles de dosis valorados. Además de la sangre extraída para las medidas de GLP-1 (activo y total) y FDKP, se tomaron muestras para la determinación de glucagón, glucosa, insulina y péptido C. Se describen los resultados de estos experimentos con referencia a las siguientes figuras y tablas.

La FIG. 1 reproduce la concentración plasmática de GLP-1 activo en la cohorte 5 después de la administración pulmonar de 1,5 mg de dosis de GLP-1. Los datos mostraban que la concentración de pico de GLP-1 tenía lugar antes del primer punto de muestreo a los 3 minutos, asemejándose estrechamente a la administración en embolada intravenosa (IV). Las concentraciones plasmáticas de GLP-1 en algunos sujetos eran mayores de 500 pmol/l, el límite de ensayo. Las concentraciones plasmáticas de pico de GLP-1 activo oscilan de aproximadamente 150 pmol/l a aproximadamente 500 pmol/l. La administración por embolada intravenosa de GLP-1 como se reseña en la bibliografía (VilSBoll *et al.* 2000) da como resultado cocientes de GLP-1 total/activo de 3,0-5,0 en comparación con el cociente de 1,5 en la cohorte 5 de este estudio. A concentraciones activas comparables, los picos metabólicos eran 8-9 veces mayores después de la administración intravenosa en comparación con la administración pulmonar, sugiriendo que el suministro pulmonar da como resultado un suministro rápido y menos degradación del GLP-1.

**Tabla 1.**

Parámetro <sup>a</sup>	Tratamiento				
	0,05 mg (n= 4)	0,45 mg (n= 4)	0,75 mg (n= 6)	1,05 mg (n= 6)	15 mg (n= 6)
<b>GLP-1<sup>a</sup></b>					
AUC <sub>0-120</sub> (min·pmol/l)	ND	n= 1 355,33	n= 6 880,12 (195,656)	n= 4 1377,88 (634,054)	n= 4 superior al LMC
C <sub>máx</sub> (pmol/l)	n= 4 2,828 (2,4507)	n= 4 24,630 (8,7291)	n= 6 81,172 (63,3601)	n= 4 147,613 (122,7014)	n= 6 310,700 (54,2431)
t <sub>máx</sub> (min)	n= 4 3,00 (3,00, 3,00)	n= 4 3,00 (3,00, 4,02)	n= 6 3,00 (3,00, 6,00)	n= 6 3,00 (3,00, 4,98)	n= 6 3,00 (3,00, 3,00)
T <sub>1/2</sub> (min)	n= 1 6,1507	n= 3 3,0018 (0,83511)	n= 6 5,5000 (2,96928)	n= 4 3,6489 (1,88281)	n= 6 3,9410 (1,79028)
<b>FDKP</b>					
AUC <sub>0-120</sub> (min·pmol/l)				n= 6 22169,2 (4766,858)	n= 6 25594,7 (5923,689)



C <sub>máx</sub> (pmol/l)				n= 6 184,21 (56,893)	n= 6 210,36 (53,832)
t <sub>máx</sub> (min)				n= 6 4,50 (3,00, 25,02)	n= 6 6,00 (3,00, 19,98)
T <sub>1/2</sub> (min)				n= 6 126,71 (11,578)	n= 6 123,82 (15,640)

<sup>a</sup>Todos los parámetros son medias (DE) excepto la t<sub>máx</sub>, que es mediana (intervalo)

Superior al LMC – Dos o más sujetos en el grupo de dosis tenían concentraciones plasmáticas del analito que eran superiores al LMC; NA= El perfil farmacocinético no cumplía la especificaciones para este perfil debido al corto tiempo de muestreo (20 minutos); ND = El parámetro no pudo calcularse debido a los datos insuficientes en algunos sujetos.

5

En individuos sanos, las concentraciones plasmáticas venosas postprandiales fisiológicas de GLP-1 oscilan típicamente en 10-20 pmol/l (Vilsboll *et al.* J. Clin. Endocr. & Metabolism. 88(6): 2706-13, junio de 2003). Estos niveles se consiguen con algunos sujetos de la cohorte 2, que recibían 0,45 mg de GLP-1. Dosis mayores de GLP-1 producían concentraciones plasmáticas de pico de GLP-1 sustancialmente mayores que las concentraciones venosas de pico fisiológicas. Sin embargo, debido a que la semivida del GLP-1 es corta (aproximadamente 1-2 minutos), las concentraciones plasmáticas del GLP-1 activo caían dentro del intervalo fisiológico a los 9 min después de la administración. Aunque las concentraciones de pico son mucho más altas que las observadas fisiológicamente en la circulación venosa, existen evidencias de que las concentraciones locales de GLP-1 pueden ser mucho más altas que las observadas sistémicamente.

10

15 La Tabla 1 muestra el perfil farmacocinético de GLP-1 en una formulación que comprende FDKP de este estudio.

Se representan también los parámetros farmacocinéticos de FDKP en la Tabla 1 para las cohortes 4 y 5. No se analizaron otras cohortes. Los datos muestran también que la concentración plasmática media de FDKP para los sujetos tratados con 1,05 mg y 1,5 mg d GLP-1 eran de aproximadamente 184 y 211 pmol/l, respectivamente. Se alcanzaron las concentraciones plasmáticas máximas de FDKP aproximadamente 4,5 y 6 min después de la administración de la dosis respectiva, con una semivida de aproximadamente 2 h (127 y 123 min).

20

La FIG. 2A reproduce las concentraciones medias de insulina en sujetos tratados con una formulación de GLP-1 inhalable en polvo seco a una dosis de 1,5 mg. Los datos muestran que la dosis de GLP-1 de 1,5 mg inducía la liberación de insulina endógena de las células β, puesto que se detectaron concentraciones de insulina en todos los sujetos, y tenían lugar concentraciones medias de pico de insulina de aproximadamente 380 pmol/l a los 6 min después de la dosificación o antes. La liberación de insulina era rápida, pero no mantenida, puesto que la concentración plasmática de insulina caía rápidamente después de la respuesta inicial a GLP-1. La FIG. 2B reproduce la concentración plasmática de GLP-1 de sujetos tratados con la dosis de 1,5 mg de GLP administrado por inhalación pulmonar en comparación con la administración subcutánea de una dosis de GLP-1. Los datos ilustran que la administración pulmonar de GLP-1 tiene lugar relativamente rápido y que la concentración plasmática de pico de GLP-1 tiene lugar más rápido que con la administración subcutánea. Adicionalmente, la inhalación pulmonar de GLP-1 conduce a concentraciones plasmáticas de GLP-1 de vuelta a los niveles basales mucho más rápidamente que con la administración subcutánea. Por tanto, la exposición del paciente a GLP-1 proporcionado por inhalación pulmonar usando el presente sistema de suministro de fármaco es más corta en el tiempo que la administración subcutánea, y la exposición total a GLP-1 medida por el AUC es menor que para la insulina inhalada. La FIG. 2C ilustra que la administración pulmonar de una formulación de GLP-1 en polvo seco induce una respuesta de insulina que es similar a la respuesta obtenida después de la administración intravenosa de GLP-1, pero diferente en el tiempo hasta el pico y la cantidad de insulina endógena producida, que con la administración subcutánea de GLP-1, lo que indica que la administración pulmonar de GLP-1 usando la presente formulación es más eficaz para inducir una respuesta de insulina.

25

30

35

40

La FIG. 3 reproduce las concentraciones plasmáticas de péptido C en sujetos tratados con una formulación inhalable de polvo seco que contiene una dosis de GLP-1 de 1,5 mg medida en diversos momentos después de la inhalación. Los datos demuestran que el péptido C se libera después de la inhalación de GLP-1, confirmando la liberación de insulina endógena.

La FIG. 4 reproduce las concentraciones plasmáticas de glucosa en ayuno en sujetos tratados con la formulación de GLP-1 que contiene GLP-1. Las concentraciones plasmáticas medias de glucosa en ayunas (GPA) eran de aproximadamente 4,7 mmol/l para los sujetos tratados con 1,5 mg de GLP-1. La liberación de insulina mediada por GLP-1 es dependiente de la glucosa. No se observa históricamente hipoglucemia en sujetos euglucémicos. En este experimento, los datos muestran claramente que las concentraciones de glucosa en estos sujetos sanos euglucémicos se reducían después de la administración pulmonar de GLP-1. A la dosis de GLP-1 de 1,5 mg, dos de los seis sujetos tenían concentraciones de glucosa reducidas por el GLP-1 por debajo de 3,5 mmol/l, el valor de laboratorio que define la hipoglucemia. Los niveles plasmáticos de glucosa se redujeron más de 1,5 mol/l en dos de los seis sujetos que recibieron la dosis de 1,5 mg de GLP-1. Además, las reducciones de la glucosa plasmática se correlacionaban con la dosis de GLP-1. Se observó la reducción menor de la concentración de glucosa con la dosis de 0,05 mg, y se observó la reducción mayor con la dosis de 1,5 mg. Las tres dosis intermedias de GLP-1 produjeron reducciones aproximadamente iguales de la glucosa plasmática. Los datos indican que la dependencia de GLP-1 de la glucosa estaba superada, basándose en las concentraciones de GLP-1 por encima del intervalo fisiológico. Se ha reseñado que los intervalos fisiológicos de GLP-1 (7-36) amida en individuos normales están en el intervalo de 5-10 pmol/l durante el ayuno, y aumentan rápidamente después de comer hasta 15 a 50 pmol/l (Drucker, D. y Nauck, M. The Lancet 368: 1696-1705, 2006).

La FIG. 5 reproduce adicionalmente que las concentraciones plasmáticas de insulina después de la administración pulmonar de GLP-1 son dependientes de la dosis. En la mayoría de sujetos, la liberación de insulina no era mantenida, puesto que la concentración plasmática de insulina caía rápidamente después de la respuesta inicial a la administración de GLP-1. En la mayoría de sujetos, la respuesta de insulina plasmática de pico oscilaba en 200-400 pmol/l, con un sujeto exhibiendo niveles plasmáticos de insulina de pico que superaban 700 pmol/l. Por tanto, los datos indican que la respuesta de insulina es dependiente de la dosis de GLP-1.

La FIG. 6 reproduce las concentraciones plasmáticas de glucagón después de la administración pulmonar de GLP-1 a los diversos grupos de dosificación. Los niveles de glucagón de valor de referencia oscilaban desde 13,2 pmol/l a 18,2 pmol/l en los diversos grupos de dosis. Se observó el cambio máximo en el glucagón plasmático a los 12 min después de la dosificación. La reducción mayor de glucagón plasmático era de aproximadamente 2,5 pmol/l, y se observó en el grupo de dosis de 1,5 mg. La supresión máxima de la secreción de glucagón se subestimó potencialmente porque la mínima no siempre tenía lugar a los 12 min.

Las Tablas 2 y 3 reseñan los síntomas de eventos adversos o efectos secundarios registrados para la población de pacientes en el estudio. La lista de eventos adversos reseñados en la bibliografía para GLP-1 administrado por inyección no es exhaustiva, y aquellos reseñados se han descrito como leves o moderados y tolerables. Los eventos adversos primarios reseñados han sido sudoración profusa, náuseas y vómitos cuando las concentraciones de GLP-1 activo superaban 100 pmol/l. Como se muestra en las Tablas 1 y 3 y la FIG. 1, la administración pulmonar de dosis de 1,05 mg y 1,5 mg daba como resultado concentraciones de GLP-1 activo que superaban en gran medida 100 pmol/l sin los efectos secundarios observados normalmente con el GLP-1 parenteral (subcutáneo, intravenoso [en embolada o infusión]). Ninguno de los sujetos de este estudio reseñó síntomas de náuseas, sudoración profusa ni vómitos. Los sujetos de la cohorte 5 alcanzaron una  $C_{máx}$  comparable a la observada con los datos de embolada IV de 50 µg/kg (reseñados por Vilsboll *et al.* 2000), en que la mayoría de sujetos reseñaron eventos adversos significativos.

**Tabla 2.** Eventos adversos

Evento adverso	0,05 mg (n= 4)	0,45 mg (n= 4)	0,75 mg (n= 6)	1,05 mg (n= 6)	1,5 mg (n= 6)
Tos	3	1	3	5	5
Disfonía	2	-	2	3	3
Tos productiva	-	-	1	-	-
Irritación de garganta	-	-	-	1	-
Dolor de cabeza	1	1	-	1	1
Mareos	-	-	-	-	2
Disgeusia	-	-	1	-	-
Fatiga	-	-	1	1	1
Alergia estacional	-	-	-	1	-

Rinitis	-	-	-	1	-
Apetito aumentado	-	-	-	-	1

**Tabla 3.** Eventos adversos comparativos de GLP-1: administración IV frente a pulmonar

Eventos adversos	IV <sup>†</sup>	IV <sup>†</sup>	Pulmonar*
	(16,7 µg)	(50 µg)	(1,5 mg)
Reducción del bienestar	42%	100%	17%
Náuseas	33%	83%	0%
Sudoración profusa	17%	67%	0%

<sup>†</sup>Vilsboll *et al.* Diabetes Care, junio de 2000; <sup>\*</sup> C<sub>máx</sub> comparable

5 Las Tablas 2 y 3 muestran que no se reseñaron eventos adversos graves ni intensos por ningún sujeto del estudio que recibió GLP-1 por inhalación pulmonar. Los eventos adversos más comúnmente reseñados eran aquellos asociados a la inhalación de un polvo seco, tos e irritación de garganta. Sorprendentemente, en los pacientes tratados por inhalación pulmonar, ningún sujeto reseñó náuseas ni disforia, y no hubo vómitos asociados a ninguno de estos sujetos. Los inventores encontraron también que la administración pulmonar de GLP-1 en una formulación de polvo seco carece de inhibición del vaciado gástrico en los sujetos anteriores (datos no mostrados). La inhibición del vaciado gástrico es un efecto secundario indeseado encontrado comúnmente asociado a formulaciones estándares inyectadas de GLP-1.

15 En resume, el polvo clínico de GLP-1/FDKP contenía hasta un 15 % en peso de GLP-1, proporcionando una dosis máxima de 1,5 mg de GLP-1 en 10 mg de polvo. Las medidas de cascada de Andersen indicaron que un 35-70 % de las partículas tenían diámetros aerodinámicos < 5,8 µm. Una dosis de 1,5 mg de GLP-1 producía concentraciones de pico medias >300 pmol/l de GLP-1 activo al primer tiempo de muestreo (3 min), daba como resultado concentraciones de pico medias de insulina de 375 pmol/l al primer punto temporal medido (6 min) y glucosa plasmática media reducida en ayunas de 85 a 70 mg/dl 20 min después de la dosificación, era bien tolerada y no causaba náuseas ni vómitos.

## EJEMPLO 2

### 20 Comparación de la administración pulmonar de GLP-1 y exenatida y la administración subcutánea de exenatida a ratas obesas diabéticas Zucker macho

25 Se han invertido muchos esfuerzos en desarrollar análogos de GLP-1 con semividas en circulación más largas para llegar a un tratamiento clínicamente útil. Como se demuestra en la presente memoria, la administración pulmonar de GLP-1 proporciona también una actividad clínicamente significativa. Era por tanto de interés comparar estos dos enfoques.

#### Preparación de partículas de FDKP

30 Se disolvieron fumarildicetopiperazina (FDKP) y polisorbato 80 en amoniacos acuoso diluido, obteniendo una disolución que contiene un 2,5 % en peso de FDKP y un 0,05 % en peso de polisorbato 80. Se mezcló entonces la disolución de FDKP con una disolución de ácido acético que contenía polisorbato 80, formando partículas. Se lavaron las partículas y se concentraron por filtración de flujo tangencial, consiguiendo aproximadamente un 11 % en peso de sólidos.

#### Preparación de una solución madre de GLP-1

35 Se preparó una disolución madre de GLP-1 al 10 % en peso en agua desionizada combinando 60 mg de sólidos de GLP-1 (86,6 % de péptido) con 451 mg de agua desionizada. Se añadieron aproximadamente 8 µl de ácido acético glacial para disolver el péptido.

#### Preparación de partículas de GLP-1/FDKP

40 Se transfirió una porción de 1 g de la suspensión madre de FDKP (108 mg de partículas) a un tubo de polipropileno de 2 ml. Se añadió la cantidad apropiada de disolución madre de GLP-1 (Tabla 1) a la suspensión y se mezcló suavemente. Se ajustó el pH de la suspensión de pH ~3,5 a pH ~4,5 añadiendo una alícuota de 1 µl de hidróxido de amonio al 50 % (v/v). Se sedimentó entonces la suspensión de partículas de GLP-1/FDKP en nitrógeno líquido y se liofilizó. Se analizaron los polvos secos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se encontraron comparables a los valores teóricos.

## Preparación de una disolución madre de exenatida

Se preparó una disolución madre de exendina al 10 % en peso en ácido acético al 2 % en peso combinando 281 mg de sólidos de exendina (88,9 % de péptido) con 2219 mg de ácido acético al 2 % en peso.

## Preparación de partículas de exenatida/FDKP

- 5 Se transfirió una porción de 1533 mg de una suspensión madre de partículas de FDKP (171 mg de partículas) a un vial de vidrio de 4 ml. Se añadió una porción de 304 mg de disolución madre de exendina a la suspensión y se mezcló suavemente. Se ajustó el pH de la suspensión de pH -3,7 a pH -4,5 añadiendo alícuotas de 3-5  $\mu$ l de hidróxido de amonio al 25 % (v/v). Se sedimentó entonces la suspensión de partículas de exenatida/FDKP en nitrógeno líquido y se liofilizó. Se analizaron los polvos secos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se encontraron comparables con los valores teóricos.

## Valoración farmacocinética y farmacodinámica en ratas

- 15 Se asignaron ratas obesas diabéticas Zucker (ZDF) macho (5/grupo) a uno de los cuatro grupos de prueba. Se hicieron ayunar los animales durante una noche y se les administró entonces glucosa (1 g/kg) por inyección intraperitoneal inmediatamente antes de la dosificación del artículo de prueba. Los animales del grupo de control recibieron aire por insuflación pulmonar. Los animales del grupo 1 recibieron exenatida (0,3 mg) en disolución salina (0,1 ml) por inyecciones subcutáneas (SC). Los animales del grupo 2 recibieron exenatida al 15 % en peso/FDKP (2 mg) por insuflación pulmonar. Los animales del grupo 3 recibieron un GLP-1 al 15 % en peso/FDKP (2 mg) por insuflación pulmonar. Se recogieron muestras de sangre de la cola antes de dosificar y 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 480 min después de dosificar. Se recolectó el plasma. Se determinaron las concentraciones de glucosa sanguínea y GLP-1 plasmático o exenatida plasmática.

- 25 Se reseña la farmacocinética de la exenatida en la FIG. 7A. Estos datos mostraban que la exenatida se absorbe rápidamente después de la insuflación de polvo de exenatida/FDKP. La biodisponibilidad de la exenatida inhalada era de un 94 %, en comparación con la inyección subcutánea. Esto puede indicar que la administración pulmonar es particularmente ventajosa para la exenatida. El tiempo hasta las concentraciones de pico máximas ( $T_{m\acute{a}x}$ ) de exenatida en circulación era de 30 min en ratas que reciben exenatida subcutánea, en comparación con <15 min en ratas que reciben exenatida inhalada. Esta  $T_{m\acute{a}x}$  era similar a la de GLP-1/FDKP insuflado (datos no mostrados).

- 30 Se reseña la farmacodinámica comparativa en la FIG. 8. Estos datos mostraban los cambios en la glucosa sanguínea para todos los cuatro grupos de prueba. Las fluctuaciones de glucosa después de la prueba de tolerancia a glucosa eran menores en animales que recibían exenatida/FDKP inhalada en comparación con animales que recibían exenatida SC. Puesto que la exposición a exenatida era comparable en ambos grupos (FIG. 7), estos datos sugieren que el tiempo más corto hasta las concentraciones de pico de exenatida en el grupo de exenatida/FDKP proporcionaba un mejor control de la glucosa. Adicionalmente, las fluctuaciones de glucosa eran comparables en animales que recibían cualquiera de GLP-1/FDKP o exenatida/FDKP. Estos datos son sorprendentes porque la semivida en circulación de la exenatida (89 min) es considerablemente mayor que la del GLP-1 (15 min). Es más, la exenatida se desarrolló para maximizar la semivida en circulación con el fin de aumentar la eficacia. Estos datos sugieren que la semivida en circulación mayor de la exenatida no ofrece ventajas en el control de hiperglucemia cuando se usa la administración pulmonar. Además, la administración pulmonar de cualquier molécula proporcionaba un control de la glucosa sanguínea superior a la exenatida SC.

- 40 La FIG. 7 representa las concentraciones plasmáticas medias de exendina en ratas ZDF macho que recibían la formulación en polvo de exendina 4/FDKP administrada por insuflación pulmonar frente a exendina 4 subcutánea. Los cuadrados negros representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de polvo de exendina 4/FDKP. Los cuadrados blancos representan la respuesta después de la administración de exendina 4 administrada por vía subcutánea. Los datos se grafican como  $\pm$  desviación estándar. Los datos muestran que las ratas insufladas con polvos que proporcionan dosis de GLP-1 de 0,12, 0,17 y 0,36 mg producían concentraciones plasmáticas máximas de GLP-1 ( $C_{m\acute{a}x}$ ) de 2,3, 4,9 y 10,2 nM y exposiciones (AUC) de 57,1 nM·min, 92,6 nM·min y 227,9 nM·min, respectivamente ( $t_{m\acute{a}x}$  = 10 min,  $t_{1/2}$  = 10 min). En una prueba de tolerancia a glucosa intraperitoneal realizada después de 4 días consecutivos de dosificación de 0,3 mg de GLP-1 al día, los animales tratados exhibían concentraciones de glucosa significativamente menores que el grupo de control ( $p < 0,05$ ). A los 30 min después de la exposición, la glucosa aumentaba un 47 % en los animales de control, pero solo un 17 % en los animales tratados.

- 55 La FIG. 8 reproduce el cambio en la glucosa sanguínea desde el valor de referencia en ratas ZDF macho que recibían control de aire, polvo de exendina 4/FDKP o polvo de GLP-1/FDKP por insuflación pulmonar frente a exendina 4 subcutánea y exendina 4 administrada por insuflación pulmonar. Los rombos negros representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de polvo de exendina 4/FDKP. Los círculos negros representan la respuesta después de la administración de exendina 4 subcutánea. Los triángulos negros representan la respuesta después de la administración de polvo de GLP-1/FDKP. Los cuadrados negros representan la respuesta después de la insuflación pulmonar de aire solo. Los cuadrados blancos representan la respuesta procurada por 2 mg de GLP-

1/FDKP procurados a las ratas por insuflación, seguido de 2 mg de polvo de exendina 4/FDKP administrado también por insuflación.

### EJEMPLO 3 (ilustrativo)

#### Preparación de polvo de oxintomodulina/FDKP

5 La oxintomodulina, también conocida como glucagón 37, es un péptido consistente en 37 residuos aminoacídicos. El péptido se fabricó y adquirió en American Peptide Company, Inc. de Sunnyvale, CA. Se mezclaron partículas de FDKP en suspensión con una disolución de oxintomodulina, se congelaron entonces rápidamente como aglomerados en nitrógeno líquido y se liofilizaron, produciendo polvos de muestra.

10 Se prepararon 6 polvos con un contenido de péptido diana de entre 5 y 30 %. El contenido real de péptido determinado por HPLC estaba entre 4,4 y 28,5 %. Se analizaron las propiedades aerodinámicas del polvo que contenía un 10 % de péptido usando impactación en cascada.

Se mezcló entonces la disolución de FDKP con una disolución de ácido acético que contenía polisorbato 80, formando partículas. Se lavaron las partículas y se concentraron por filtración de flujo tangencial, consiguiendo aproximadamente un 11 % en peso de sólidos.

15 Se pesó la suspensión de partículas de FDKP (1885 mg x 11,14 % de sólidos= 210 mg de partículas de FDKP) en un vial de vidrio transparente de 4 ml. Se tapó el vial y se mezcló usando un agitador magnético para evitar la sedimentación. Se añadió una disolución de oxintomodulina (909 mg de péptido al 10 % en ácido acético al 2 % en peso) al vial y se dejó mezclar. El cociente de la composición final era de aproximadamente 30:70 de partículas de oxintomodulina:FDKP. La suspensión de oxintomodulina/FDKP tenía un pH inicial de 4,00, que se ajustó a pH 4,48  
20 añadiendo incrementos de 2-10 µl de hidróxido de amonio/agua 1:4 (v/v). Se sedimentó la suspensión en un pequeño disco de cristalización que contenía nitrógeno líquido. Se dispuso el disco en un liofilizador y se liofilizó a 0,027 kPa. Se elevó la temperatura de almacenamiento de -45 a 25 °C a 0,2 °C/min y se mantuvo entonces a 25 °C durante aproximadamente 10 horas. Se transfirió el polvo resultante a un vial de vidrio transparente de 4 ml. El rendimiento total del polvo después de la transferencia al vial era de 309 mg (103 %). Se ensayó en las muestras el contenido de oxintomodulina diluyendo la preparación de oxintomodulina en bicarbonato de sodio y ensayando por cromatografía líquida a alta presión en un sistema de separación Waters 2695, usando desionizada con 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA) y acetonitrilo con 0,1 % de TFA como fases móviles, con una detección de longitud de onda fijada a 220 y 280 nm. Se analizaron los datos usando el programa informático Waters Empower™.

#### Valoración farmacocinética y farmacodinámica en ratas

30 Se asignaron ratas ZDF macho (10/grupo) a uno de cuatro grupos. Los animales en el grupo uno recibieron oxintomodulina por inyección intravenosa. Los animales en los otros tres grupos recibieron polvo de oxintomodulina al 5%/FDKP (que contenía 0,15 mg de oxintomodulina), polvo de oxintomodulina al 15 %/FDKP (que contenía 0,45 mg de oxintomodulina) o polvo de oxintomodulina al 30 %/FDKP (que contenía 0,9 mg de oxintomodulina) por insuflación pulmonar. Se recogieron muestras de sangre de la cola antes de dosificar y en diversos momentos  
35 después de dosificar para medir las concentraciones plasmáticas de oxintomodulina (FIG. 9A). Se monitorizó también el consumo de alimento en diversos momentos después de dosificar con oxintomodulina (FIG. 9B).

40 La FIG. 9A es una gráfica que compara las concentraciones plasmáticas de oxintomodulina después de la administración de una formulación inhalable de polvo seco a diversas cantidades en ratas ZDF macho y ratas de control que reciben oxintomodulina por inyección intravenosa. Estos datos muestran que la oxintomodulina se absorbe rápidamente después de la insuflación de polvo de oxintomodulina/FDKP. El tiempo hasta concentraciones de pico máximas ( $T_{máx}$ ) de oxintomodulina en circulación era menor de 15 min en ratas que reciben oxintomodulina inhalada. Este estudio muestra que la semivida de la oxintomodulina es de aproximadamente 22 a aproximadamente 25 min después de la administración pulmonar.

45 La FIG. 9B es una gráfica de barras que muestra el consumo acumulado de alimento en ratas ZDF macho tratadas con oxintomodulina intravenosa o polvo de oxintomodulina/FDKP administrado por insuflación pulmonar en comparación con animales de control que reciben una corriente de aire. Los datos muestran que la administración pulmonar de oxintomodulina/FDKP reducía el consumo de alimento en mayor medida que la oxintomodulina intravenosa o el control de aire con una sola dosis.

50 En un conjunto similar de experimentos, las ratas recibieron una corriente de aire como control (grupo 1) o polvo de oxintomodulina al 30 %/FDKP por insuflación pulmonar. Las ratas administradas con polvo de inhalación de oxintomodulina/FDKP recibieron dosis de 0,15 mg de oxintomodulina (como 0,5 mg de polvo de oxintomodulina/FDKP; grupo 2), 0,45 mg de oxintomodulina (como 1,5 mg de polvo de oxintomodulina/FDKP, grupo 3) o 0,9 mg de oxintomodulina (como 3 mg de polvo de oxintomodulina/FDKP, grupo 4) preparadas como se describe anteriormente. Los estudios se realizaron en ratas ZDF en ayunas durante 24 h antes del inicio del  
55 experimento. Se dejaron a las ratas comer después de recibir la dosis experimental. Se procuró una cantidad predeterminada de alimento a las ratas y se midió la cantidad de alimento consumido por las ratas en diversos momentos después del inicio del experimento. Se administró la formulación de polvo seco de oxintomodulina/FDKP

a las ratas por insuflación pulmonar y se tomaron medidas del alimento y muestras de sangre en diversos puntos después de la dosificación.

Las FIG. 10A y 10B muestran las concentraciones de oxintomodulina en circulación para todos los animales de prueba y el cambio en el consumo de alimento desde el control, respectivamente. Las ratas procuradas con oxintomodulina consumían significativamente menos alimento que las ratas de control durante hasta 6 h después de la dosificación. Las dosis mayores de oxintomodulina parecían suprimir el apetito más significativamente que las dosis menores, indicando que la supresión del apetito es dependiente de la dosis, ya que las ratas procuradas con la mayor dosis consumían la menor cantidad de alimento en todos los puntos temporales medidos después de la dosificación.

Se detectaron las concentraciones máximas de oxintomodulina en sangre a los 10 a 30 min y la concentración máxima de oxintomodulina era dependiente de la dosis, ya que las ratas que recibían 1,5 mg de oxintomodulina tenían una concentración plasmática máxima de 311 µg/ml, y las ratas que recibían 3 mg de oxintomodulina tenían una concentración plasmática máxima de 660 µg/ml. La semivida ( $t_{1/2}$ ) de la oxintomodulina en ratas Sprague Dawley después de administración por insuflación pulmonar oscilaba de aproximadamente 25 a 51 min.

#### 15 EJEMPLO 4.

##### Administración de GLP-1 en un polvo seco inhalable a pacientes diabéticos de tipo 2

Se realizó un ensayo clínico de fase 1 de polvo de inhalación de GLP-1/FDKP en pacientes que padecen diabetes sacarina de tipo 2 para valorar los niveles de glucosa de los pacientes antes y después del tratamiento con formulación de polvo seco de GLP-1 por inhalación pulmonar. Estos estudios se realizaron según el ejemplo 1 y como se describe en la presente memoria. Se preparó el polvo de inhalación de GLP-1 como se describe en la solicitud de patente de EE.UU n° 11/735.957. El polvo seco de inhalación contenía 1,5 mg de GLP-1 (7-36) amida humana en un total de 10 mg de formulación de polvo seco que contiene FDKP en un cartucho monodosis. Para este estudio, se hicieron ayunar durante una noche 20 pacientes con diabetes de tipo 2, incluyendo hombres adultos y mujeres postmenopáusicas, y siguieron en ayunas durante un periodo de 4 h después de la administración de polvo de inhalación de GLP-1. Se administró la formulación de polvo seco usando el inhalador de polvo seco Medtone® (MannKind Corporation) descrito en la solicitud de patente de EE.UU. n° 10/655.153.

Se obtuvieron muestras de sangre para valorar los niveles séricos de glucosa de los pacientes tratados 30 min antes de la dosificación, en la dosificación (tiempo 0) y aproximadamente 2, 4, 9, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 240 min después de la administración de GLP-1. Se analizaron los niveles séricos de glucosa para cada muestra.

La FIG. 11 es una gráfica que muestra los resultados de estos estudios y reproduce los valores de glucosa obtenidos de 6 pacientes en ayunas con diabetes de tipo 2 después de la administración de una única dosis de una formulación inhalable en polvo seco que contiene GLP-1 en diversos puntos temporales. Los valores de glucosa para los 6 pacientes se redujeron después de la administración de GLP-1 y permanecieron reducidos durante al menos 4 h después de la administración a la terminación de estudio.

La FIG. 12 es una gráfica que muestra los valores medios de glucosa para el grupo de 6 pacientes en ayunas con diabetes de tipo 2 cuyos valores de glucosa se muestran en la FIG. 11. En la FIG. 12, se expresan los valores de glucosa como cambio medio de los niveles de glucosa desde tiempo cero (dosificación) para los 6 pacientes. La FIG. 12 muestra una caída media de glucosa de aproximadamente 1 mmol/l, que es aproximadamente equivalente a de aproximadamente 18 mg/dl a aproximadamente 20 mg/dl que se alcanza en el punto temporal de 30 min. Esta caída media de los niveles de glucosa dura 120 minutos. Los cambios son mayores en sujetos con mayor glucosa de valor de referencia y más prolongados, mientras que en 2 de los 6 sujetos, aquellos sujetos con la glucosa sanguínea en ayunas de valor de referencia más baja, mostraron solo una reducción transitoria de los niveles de glucosa en este marco temporal (datos no mostrados). Se observó que aquellos con glucosa en ayunas más alta típicamente no tienen la misma respuesta de insulina que aquellos con los valores más bajos, de modo que cuando se estimulan aquellos sujetos con glucosa en ayunas más alta exhiben típicamente una mayor respuesta que aquellos cuyos valores de glucosa son más cercanos a los normales.

#### 45 EJEMPLO 5.

##### Modelo de distribución de primer paso de GLP-1 intacto a cerebro e hígado

Se calculó la distribución de primer paso de GLP-1 a través de la circulación sistémica después del suministro pulmonar y la administración en embolada intravenosa para determinar la eficacia de suministro para ambos métodos de administración de GLP-1. Se desarrolló un modelo basado en las suposiciones de que: (1) la absorción de GLP-1 en los pulmones y en las venas pulmonares exhibía una cinética de orden cero; (2) la distribución de GLP-1 al cerebro y en el cerebro tiene lugar instantáneamente y (3) el aclaramiento de GLP-1 del cerebro y la distribución en el hígado están impulsados solo por el flujo sanguíneo basal. Basándose en estas suposiciones, el análisis para determinar la cantidad de GLP-1 en el cerebro y el hígado se basó en los datos publicados con respecto a la extracción de GLP-1 por ciertos tejidos y órganos (Deacon, CF. *et al.* "Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig." American Physiological Society, 1996, páginas E458-E464), y la

distribución del flujo sanguíneo en el cuerpo y la velocidad debida al gasto cardiaco de estudios humanos (“Guyton Textbook of Physiology”, 10ª edición; W. B. Saunders, 2000, página 176). En un sujeto normal (70 kg) que tiene parámetros fisiológicos normales tales como presión sanguínea en reposo, la velocidad de flujo basal al cerebro e hígado es de 700 ml/min y 1350 ml/min, respectivamente. Basándose en el gasto cardiaco, se ha calculado la distribución de flujo sanguíneo al cuerpo como 14 % al cerebro, 27 % al hígado y 59 % a los tejidos corporales restantes (Guyton).

Usando los parámetros anteriormente mencionados, se determinaron las cantidades relativas de GLP-1 que se distribuirían al cerebro e hígado para una dosis de 1 mg procurada por administración pulmonar e intravenosa. Se dividió 1 mg de GLP-1 entre 60 segundos, y se multiplicó el número resultante por 14 % de distribución de flujo al cerebro. Por lo tanto, cada segundo aparece una fracción de dosis en el cerebro. A partir de los datos disponibles que indican que la sangre en el cerebro es igual a 150 ml y que la velocidad de aclaramiento es de 700 ml/min, los cálculos de aclaramiento de GLP-1 producen aproximadamente 12 ml/s, que es igual a aproximadamente un 8 % del volumen sanguíneo que se está aclarando del cerebro por segundo. En estudios intravenosos en cerdos reseñados por Deacon *et al.*, se metabolizaba instantáneamente un 40 % del GLP-1 en la vena y se metabolizaba también un 10 % en la sangre desoxigenada en el pulmón. Por consiguiente, se restó un 40 % seguido de otro 10 % del GLP-1 total de la cantidad total administrada en los cálculos con respecto al análisis de datos intravenosos.

Para las cantidades de GLP-1 estimadas en el hígado, se hicieron las mismas suposiciones de degradación para las vías de administración intravenosa y pulmonar, con 40 % seguido de otro 10 % de pérdida de la cantidad total para la dosis IV. Se supuso que un 27 % del GLP-1 restante se distribuía al hígado, con un 75 % de la sangre pasando a través del lecho portal primero. Se supuso una distribución instantánea de sangre en el hígado. Los cálculos fueron los siguientes: Se dividió 1 mg de GLP-1 en 60 segundos, se restó un 40 % seguido de otro 10 % del GLP-1 total de la cantidad total administrada con respecto a los análisis de datos intravenosos. Se supuso degradación nula para la administración pulmonar. Se multiplicaron los números resultantes por 27 % de distribución de flujo al hígado, para ambas vías de administración, con un 75 % de esta cantidad pasando a través del lecho portal primero. En los estudios intravenosos en cerdos reseñados por Deacon *et al.*, se reseñó un 20 % de extracción por el lecho portal; por ello se redujo el 75 % de la cantidad de GLP-1 un 20 % antes de introducirse al hígado. Por lo tanto, la cantidad total de GLP-1 que aparece en el hígado cada segundo comprende una fracción que ha experimentado metabolismo en el lecho portal. A partir de los datos disponibles que indican que el volumen sanguíneo en el hígado es igual a 750 ml y que la velocidad de aclaramiento es de 1350 ml/minuto, el cálculo de aclaramiento de GLP-1 produce aproximadamente 22,5 ml/segundo, que es igual a aproximadamente un 3 % del volumen de sangre que se está aclarando del hígado por segundo. Deacon *et al.* reseñaron un 45 % de degradación en el hígado, por consiguiente se restó un 45 % del GLP-1 total de la cantidad total que aparece en el hígado, y se añadió el resto a la cantidad restante total.

Se presentan en las Tablas 4 y 5 los resultados de los cálculos descritos anteriormente. Se muestra a continuación la distribución de GLP-1 calculada en cerebro e hígado después de administración pulmonar (Tabla 4):

**Tabla 4.** Administración pulmonar de 1 mg de GLP-1

Tiempo en segundos	Cerebro (µg)	Hígado (µg)
1	2,3	2,10
5	9,94	9,91
60	29,0	58,9

Se muestra en la Tabla 5 siguiente resultados que ilustran la distribución de GLP-1 después de una administración en embolada intravenosa:

**Tabla 5.** Administración en embolada intravenosa de 1 mg de GLP-1 durante 1 minuto

Tiempo en segundos	Cerebro (µg)	Hígado (µg)
1	1,26	1,14
5	5,37	5,35
60	15,6	31,7

Los datos anteriores son ilustraciones representativas de la distribución de GLP-1 en tejidos específicos del cuerpo después de la degradación de GLP-1 por enzimas endógenas. Basándose en las determinaciones anteriores, las

cantidades de GLP-1 en cerebro e hígado después de administración pulmonar son de aproximadamente 1,82 a aproximadamente 1,86 veces mayores que las cantidades de GLP-1 después de administración en embolada intravenosa. Por lo tanto, los datos indican que el suministro pulmonar de GLP-1 puede ser una vía de suministro más eficaz cuando se compara con la administración intravenosa de GLP-1, ya que la cantidad de GLP-1 en diversos momentos después de la administración sería aproximadamente el doble de la cantidad obtenida con administración intravenosa. Por lo tanto, el tratamiento de una enfermedad o trastorno que comprende GLP-1 por administración pulmonar requeriría cantidades totales menores, o casi la mitad de la dosis de GLP-1 intravenoso que se requiere para procurar el mismo o similar efecto.

#### EJEMPLO 6

Se realizaron los estudios en este ejemplo para medir los parámetros farmacocinéticos de diversos agentes activos mediante administración subcutánea y en formulaciones que comprenden FDKP, sal disódica de FDKP, DKP sustituida con succinilo (SDKP, a la que se hace referencia también en la presente memoria como compuesto 1) o DKP asimétrica (monosustituida con fumarilo) (a la que se hace referencia también en la presente memoria como compuesto 2) a ratas ZDF administradas por insuflación pulmonar. Se dividieron las ratas en 8 grupos y se asignaron 5 ratas a cada grupo. Cada rata del grupo 1 recibió una dosis de 0,3 mg de exendina 4 en disolución salina tamponada con fosfato por instilación líquida pulmonar; el grupo 2 recibió 0,3 mg de exendina 4 en disolución salina tamponada con fosfato por inyección subcutánea.

Las ratas en los grupos 3-8 recibieron su dosificación de agente activo o exendina 4 por insuflación pulmonar como sigue: las ratas del grupo 3 recibieron una formulación de 2 mg de GLP-1/FDKP por insuflación pulmonar, seguida de una dosis de 2 mg de exendina 4; el grupo 4 recibió una formulación de exendina 4/FDKP; las ratas del grupo 5 recibieron una dosis de 3 mg de exendina 4 formulada como una carga del 9,2 % en una sal disódica de FDKP; las ratas del grupo 6 recibieron una dosis de 2 mg de exendina 4 formulada como una carga del 13,4 % en una sal disódica de FDKP; el grupo 7 recibió una dosis de 2 mg de exendina 4 formulada como una carga del 14,5 % en SDKP y las ratas del grupo 8 recibieron una dosis de 2 mg de exendina 4 formulada como una carga del 13,1 % en DKP asimétrica (monosustituida con fumarilo).

La dosificación de los animales tuvo lugar en el transcurso de dos días para acomodar el alto número de sujetos. Se administraron los diversos artículos de prueba a los animales y se tomaron muestras de sangre en diversos momentos después de la dosificación. Se midieron las concentraciones de exendina 4 en aislamientos de plasma, cuyos resultados se proporcionan en la FIG. 13. Como se reproduce en la gráfica, las ratas tratadas del grupo 4 que recibieron exendina 4 en una formulación que contenía FDKP exhibieron altos niveles de exendina 4 en la sangre 30 min antes y a mayores niveles que las ratas en el grupo 2, que recibieron exendina 4 mediante administración subcutáneas. En todos los grupos, los niveles de exendina 4 se reducen bruscamente aproximadamente 1 hora después de la administración.

La administración de exendina 4/FDKP por insuflación pulmonar a ratas ZDF tiene similares  $C_{m\acute{a}x}$ , AUC y biodisponibilidad normalizadas a la dosis que la exendina 4 administrada como inyección subcutánea. La exendina 4/FDKP administrada por insuflación pulmonar mostraba una semivida más de dos veces mayor en comparación con exendina 4 por inyección subcutánea. La exendina 4 administrada como formulación de DKP monosustituida con fumarilo o SDKP mostraba menores  $C_{m\acute{a}x}$ , AUC y biodisponibilidad normalizadas a la dosis en comparación con la inyección subcutánea (aproximadamente un 50 % menos), pero mayores niveles que la instilación pulmonar.

Después de un ayuno de un anoche, se procuró a ratas ZDF una exposición a glucosa mediante inyección intraperitoneal (PTGIP). El tratamiento con exendina 4/FDKP mostraba una mayor reducción de los niveles sanguíneos de glucosa después de la PTGIP en comparación con la exendina 4 por vía subcutánea. En comparación con los animales con control de aire, los niveles sanguíneos de glucosa se reducían significativamente después de una PTGIP durante 30 y 60 min en animales administrados con exendina 4 por inyección subcutánea y polvo de exendina 4/FDKP por administración pulmonar, respectivamente. Las ratas ZDF del grupo 3 tratadas con exendina 4/FDKP y GLP-1 por insuflación pulmonar después del tratamiento con administración de glucosa intraperitoneal (PTGIP) mostraban niveles sanguíneos de glucosa sorprendentemente menores después de PTGIP en comparación con cualquier tratamiento solo a los 30 min después de la dosis (-28 % frente a -24 %).

#### EJEMPLO 7 (ilustrativo)

Se realizaron los estudios en este ejemplo para medir el perfil farmacocinético y farmacodinámico de formulaciones del péptido YY(3-36) por administración pulmonar a ratas ZDF en comparación con inyecciones intravenosas.

Preparación de formulación de PYY/FDKP para suministro pulmonar: Se obtuvo el péptido YY(3-36) (PYY) usado en estos experimentos de American Peptide y se adsorbió sobre partículas de FDKP en función del pH. Se preparó una disolución madre de péptido al 10 % pesando 85,15 mg de PYY en un vial transparente de 8 ml y añadiendo ácido acético acuoso al 2 % hasta un peso final de 762 mg. Se mezcló suavemente el péptido para obtener una disolución transparente. Se añadió una suspensión de FDKP (4968 mg, que contiene 424 mg de partículas preconformadas de FDKP) al vial que contenía la disolución de PYY, lo que formó una suspensión de partículas de PYY/FDKP. Se dispuso la muestra sobre una placa de agitación magnética y se mezcló concienzudamente a lo largo del



experimento. Se usó un microelectrodo de pH para monitorizar el pH de la mezcla. Se usaron alícuotas de 2-3  $\mu$ l de una disolución acuosa de amoniaco al 14-15 % para aumentar incrementalmente el pH de la muestra. Se retiraron volúmenes de muestra (75  $\mu$ l para análisis del sobrenadante; 10  $\mu$ l para la suspensión) en cada punto de pH. Se transfirieron las muestras para el análisis de sobrenadante a tubos de filtro de 0,22  $\mu$ m de 1,5 ml y se centrifugaron. Se transfirieron la suspensión y muestras de sobrenadante filtradas a viales de automuestreador de HPLC que contenían 990  $\mu$ l de disolución de bicarbonato de sodio 50 mM. Se analizaron las muestras diluidas por HPLC para valorar las características de las preparaciones. Los experimentos indicaban que, por ejemplo, una disolución de PYY al 10,2 % puede adsorberse sobre partículas de FDKP a pH 4,5. En esta preparación particular, por ejemplo, se determinó que el contenido de PYY del polvo resultante por HPLC era de un 14,5% (p/p). Las medidas de cascada de las características aerodinámicas del polvo mostraron una fracción respirable del 52 % con un 98 % de vaciado de cartucho cuando se descarga mediante un inhalador de polvo seco MedTone (MannKind Corporation). Basándose en los resultados anteriores, se elaboraron múltiples preparaciones de muestra de polvo de PYY/FDKP incluyendo PYY al 5, 10, 15 y 20 %.

Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos: Se usaron ratas ZDF hembra en estos experimentos y se dividieron en 7 grupos: se asignaron 5 ratas a cada grupo, excepto el grupo 1 que tenía 3 ratas. Se hicieron ayunar las ratas durante 24 h antes de procurarles su dosis asignada, se les proporcionó inmediatamente alimento después de la dosificación y se dejaron comer como desearan durante el periodo del experimento. Cada rata del grupo 1 recibió una dosis IV de 0,6 mg de PYY en disolución salina tamponada con fosfato; las ratas del grupo 2 recibieron 1,0 mg de instilación líquida pulmonar de PYY; las ratas del grupo 3 se designaron como control y recibieron una corriente de aire; las ratas de los grupos 4-7 recibieron una formulación en polvo seco para inhalación administrada por insuflación pulmonar como sigue: las ratas del grupo 4 recibieron 0,15 mg de PYY en una formulación de 3 mg de polvo de PYY/FDKP con carga de 5 % de PYY (p/p); las ratas del grupo 5 recibieron 0,3 mg de PYY en una formulación de 3 mg de polvo de PYY/FDKP con carga de 10 % de PYY (p/p); las ratas del grupo 6 recibieron 0,45 mg de PYY en una formulación de 3 mg de polvo de PYY/FDKP con carga de 15 % de PYY (p/p); las ratas del grupo 7 recibieron 0,6 mg de PYY en una formulación de 3 mg de polvo de PYY/FDKP con carga de 20 % de PYY (p/p).

Se midió el consumo de comida para cada rata a los 30, 60, 90, 120, 240 min y 24 h después de la dosificación. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de PYY y concentraciones de glucosa para cada rata a partir de muestras de sangre tomadas de las ratas antes de la dosificación y a los 5, 10, 20, 30, 45, 60 y 90 min después de la dosificación. Se muestran en las FIG. 14-16 y la Tabla 6 siguiente los resultados de estos experimentos. La FIG. 14 es un gráfico de barras de los datos representativos de experimentos que miden el consumo de alimento en ratas ZDF hembra que reciben formulaciones de PYY por administración intravenosa y por administración pulmonar en una formulación que comprende una fumarildicetopiperazina a diversas dosis. Los datos muestran que el consumo de alimento se reducía para todas las ratas tratadas con PYY en comparación con el control, con la excepción del grupo 2 que recibía PYY por instilación. La reducción del consumo de alimento por las ratas era estadísticamente significativa para las ratas tratadas por insuflación pulmonar a los 30, 60, 90 y 120 min después de la dosificación de PYY cuando se comparaba con el control. Los datos de la FIG. 14 muestran también que, aunque la administración IV (grupo 1) es relativamente eficaz para reducir el consumo de alimento en las ratas, la misma cantidad de PYY (0,6 mg) administrada por vía pulmonar en una formulación de FDKP (grupo 7) era más eficaz en la reducción de la ingesta de alimento o la supresión del apetito durante un periodo más largo de tiempo. Todas las ratas tratadas con PYY que recibían polvos de PYY-FDKP pulmonares consumían menos alimento en comparación con los controles.

La FIG. 15 reproduce los niveles de glucosa sanguínea medidos en ratas ZDF hembra procuradas con formulaciones de PYY por administración IV, por administración pulmonar con diversas formulaciones que comprenden una fumarildicetopiperazina y ratas de control de aire. Los datos indican que los niveles de glucosa sanguínea de las ratas tratadas con PYY por insuflación pulmonar permanecían relativamente similares a los controles, excepto para las ratas del grupo 1 que se trataron con PYY IV. Las ratas del grupo 1 mostraban un nivel inicial de glucosa sanguínea menor en comparación con otras ratas hasta aproximadamente 15 min después de la dosificación.

La FIG. 16 reproduce los datos representativos de experimentos que miden la concentración plasmática de PYY en ratas ZDF hembra procuradas con formulaciones de PYY por administración IV, por administración pulmonar con diversas formulaciones que comprenden una fumarildicetopiperazina y ratas de control de aire tomados en diversos momentos después de la administración. Estas medidas se representan también en la Tabla 6. Los datos muestran que las ratas del grupo 1 a las que se administró PYY IV alcanzaron una concentración plasmática de PYY mayor (30,7  $\mu$ g/ml) que las ratas tratadas por insuflación pulmonar. La concentración plasmática de pico ( $T_{m\acute{a}x}$ ) para PYY era de aproximadamente 5 min para ratas de los grupos 1, 6 y 7 y de 10 min para ratas de los grupos 2, 4 y 5. Los datos muestran que todas las ratas tratadas por insuflación pulmonar con una formulación de PYY/FDKP tenían cantidades mensurables de PYY en sus muestras plasmáticas, sin embargo, las ratas del grupo 7 tenían la concentración plasmática de PYY más alta (4,9  $\mu$ g/ml) y los valores permanecían más altos que en los demás grupos hasta aproximadamente 35 min después de la dosificación. Los datos indican también que la concentración plasmática de PYY administrada por insuflación pulmonar es dependiente de la dosis. Aunque la administración por inyección IV condujo a una concentración plasmática venosa de PYY mayor que la administración pulmonar de PYY/FDKP a las dosificaciones usadas, la mayor supresión del consumo de alimento se consiguió no obstante con la administración pulmonar de PYY/FDKP.

Tabla 6

Número de grupo de ratas	T <sub>1/2</sub> (min)	T <sub>máx</sub> (min)	C <sub>máx</sub> (µg/ml)	AUC <sub>todos/D</sub> (min/ml)	BA (%)
1	13	5	30,7	0,61	100%
2	22	10	1,7	0,06	11
4	23	10	0,51	0,10	16
5	30	10	1,33	0,15	25
6	26	5	2,79	0,20	33
7	22	5	4,90	0,22	36

La FIG. 17 ilustra la eficacia del presente sistema de suministro de fármaco medida para varios agentes activos, incluyendo insulina, exendina, oxintomodulina y PYY y ejemplificada con los mismos. Específicamente, la FIG. 17 demuestra la relación entre la exposición a fármaco y el bioefecto del sistema de suministro de fármaco pulmonar en comparación con la administración IV y SC de los agentes activos anteriormente mencionados. Los datos en la FIG. 17 indican que el presente sistema de suministro de fármaco pulmonar proporciona un mayor bioefecto con menores cantidades de exposición a fármaco que la administración intravenosa o subcutánea. Por lo tanto, pueden requerirse menores cantidades de exposición a fármaco para obtener un efecto similar o mayor de un fármaco deseado cuando se compara con terapias estándares. Por tanto, en una realización, se incluye un método de suministro de un agente activo, incluyendo péptidos tales como GLP-1, oxintomodulina o PYY, para el tratamiento de una enfermedad, incluyendo diabetes, hiperglucemia y obesidad, que comprende administrar a un sujeto necesitado de tratamiento una formulación inhalable que comprende uno o más agentes activos y una dicetopiperazina, con lo que se observa un efecto terapéutico con menor exposición al agente activo que la requerida para conseguir un efecto similar con otros modos de administración. En una realización, los agentes activos incluyen péptidos, proteínas y lipocinas.

#### EJEMPLO 8.

##### Valoración de la actividad de GLP-1 en diabetes de tipo 2 postprandial

El fin de este estudio era evaluar el efecto de una formulación de polvo seco de GLP-1 sobre la concentración de glucosa postprandial y valorar su seguridad incluyendo eventos adversos, actividad de GLP-1, respuesta de insulina y vaciado gástrico.

Diseño experimental: Se dividió el estudio en dos periodos y se inscribieron 20 pacientes diagnosticados con diabetes de tipo 2 en un intervalo de edad de 20 a 64 años. El periodo 1 era un ensayo de dosis única sin anonimato en que 15 de los pacientes recibieron una formulación de polvo seco que comprendía 1,5 mg de GLP-1 en FDKP administrada después de haber ayunado durante una noche. Como control, 5 sujetos recibieron polvo de inhalación de FDKP después de haber ayunado durante una noche. Se efectuó el periodo 2 después de terminar el periodo 1. En esta parte del estudio, se procuraron a los pacientes 4 tratamientos secuenciales cada uno con una exposición a comida consistente en 475 Kcal y marcada con <sup>13</sup>C-octanoato como marcador. Se diseñó el estudio como un estudio de exposición a comida cruzado con doble simulación y doble anonimato en que se procuraron disolución salina como control y exenatida en forma de inyección 15 minutos antes de una comida, se administraron inmediatamente antes de la comida formulaciones de polvo seco de GLP-1 inhalable o placebo consistente en una formulación de polvo seco sin GLP-1 y se repitieron 30 minutos después de la comida. Los cuatro tratamientos fueron como sigue: el tratamiento 1 consistía en que todos los pacientes recibieron un placebo de 1,5 mg de formulación de polvo seco sin GLP-1. En el tratamiento 2, todos los pacientes recibieron una dosis de 1,5 mg de GLP-1 en una formulación de polvo seco que comprende FDKP. En el tratamiento 3, todos los pacientes recibieron dos dosis de 1,5 mg de GLP-1 en una formulación de polvo seco que comprende FDKP, una dosis inmediatamente antes de la comida y una dosis 30 minutos después de la comida. En el tratamiento 4, los pacientes recibieron 10 µg de exenatida por inyección subcutánea. Se tomaron muestras de sangre de cada paciente en diversos momentos antes y después de la dosificación y se analizaron varios parámetros, incluyendo concentración de GLP-1, respuesta de insulina, concentración de glucosa y vaciado gástrico. Se reproducen los resultados de este estudio en las FIG. 18- 20.

La FIG. 18 reproduce los niveles medios de GLP-1 en sangre por el grupo de tratamiento como se describe anteriormente. Los datos demuestran que los pacientes que recibieron la formulación de polvo seco que comprendía 1,5 mg de GLP-1 en FDKP tenían niveles significativamente mayores de GLP-1 en sangre poco después de la administración, como se muestra en los paneles A, B y C, y que los niveles de GLP-1 se reducían bruscamente después de la administración en individuos alimentados o en ayunas. No había niveles mensurables de GLP-1 en el grupo tratado con exenatida (panel D) ni en los controles (panel E) que reciben la formulación de polvo seco.

La FIG. 19 reproduce los niveles de insulina de los pacientes en el estudio antes o después del tratamiento. Los datos muestran que se producía insulina endógena en todos los pacientes después del tratamiento, incluyendo los pacientes tratados con placebo, en los estudios de exposición a comida (panel B), excepto para los pacientes de control en ayunas (panel C) que recibían el placebo. Sin embargo, la respuesta de insulina era más significativa en pacientes que recibían GLP-1 en una composición de polvo seco que comprendía FDKP, en que se observó respuesta de insulina inmediatamente después del tratamiento en ambos grupos alimentado y en ayunas (paneles D-F). Los resultados mostraban también que se reducían los niveles de glucosa en pacientes tratados con la formulación de polvo seco de GLP-1. La administración de la formulación de polvo seco de GLP-1 daba como resultado una elevación retardada de la glucosa sanguínea y una exposición global (AUC) reducida a la glucosa. Tanto la elevación retardada como la exposición reducida eran más pronunciadas en sujetos que recibieron una segunda administración de polvo de inhalación de GLP-1 (datos no mostrados). La magnitud de la liberación de insulina variaba entre pacientes, mostrando algunos niveles pequeños pero fisiológicamente relevantes de insulina mientras que otros exhibían liberaciones de insulina mucho mayores. A pesar de la diferencia en la respuesta de insulina entre los pacientes, la respuesta de glucosa era similar. Esta diferencia en la respuesta de insulina puede reflejar variaciones en el grado de resistencia a insulina y progresión de la enfermedad. La valoración de esta respuesta puede usarse como indicador de diagnóstico de la progresión de la enfermedad, indicando las liberaciones mayores (que carecen de mayor eficacia en el control de los niveles sanguíneos de glucosa) mayor resistencia a insulina y progresión de la enfermedad.

La FIG. 20 reproduce el vaciado gástrico porcentual por grupos de tratamiento. Los pacientes del panel A (pacientes en el tratamiento 3) y el panel B (pacientes en el tratamiento 2) tenían características o porcentajes similares de vaciado gástrico a los pacientes de control mostrados en el panel D (pacientes tratados con placebo con una formulación de polvo seco que comprende FDKP sin GLP-1). Los datos muestran también que los pacientes tratados con exenatida incluso a una dosis de 10 µg exhibían un retardo o inhibición significativos del vaciado gástrico en comparación con los controles. Los datos demuestran también que el presente sistema para suministrar agentes activos que comprende FDKP y GLP-1 carece de inhibición del vaciado gástrico, induce una liberación rápida de insulina después del suministro de GLP-1 y causa una reducción de los niveles de AUC de glucosa.

## REIVINDICACIONES

1. Una formulación de polvo seco inhalable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) para uso en la administración pulmonar en el tratamiento de hiperglucemia y/o diabetes en un paciente por administración prandial de dicha formulación, en la que la formulación previene o reduce efectos adversos seleccionados del grupo consistente en náuseas, vómitos y sudoración profusa.
2. La formulación para uso según la reivindicación 1, en la que el paciente es un mamífero que padece diabetes sacarina de tipo 2.
3. La formulación para uso según la reivindicación 1, en la que la formulación de GLP-1 comprende de 0,01 a 3 mg de GLP-1 en la formulación.
4. La formulación para uso según la reivindicación 1, en la que la formulación de polvo seco inhalable comprende un inhibidor de DPP-IV.
5. La formulación para uso según la reivindicación 1, en la que la formulación de polvo seco inhalable comprende una dicetopiperazina que tiene la fórmula 2,5-diceto-3,6-di(4-X-aminobutil)piperazina y en la que X se selecciona del grupo consistente en glutarilo, maleilo y fumarilo, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
6. La formulación para uso según la reivindicación 1, en la que la molécula de GLP-1 se selecciona del grupo consistente en un GLP-1 nativo, un metabolito de GLP-1, un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1, un mimético de GLP-1, una exendina, un análogo peptídico de GLP-1 o un análogo biosintético de GLP-1, o combinaciones de los mismos.
7. La formulación para uso según la reivindicación 1, en la que la formulación de polvo seco inhalable que comprende la molécula de GLP-1 comprende adicionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de insulina.
8. La formulación para uso según la reivindicación 1, en la que la molécula de insulina se va a administrar separadamente, en forma de una formulación en polvo seco inhalable, de la formulación de la reivindicación 1.
9. La formulación para uso según la reivindicación 1, en la que la formulación de polvo seco inhalable carece de inhibición del vaciado gástrico.
10. La formulación para uso según la reivindicación 7 u 8, en que la insulina es una insulina de acción rápida o de acción prolongada.
11. Una formulación de polvo seco inhalable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) para uso en la administración pulmonar en el tratamiento de hiperglucemia y/o diabetes en un paciente por administración prandial de dicha formulación, en la que la formulación se proporciona en un kit,  
en la que el kit comprende:
- a) un cartucho de medicamento configurado operativamente para ajustarse a un inhalador de polvo seco y que contiene la formulación de polvo seco inhalable y
- b) un dispositivo de inhalación configurado operativamente para aceptar/mantener y fijar con seguridad dicho cartucho;
- y en la que la formulación previene o reduce efectos adversos seleccionados del grupo consistente en náuseas, vómitos y sudoración profusa.
12. Uso de una formulación de polvo seco inhalable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) en la fabricación de un kit para el tratamiento de diabetes y/o hiperglucemia en un paciente por administración prandial,  
en el que el kit comprende:
- a) un cartucho de medicamento configurado operativamente para ajustarse a un inhalador de polvo seco y que contiene la formulación de polvo seco inhalable y
- b) un dispositivo de inhalación configurado operativamente para aceptar/mantener y fijar con seguridad dicho cartucho;
- en el que la formulación es para administración pulmonar y en el que la formulación previene o reduce efectos adversos seleccionados del grupo consistente en náuseas, vómitos y sudoración profusa.

13. Una formulación inhalable de polvo seco para uso en la reducción de los niveles de glucosa en un paciente diabético de tipo 2 que padece hiperglucemia, en la que la formulación es para administración pulmonar y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de GLP-1 y una dicetopiperazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 5 14. La formulación para uso según la reivindicación 13, en la que la formulación es para administración junto con un análogo de GLP-1 de acción prolongada.
15. La formulación para uso según la reivindicación 13, en la que los niveles de glucosa se reducen en 0,1 mmol/l a 3 mmol/l durante un periodo de aproximadamente 4 horas después de la administración de dicha formulación inhalable a dicho paciente.
- 10 16. La formulación para uso según la reivindicación 13, en la que la formulación inhalable es para administrar a dicho paciente diabético de tipo 2 de forma prandial, preprandial, postprandial o en estado de ayuno.
17. La formulación para uso según la reivindicación 13, en la que la formulación de GLP-1 comprende de 0,02 a 2 mg de GLP-1 en la formulación.

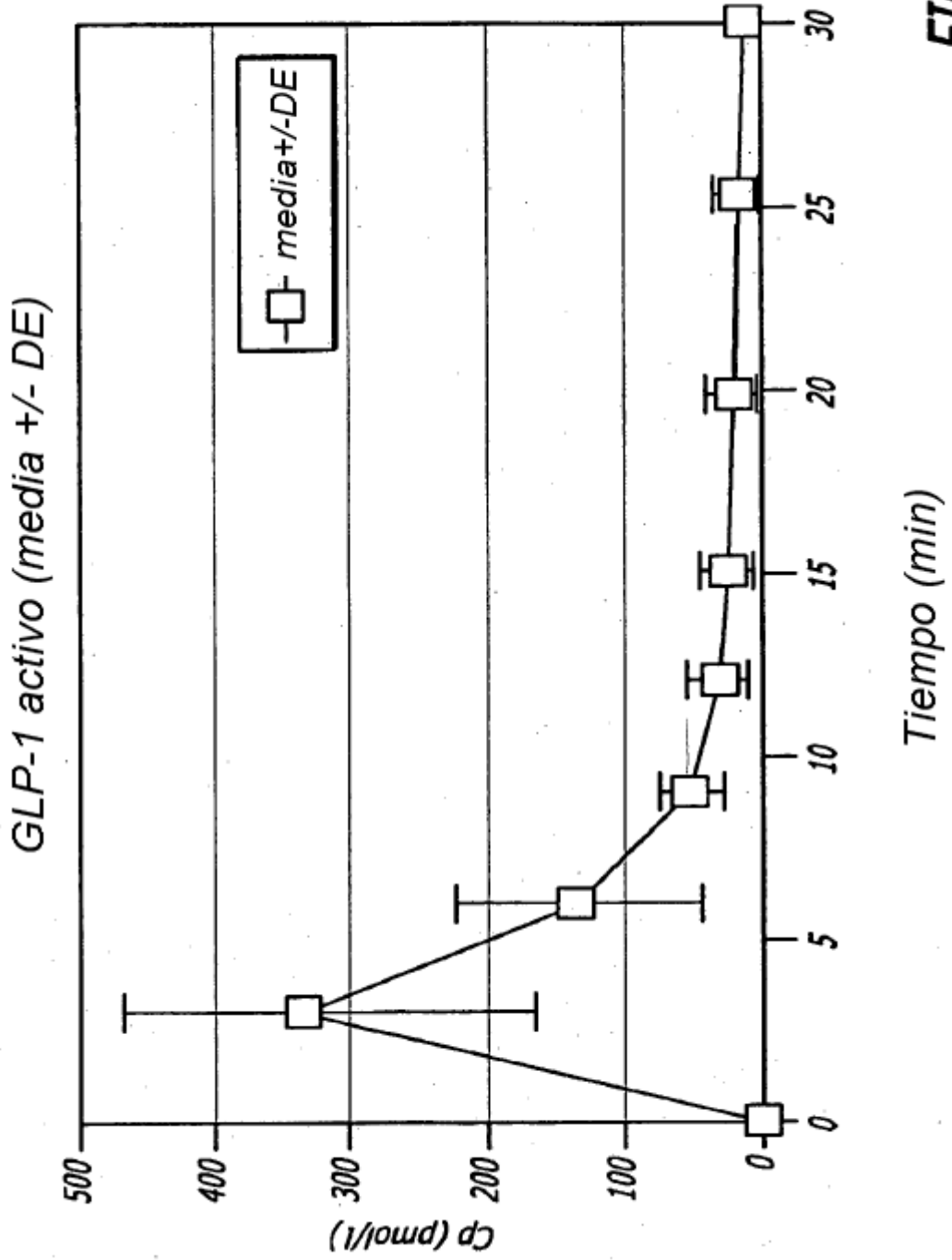


FIG. 1

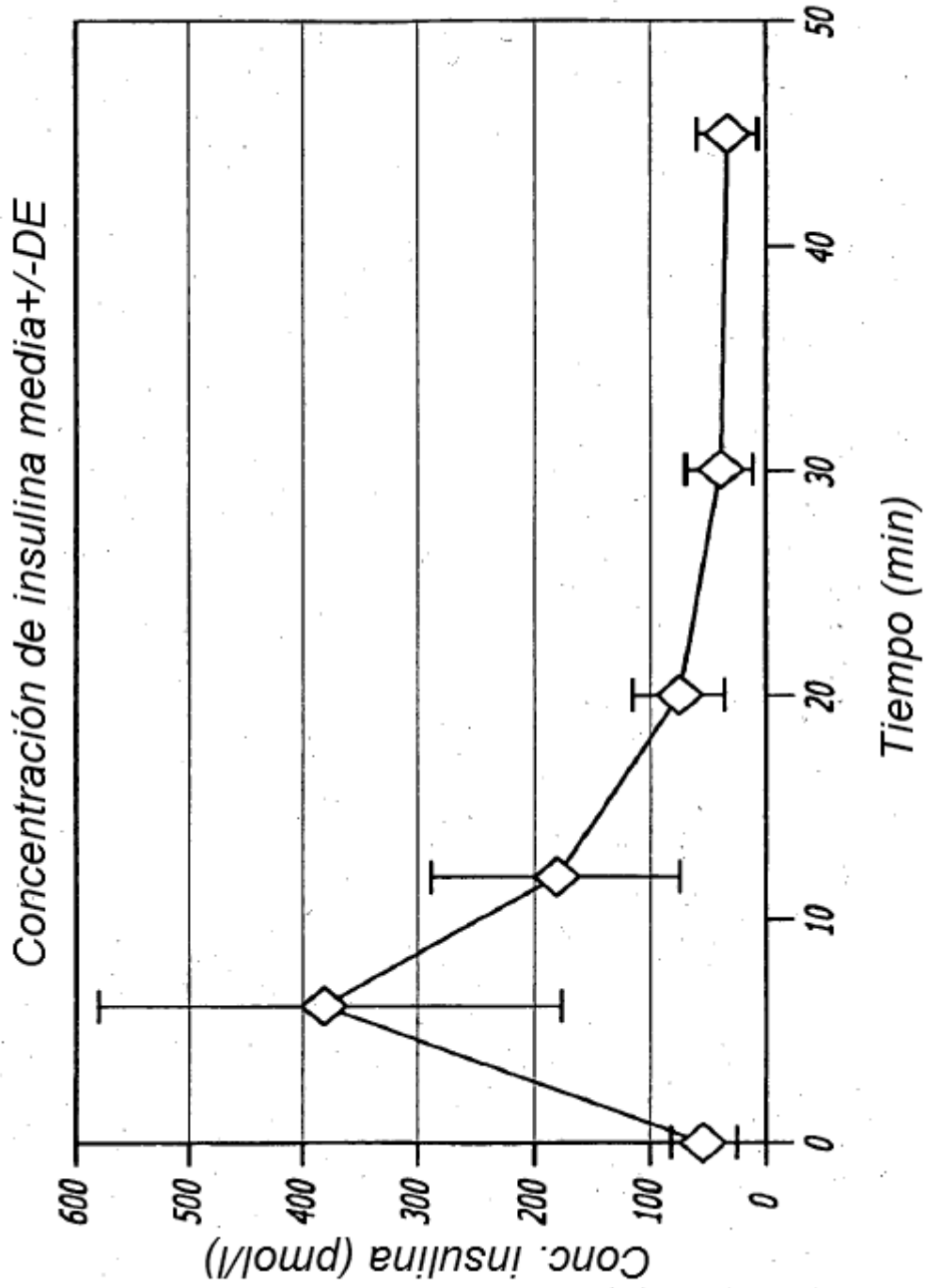
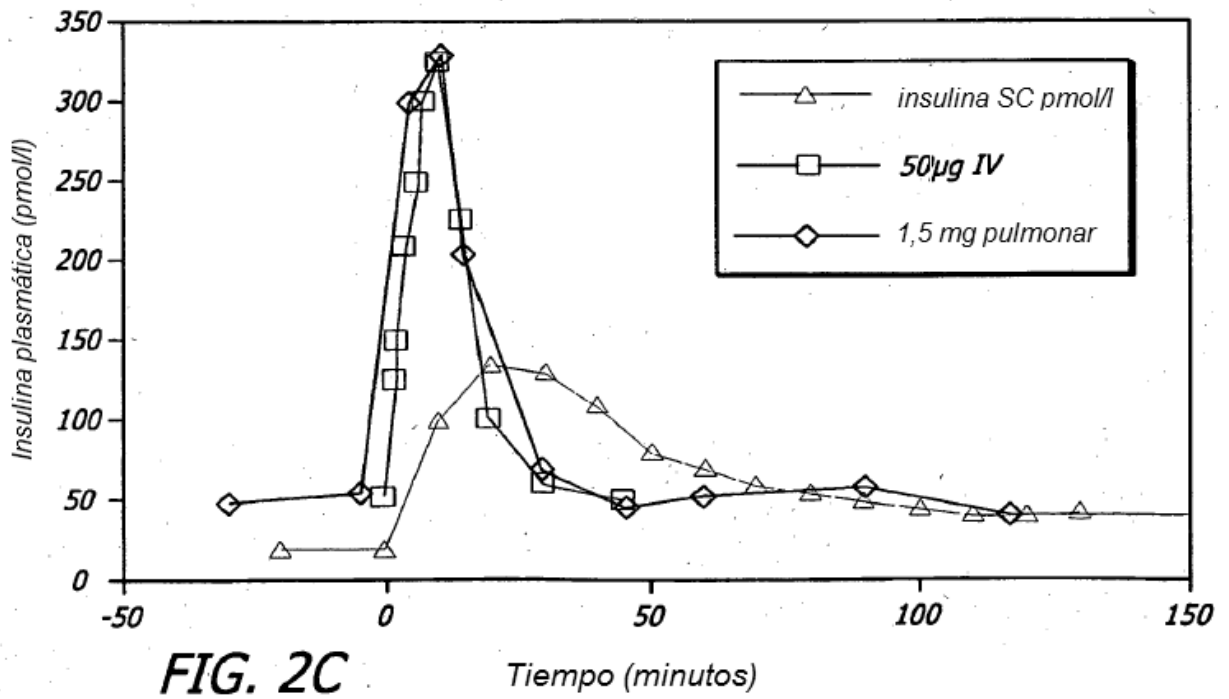
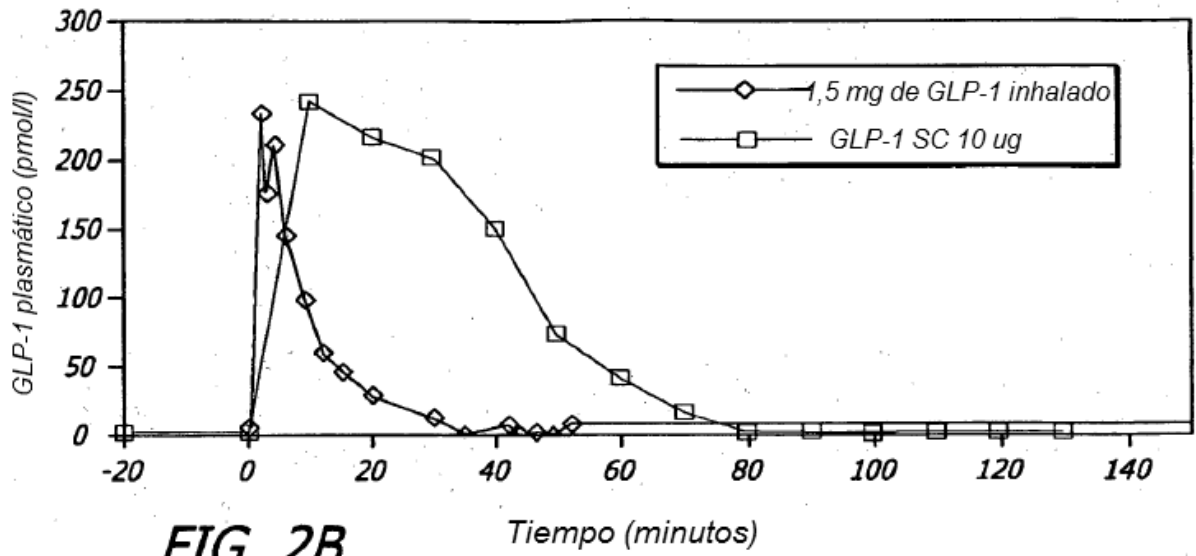


FIG. 2A





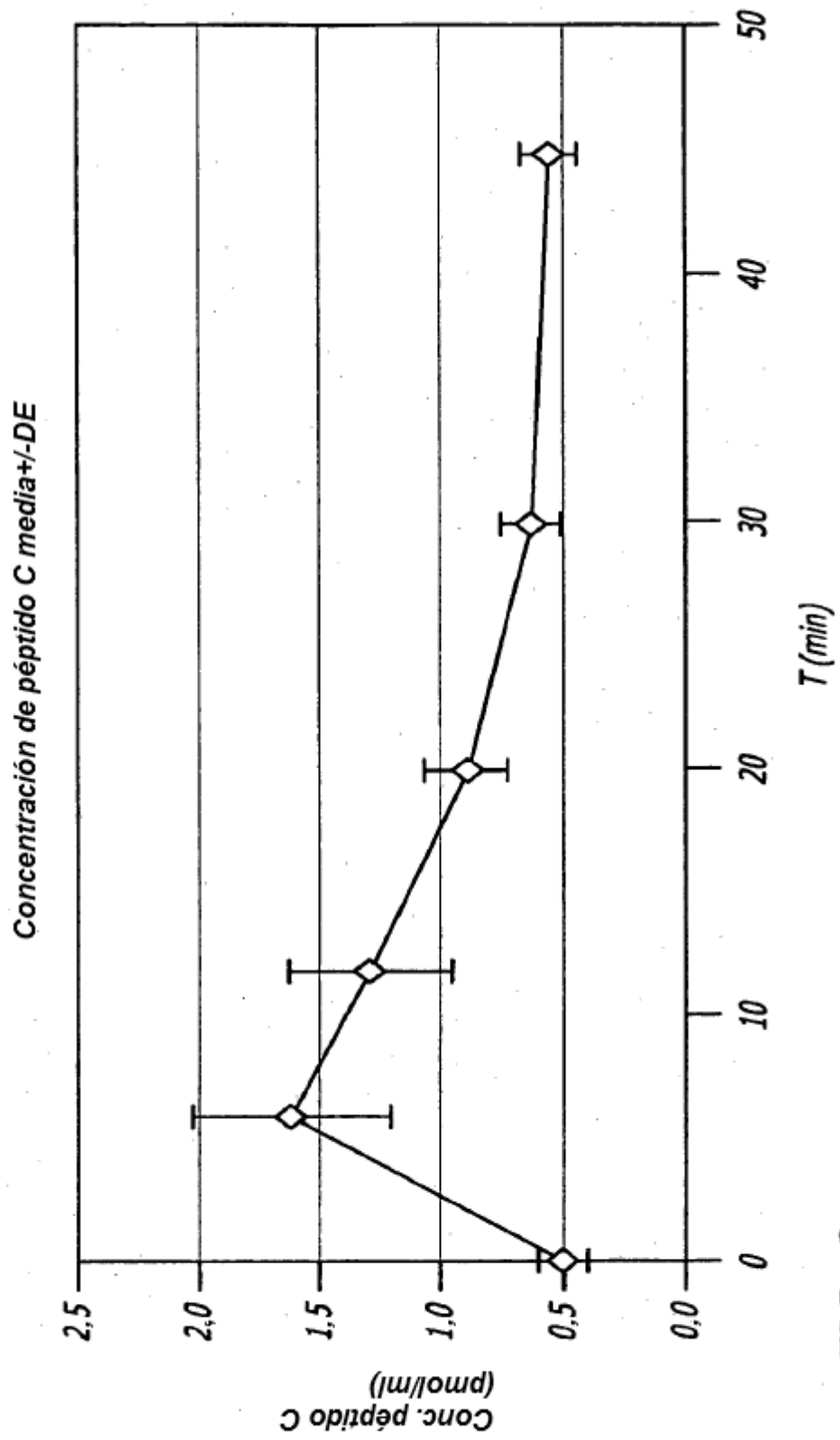
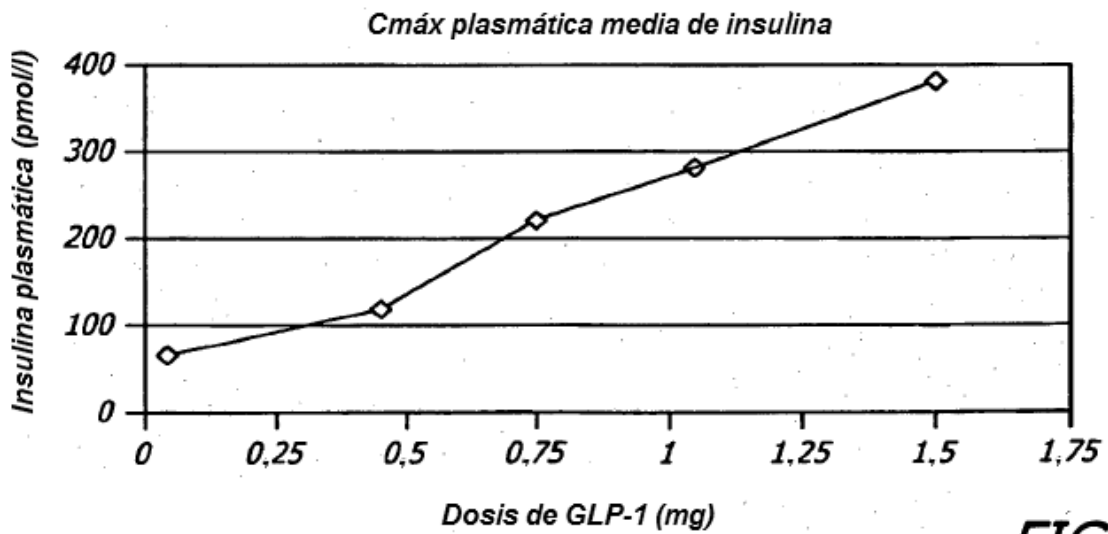
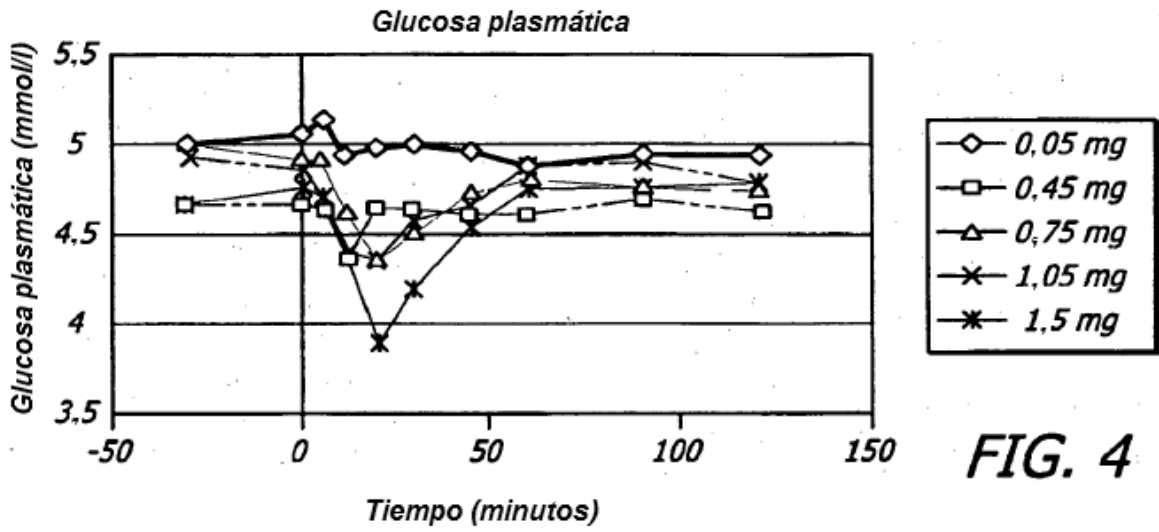
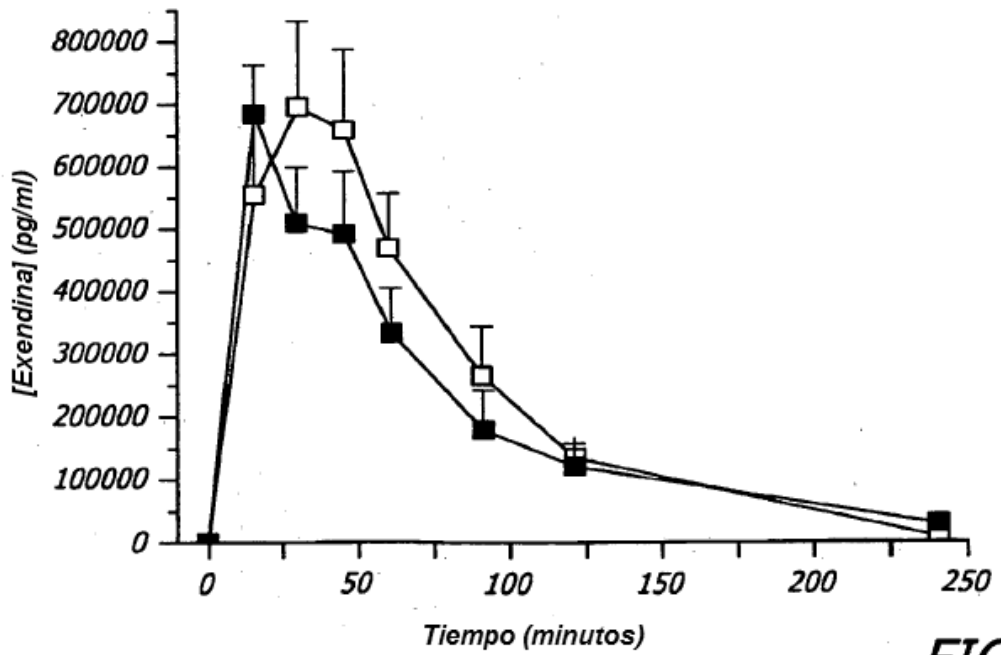
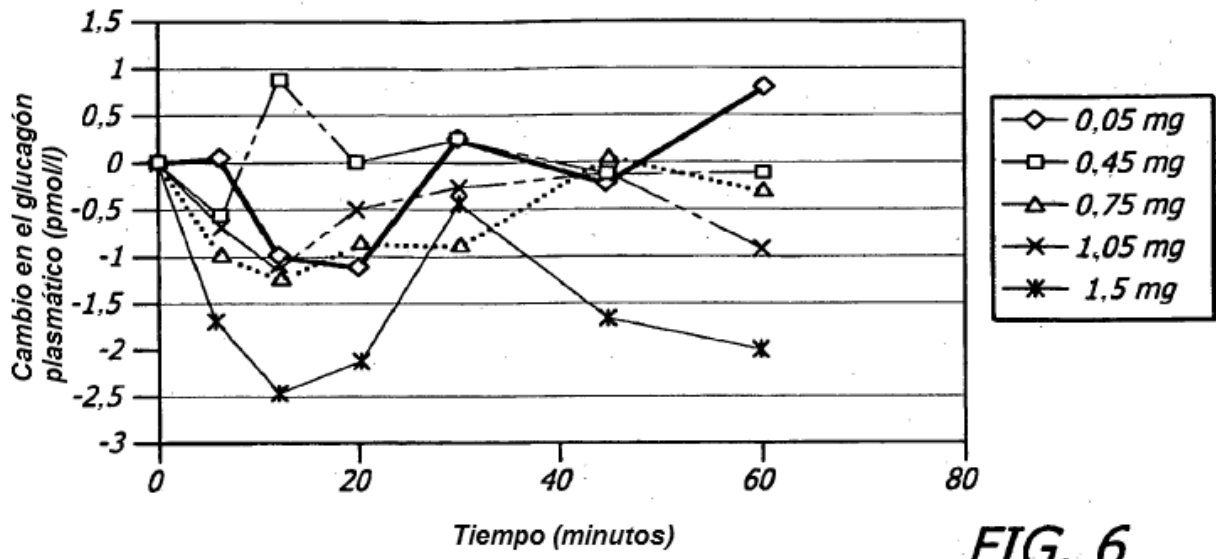


FIG. 3





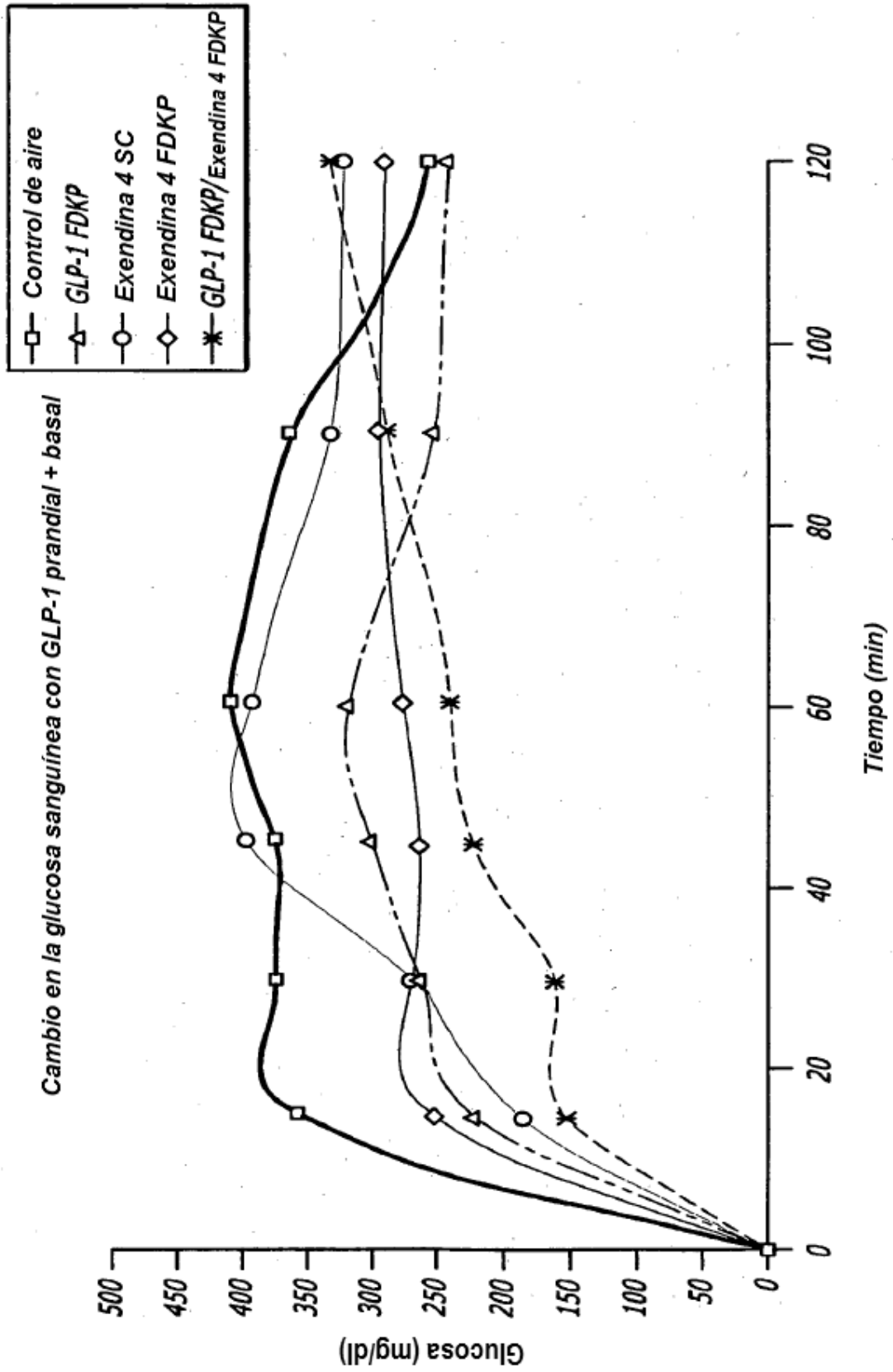


FIG. 8

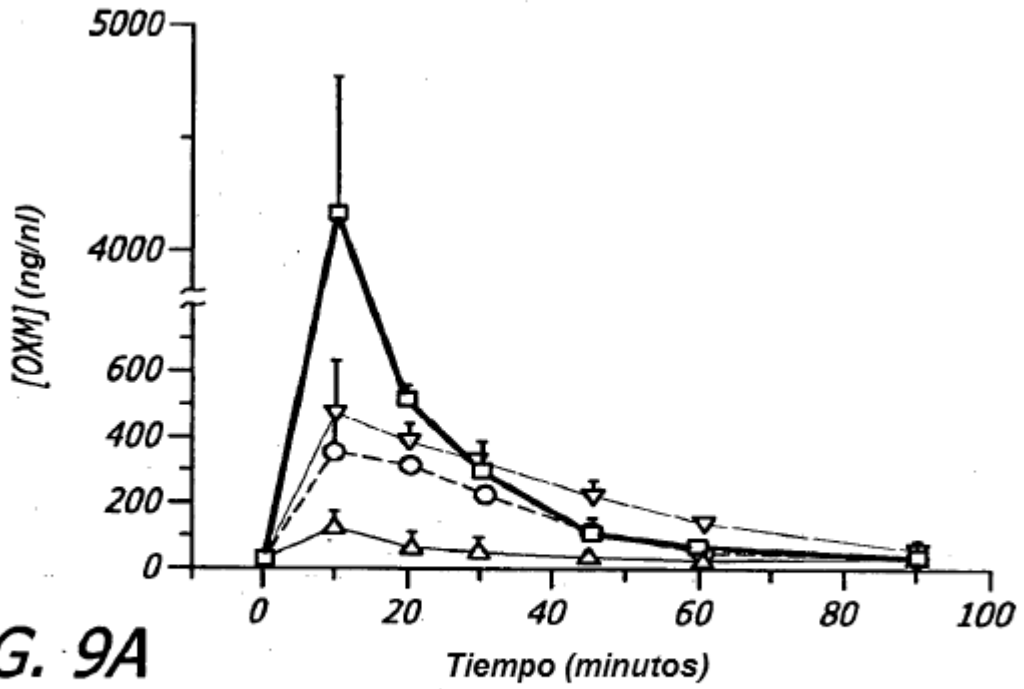


FIG. 9A

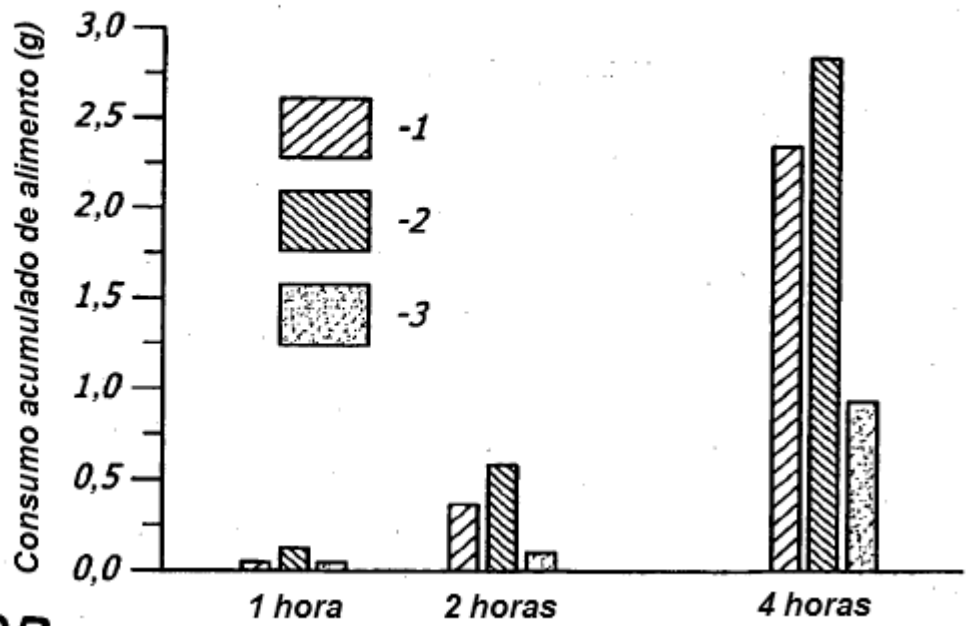


FIG. 9B

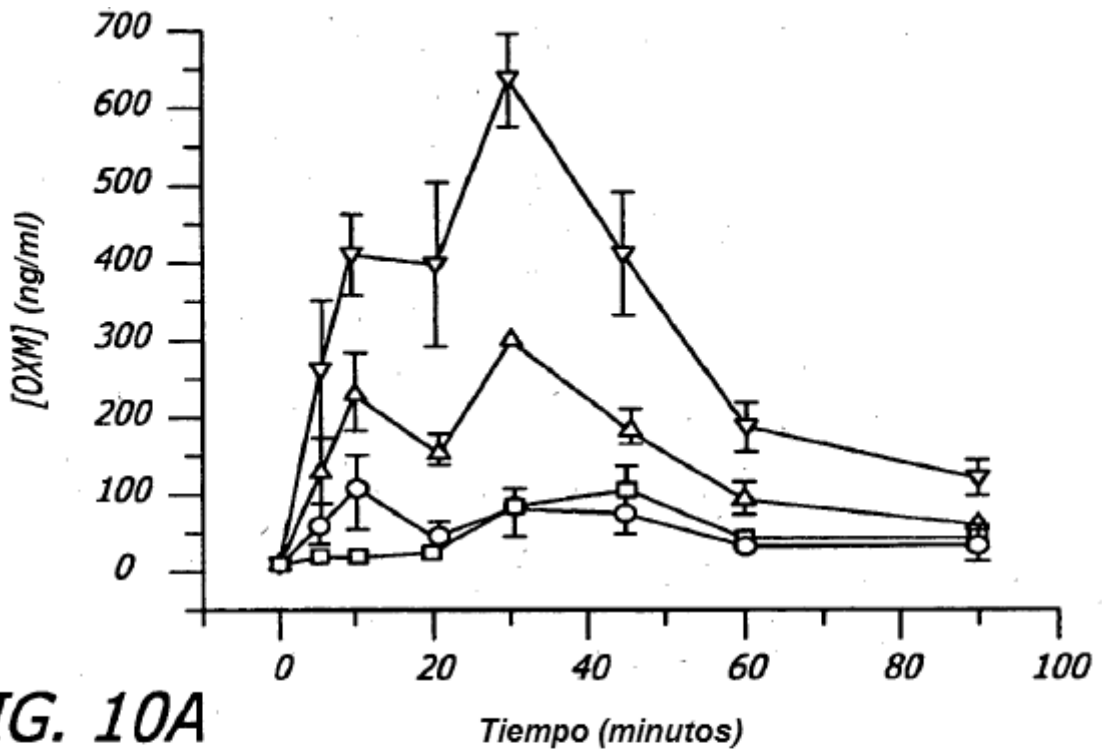


FIG. 10A

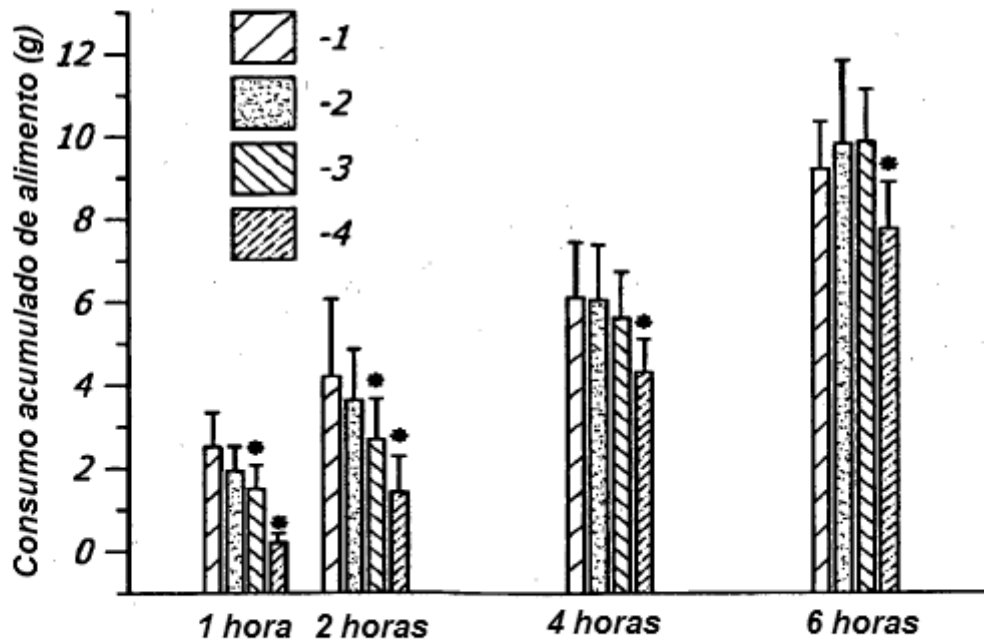


FIG. 10B

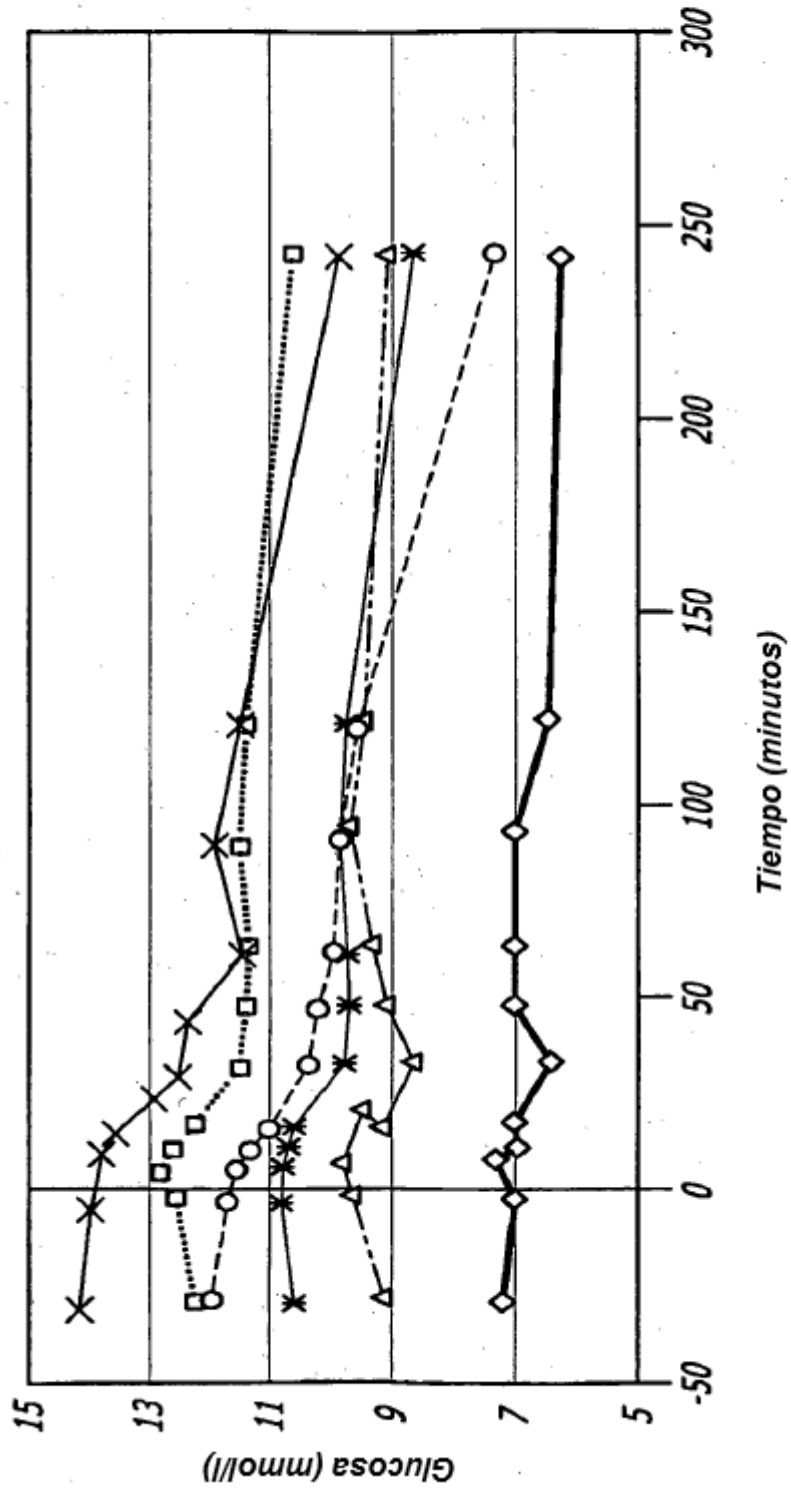
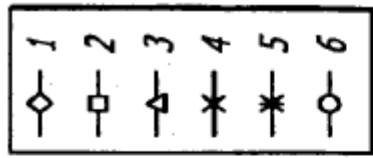


FIG. 11

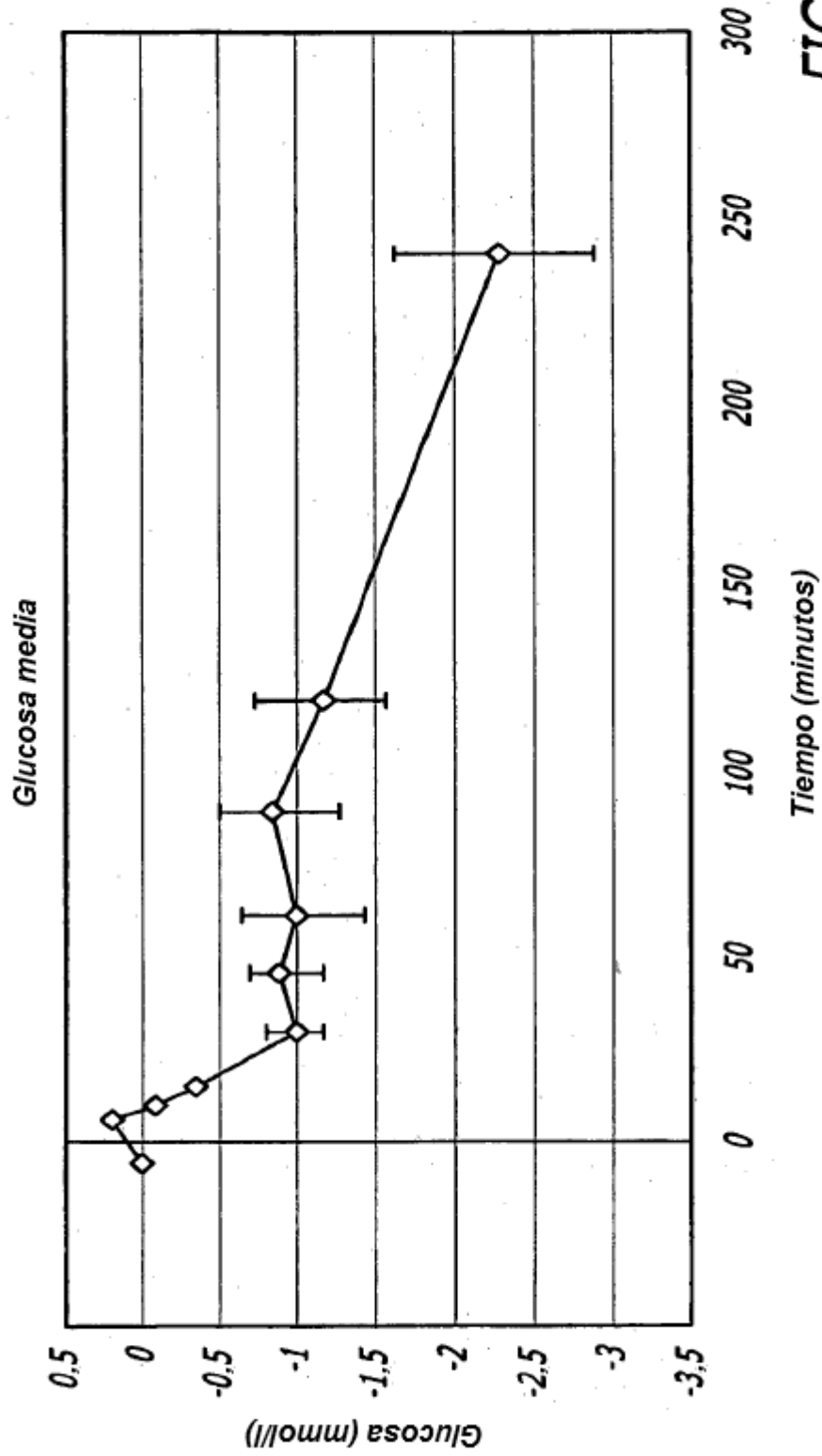
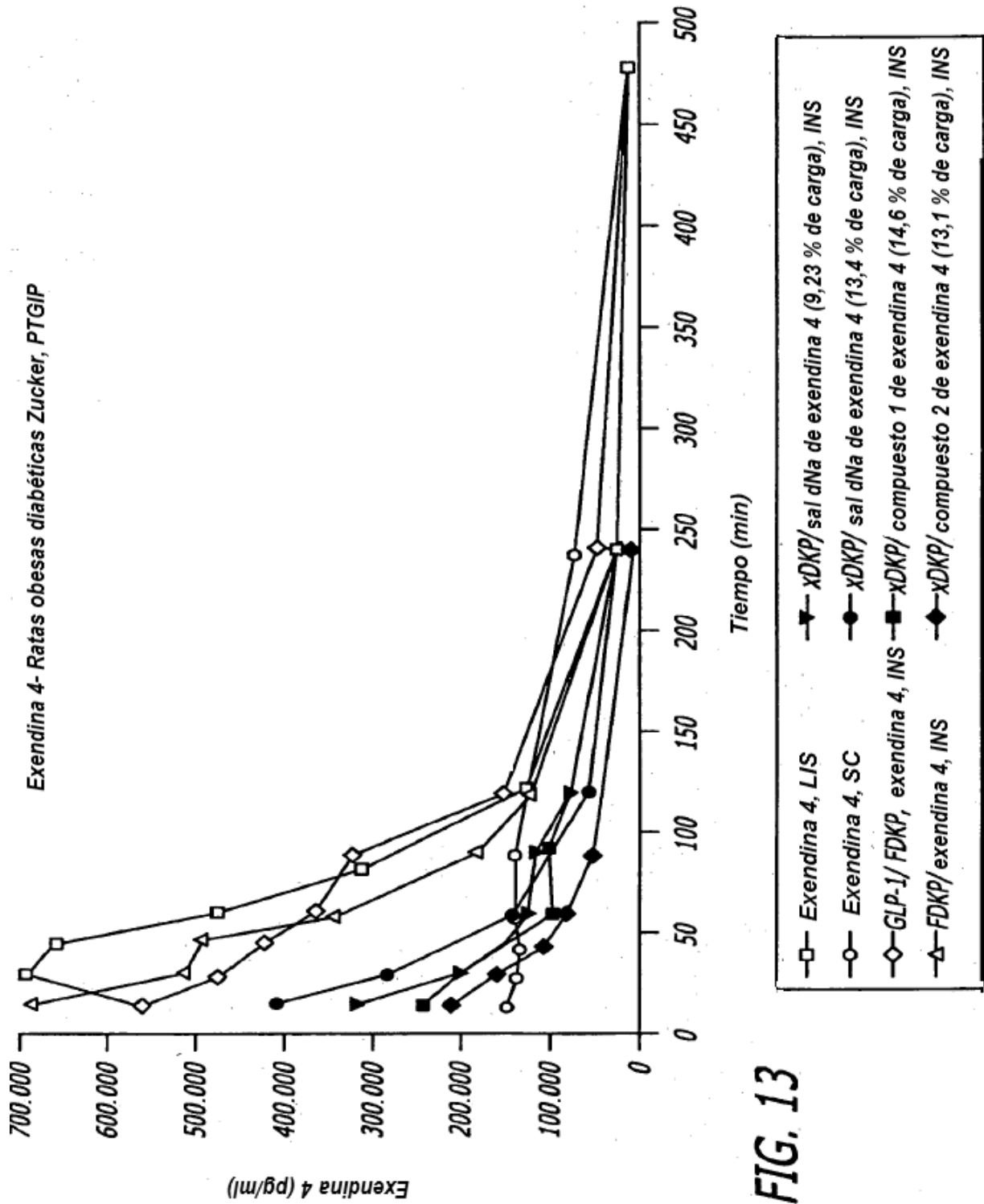


FIG. 12





**FIG. 13**

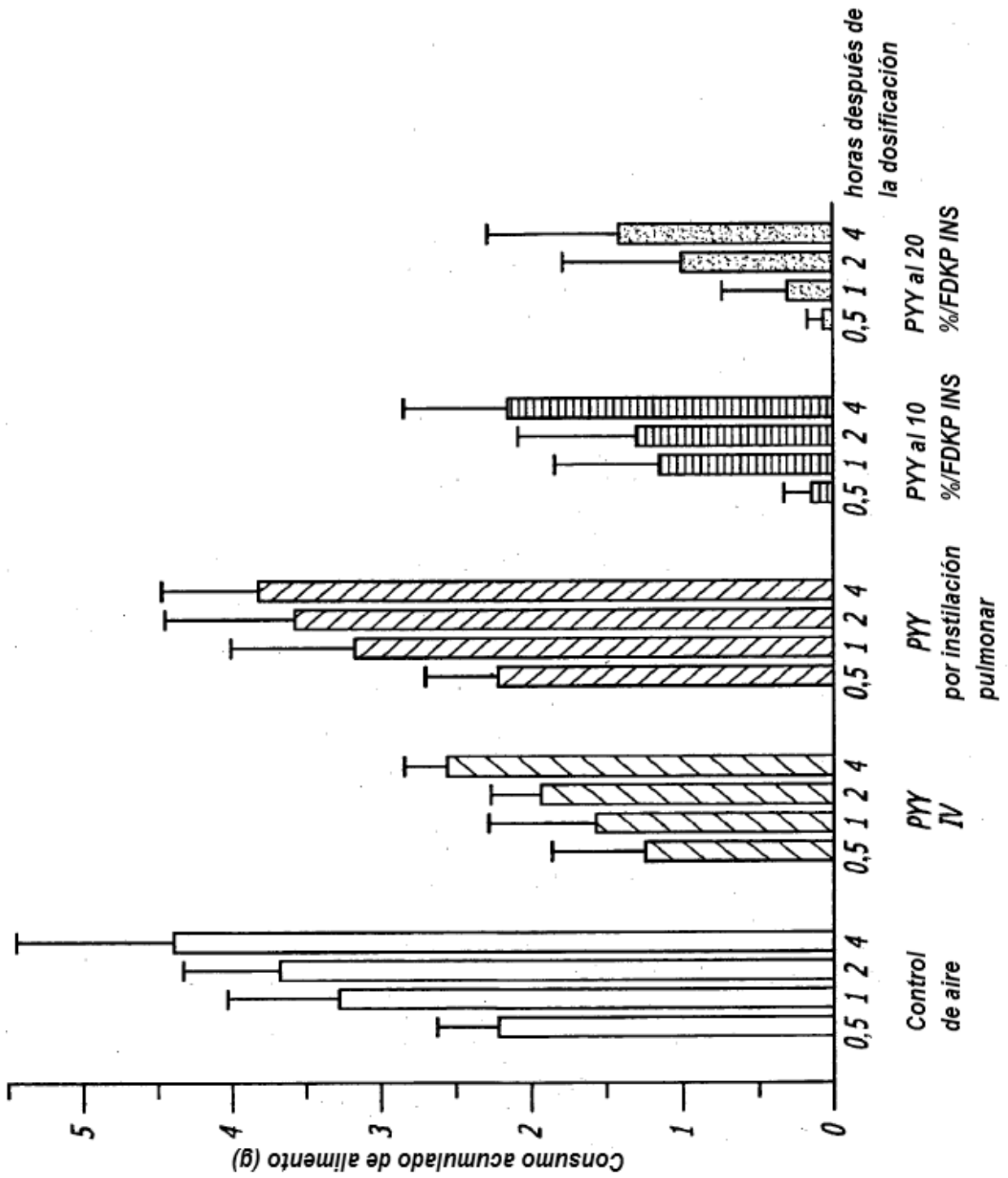


FIG. 14

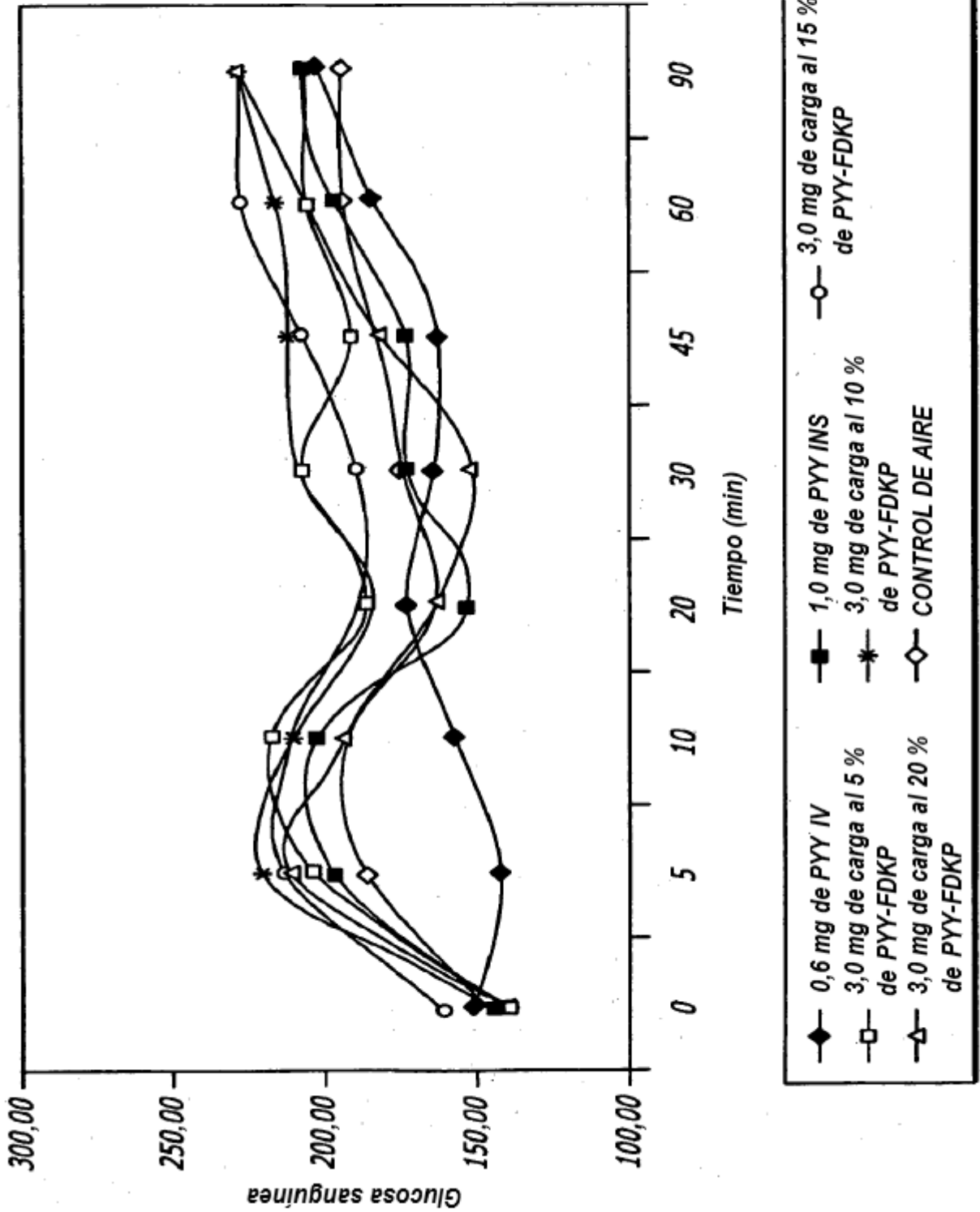


FIG. 15

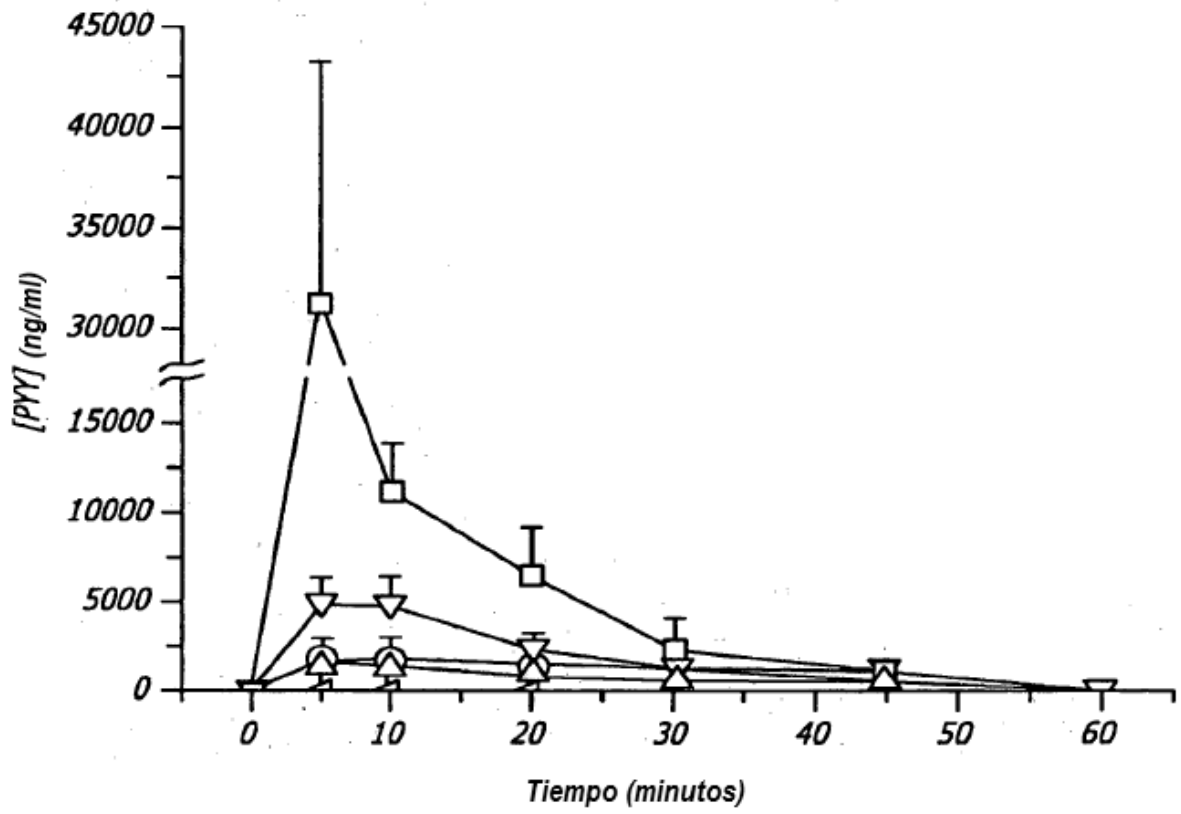
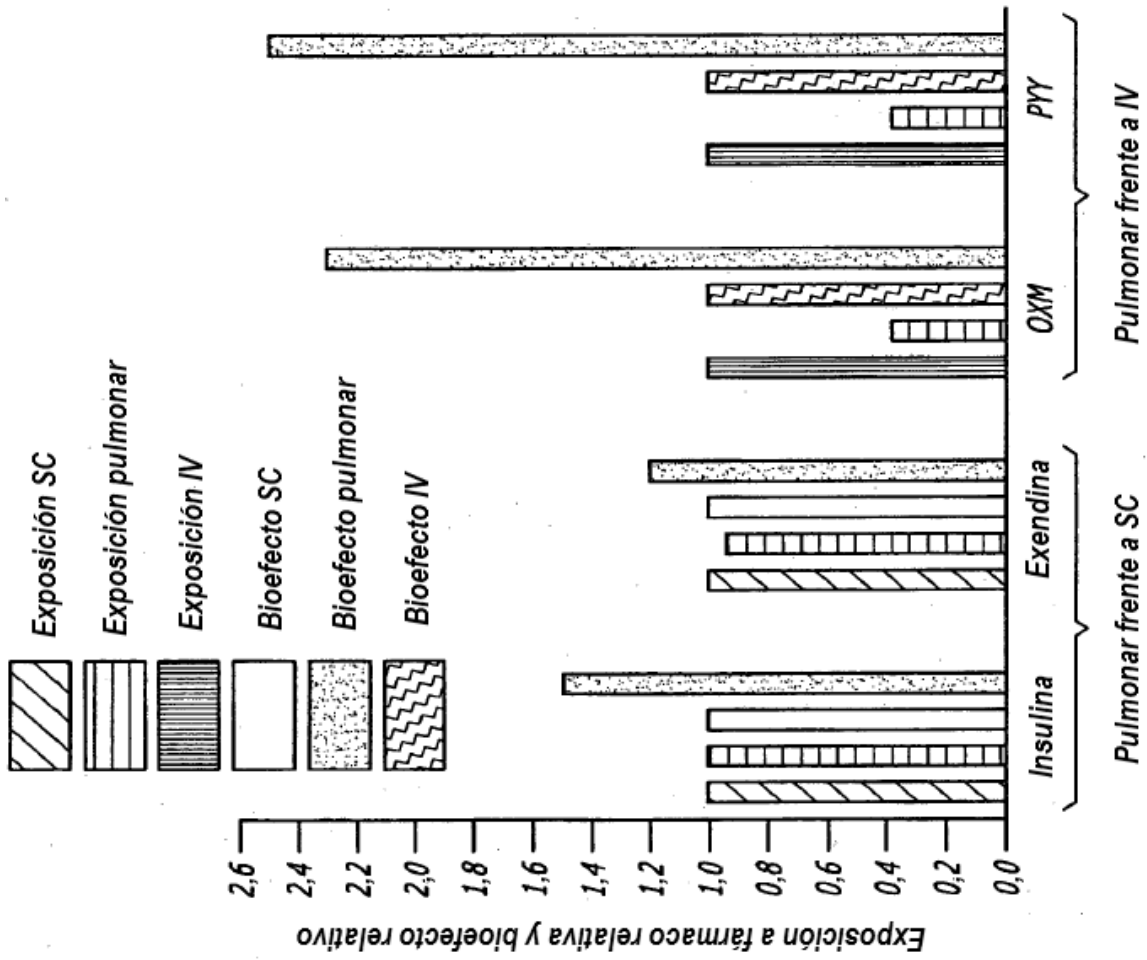
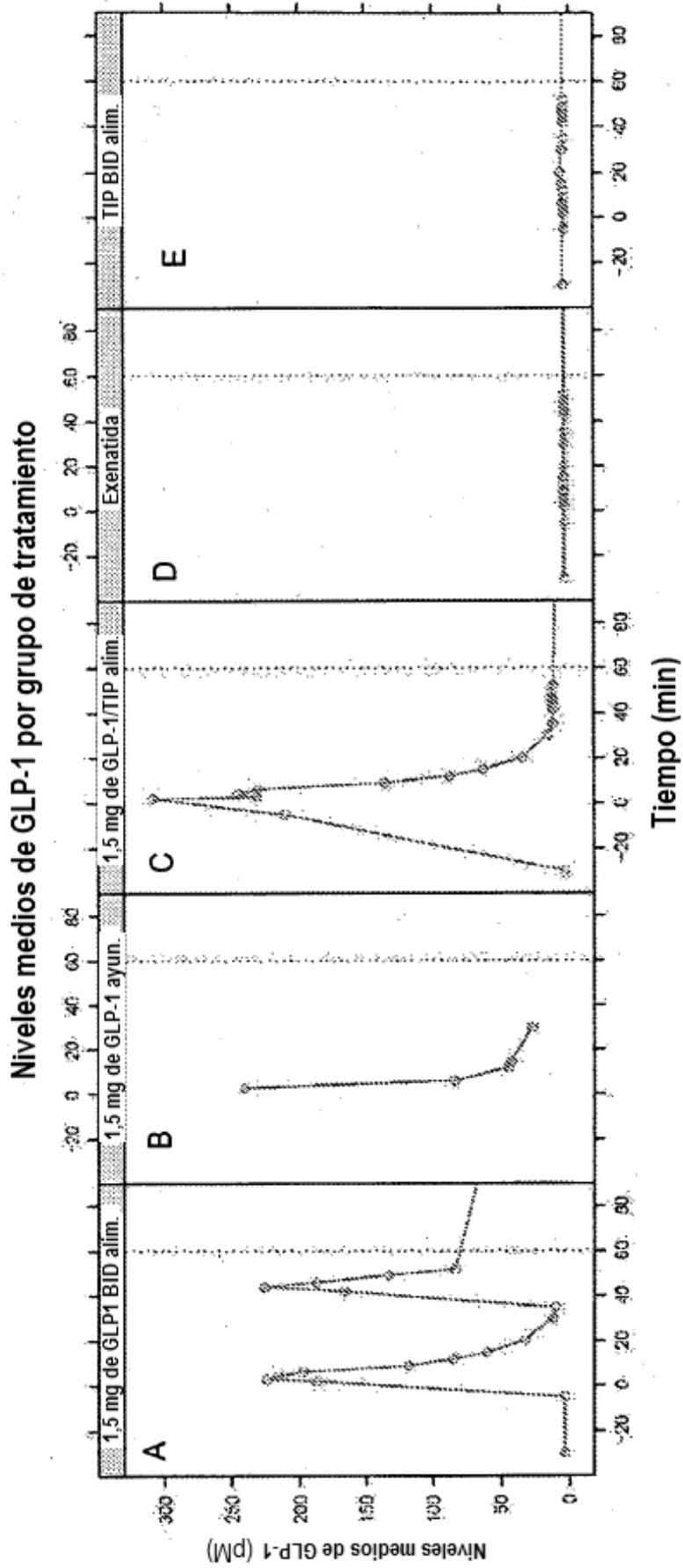


FIG. 16

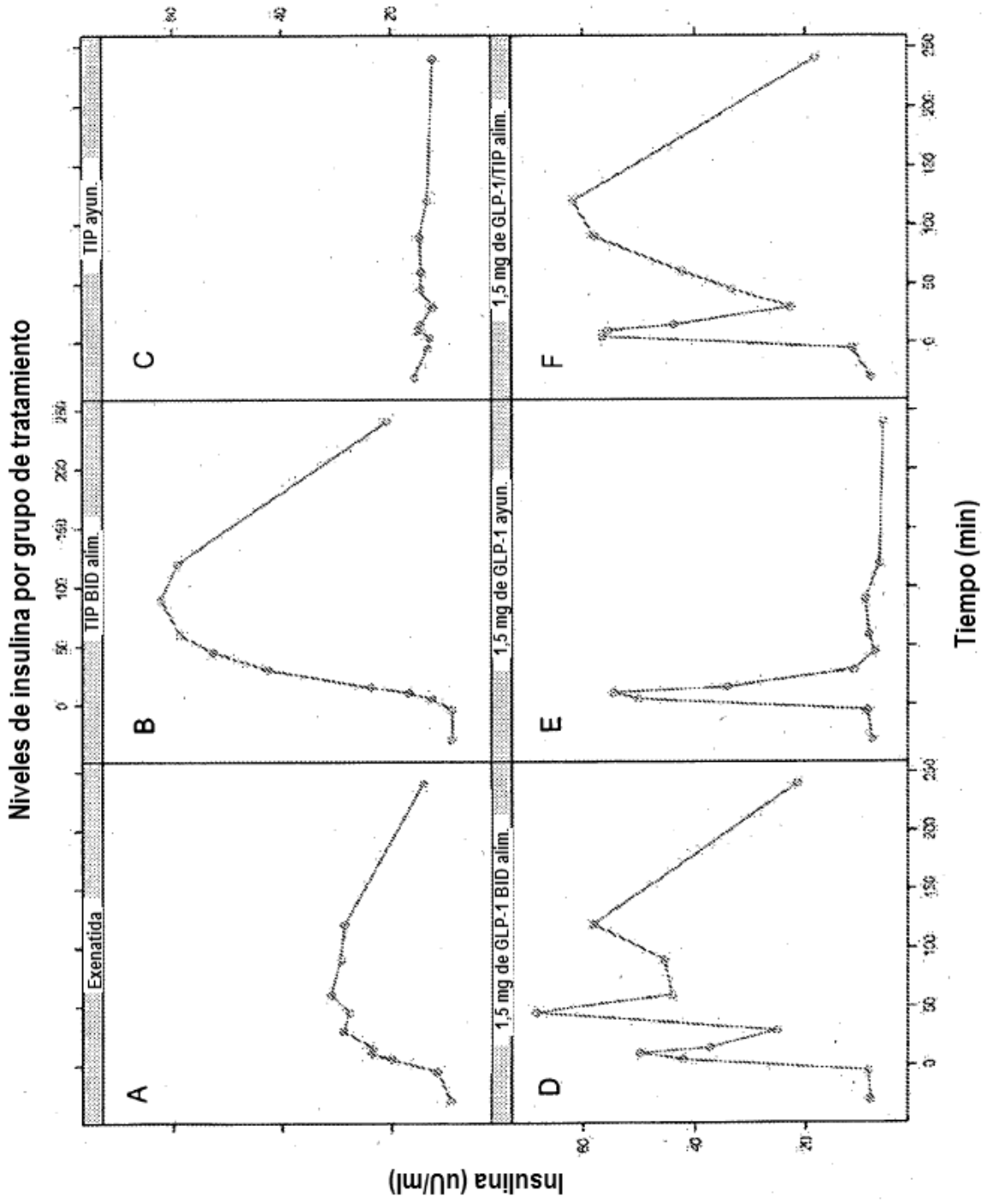
FIG. 17



**FIG. 18**



**FIG. 19**



**FIG. 20**

