

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 038**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/26** (2006.01)

**A61K 38/28** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2008 E 08749902 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2152245**

54 Título: **Método para secar una composición proteica, una composición proteica seca y una composición farmacéutica que comprende la proteína seca**

30 Prioridad:

**30.04.2007 EP 07107221**

**03.10.2007 EP 07117798**

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

**10.03.2016**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)**

**Novo Allé**

**2880 Bagsværd, DK**

72 Inventor/es:

**HAVELUND, SVEND y**

**JENSEN, SIMON BJERREGAARD**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 563 038 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

Método para secar una composición proteica, una composición proteica seca y una composición farmacéutica que comprende la proteína seca

### CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a un método para secar soluciones proteicas y al producto proteico seco. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen tal proteína seca, a métodos para tratar la diabetes y la hiperglucemia utilizando la proteína seca de la invención y al uso de tal proteína seca en el tratamiento de la diabetes e hiperglucemia.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 El secado es un proceso de transferencia de masa que da como resultado la eliminación de la humedad acuosa por evaporación a partir de un sólido, semisólido o líquido para finalizar en un estado sólido.

Un posible método de secado es el secado al vacío, donde se suministra el calor por radiación o conducción (o microondas) de contacto a la vez que el vapor producido se elimina mediante el sistema de vacío. Otra técnica es el secado en tambor, donde se utiliza una superficie calentada para proporcionar la energía y los aspiradores extraen el vapor del habitáculo.

15

La liofilización o secado por congelación es un método de secado utilizado comúnmente en la industria bioquímica. El disolvente se congela antes del secado y a continuación se sublima, es decir, se hace pasar a la fase gaseosa directamente de la fase sólida, por debajo del punto de fusión del disolvente. La liofilización se lleva a cabo a menudo al alto vacío para permitir que el secado ocurra con una velocidad razonable. Durante la congelación puede tener lugar la desnaturalización de la proteína y péptidos, lo que da lugar a un producto liofilizado con una calidad deficiente. El secado por aspersión tiene una amplia gama de aplicaciones en la industria química, la industria alimentaria y las industrias bioquímica y farmacéutica. El secado por aspersión se ha utilizado en la industria farmacéutica desde el inicio de la década de 1940. Es un método útil para el procesamiento de los agentes farmacéuticos debido a que ofrece un medio para obtener polvos con propiedades predeterminadas, tales como la forma y distribución del tamaño de partículas. Además, se pueden realizar varios procesos de formulación en un paso en un secador por aspersión: estos incluyen la encapsulación, formación del complejo e incluso polimerizaciones. El secado por aspersión es también un método conveniente para secar agentes farmacéuticos sensibles al calor, tales como fármacos proteicos con una pérdida de actividad mínima.

20

25

La solicitud de patente internacional WO 00/00176 divulga una formulación de micropartículas que se puede obtener mediante el secado por aspersión de una solución sustancialmente pura de un agente terapéutico sin la producción concomitante de una concentración elevada no deseada de sal u otros excipientes. Se dice que la sal no es deseable debido a que no tiene un efecto estabilizante, de hecho la estabilidad podrá ser superior con cantidades reducidas de sal. Las micropartículas de insulina se pueden obtener disolviendo Zn-insulina en ácido (HCl), añadiendo álcali (NaOH) para proporcionar una solución de insulina, p. ej., a un pH superior a 7 y secando por aspersión la solución de insulina. El ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio añadidos generan un contenido salino en la formulación de micropartículas secadas por aspersión. Además, la formulación obtenida tendrá, tras la adición de agua, el mismo pH que la solución proteica introducida en el secador por aspersión.

30

35

La publicación de patente internacional WO 95/24183 se refiere a métodos y composiciones para el suministro

pulmonar de insulina. Los polvos de insulina se producen mezclando insulina cristalina a granel en excipientes que contienen tampón de citrato de sodio (manitol y/o rafinosa) para proporcionar una concentración final de sólidos de 7.5 mg/mL y un pH de  $6.7 \pm 0.3$  y a continuación secando por aspersión la solución de insulina. La publicación de patente internacional WO 05/092301 se refiere al secado por aspersión de una solución de insulina transparente a un pH por debajo del punto isoelectrico de la insulina, preferentemente inferior a 5.4.

El documento WO 2006/023943 divulga un proceso para el secado por aspersión de la insulina proporcionando una solución de insulina y ajustando el pH con una base no volátil para formar una solución proteica con un pH objetivo de 8.3 antes del secado por aspersión.

El GLP-1 humano es un péptido con 37 residuos aminoacídicos que se origina a partir del preproglucagón el cual se sintetiza, entre otros, en las células L del íleon distal, en el páncreas y en el cerebro. El GLP-1 es una hormona del intestino importante con una función reguladora sobre el metabolismo de la glucosa y el metabolismo y secreción gastrointestinales. El GLP-1 estimula la secreción de insulina en una manera dependiente de la glucosa, estimula la biosíntesis de insulina, promueve la preservación de células beta, disminuye la secreción de glucagón, vaciado gástrico y toma de alimentos. El GLP-1 humano se hidroliza en GLP-1(7-37) y GLP-1(7-36)-amida, que son ambos péptidos insulínotropicos.

La hormona terapéutica insulina es una proteína con un peso molecular bajo que tiene influencia sobre el nivel de glucosa sanguínea. Millones de personas la utilizan a diario para el tratamiento médico de la diabetes. La diabetes es una enfermedad crónica provocada por la deficiencia absoluta o relativa de insulina y la resistencia a la insulina, que da como resultado niveles de glucosa sanguínea elevados (hiperglucemia) lo que acarrea complicaciones a largo plazo.

En la actualidad, el tratamiento de la diabetes, tanto la diabetes de tipo 1 como la diabetes de tipo 2, se basa en gran medida en el denominado tratamiento con insulina intensivo. De acuerdo con este régimen, se trata a los pacientes con múltiples inyecciones diarias de insulina que comprenden una o dos inyecciones diarias de insulina de acción prolongada para satisfacer los requisitos basales de insulina suplementadas con inyecciones intravenosas rápidas de la insulina de acción inmediata para satisfacer los requisitos de insulina relacionados con las comidas.

La molécula de insulina está constituida por dos cadenas, A y B, con 21 y 30 residuos respectivamente. La cadena A está formada por dos fragmentos helicoidales separados por una parte elongada corta unida a una de las hélices mediante un enlace disulfuro intracatenario. Dos enlaces disulfuro adicionales unen la cadena A con la cadena B más larga. En la forma biológicamente activa la insulina existe como un monómero en el cual la cadena B contiene una región helicoidal central flanqueada por dos partes elongadas. En presencia de iones divalentes como el zinc, los monómeros se ensamblan en hexámeros, donde cada uno de los dos iones de zinc centrales está coordinado mediante tres residuos de histidina. La insulina es susceptible de fibrilación, un proceso de plegamiento erróneo que conduce a un ensamblaje bien ordenado de tipo beta-cruzado. Se proporciona protección de la fibrilación en células  $\beta$  captando el monómero susceptible con hexámeros de zinc. Cuando la fibrilación tiene lugar durante el secado por aspersión de la insulina, la boquilla se puede obstruir, lo que conlleva interrupciones en el proceso de secado.

Otro factor importante cuando se quiere evitar la obstrucción de las boquillas de secado por aspersión es que la proteína que se va a secar esté adecuadamente disuelta en la solución. La proteína dispersada en la solución de entrada también puede conllevar la obstrucción del equipo.

Además, el pH de la proteína seca es muy importante. A menudo es deseable obtener un producto seco con un pH

específico, p. ej., un pH comparable al pH fisiológico.

### COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención trata sobre un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 para secar una solución proteica, donde

- 5 a) Se obtiene una solución proteica al mezclar una proteína con agua que comprende opcionalmente excipientes y ajustar el pH con una base volátil, una base no volátil y, opcionalmente, un ácido no volátil para hacer que la solución proteica se vuelva alcalina, y
- b) Secar la solución proteica.

### DEFINICIONES

- 10 Una “**solución proteica**” tal y como se menciona en la presente se refiere a una solución de insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1 o glucagón que se han solubilizado sin utilizar ácidos y con valores de pH por encima del punto isoeléctrico de la proteína.

Con “**base volátil**” se hace referencia a una base que, en cierto grado, se evaporará al calentar y/o a presión reducida, p. ej., bases que tienen una presión de vapor por encima de 65 Pa a temperatura ambiente o una mezcla azeotrópica acuosa que incluye una base que tiene una presión de vapor por encima de 65 Pa a temperatura ambiente.

Una “**base no volátil**” tal como se menciona en la presente se refiere a una base que no se evapora o que se evapora tan solo parcialmente al calentar, p. ej., bases con una presión de vapor por debajo de 65 Pa a temperatura ambiente.

- 20 Un “**ácido no volátil**” tal como se menciona en la presente se refiere a un ácido que no se evapora o que se evapora tan solo parcialmente al calentar, p. ej., ácidos con una presión de vapor por debajo de 65 Pa a temperatura ambiente, tal como el ácido fosfórico.

Un “**ácido fuerte**” tal como se menciona en la presente se refiere a un ácido que tiene un valor de pKa por debajo de -1, tal como ácido clorhídrico y ácido sulfúrico.

- 25 Con “**insulina**”, tal y como se utiliza en la presente, se hace referencia a la insulina humana, insulina porcina o insulina bovina con puentes disulfuro entre CysA7 y CysB7 y entre CysA20 y CysB19 y un puente disulfuro interno entre CysA6 y CysA11 o un análogo de insulina o uno de sus derivados.

Con “**GLP-1**”, tal y como se utiliza en la presente, se hace referencia al péptido similar al glucagón 1. El GLP-1 humano es un péptido con 37 residuos aminoacídicos. El GLP-1 humano se hidroliza en GLP-1(7-37) y GLP-1(7-36)-amida que son ambos péptidos insulínótropicos.

Con “**pH de la solución proteica/solución de insulina/solución de GLP-1/solución de glucagón**” se hace referencia al pH de la solución proteica/de insulina/de GLP-1/de glucagón tras el ajuste con bases volátiles y no volátiles y antes del secado por aspersión de la solución proteica.

- 35 Con “**pH de la proteína/insulina/GLP-1/glucagón secos**” se hace referencia al pH de la proteína/insulina/GLP-1/glucagón secos/secados por aspersión cuando se mezclan al menos 20 mg de proteína seca/secada por

aspersión con 0.5 mL de agua desmineralizada, lo que da lugar a una concentración de al menos 40 mg de proteína/insulina/GLP-1 por mL de agua desmineralizada, y se mide el pH. El pH de la proteína/insulina/GLP-1 secos se puede medir mezclando hasta aproximadamente 300 mg de la proteína/insulina/GLP-1 secos/secados por aspersión con 0.5 mL de agua desmineralizada y midiendo el pH. Por ejemplo, se mide el pH mezclando de  
 5 aproximadamente 20 a aproximadamente 250 mg de proteína/insulina/GLP-1/glucagón secos/secados por aspersión con 0.5 mL de agua desmineralizada, mezclando de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 mg de proteína/insulina/GLP-1/glucagón secos/secados por aspersión con 0.5 mL de agua desmineralizada, mezclando de aproximadamente 20 a aproximadamente 150 mg de proteína/insulina/GLP-1/glucagón secos/secados por aspersión con 0.5 mL de agua desmineralizada o mezclando de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg de  
 10 proteína/insulina/GLP-1/glucagón secos/secados por aspersión con 0.5 mL de agua desmineralizada y midiendo el pH.

Con “**pH objetivo de la proteína seca**” se hace referencia al pH de la proteína/insulina/GLP-1/glucagón secos que se desea obtener para la proteína seca, p. ej., el pH en el que la estabilidad química de la proteína seca es óptima o el pH de la proteína seca que es comparable al pH fisiológico.

15 Con “**pH objetivo de la solución proteica**” se hace referencia al pH que sería deseable que tuviera la solución proteica/solución de insulina/solución de GLP-1/solución de glucagón cuando deba secarse, p. ej., el pH que es óptimo para la proteína disuelta debido a su elevada solubilidad o bajo potencial de agregación.

Con “**análogo**”, tal y como se utiliza en la presente, se hace referencia a un polipéptido que tiene una estructura molecular que se puede derivar formalmente de la estructura de la proteína, eliminando y/o intercambiando al menos  
 20 un residuo aminoacídico que está presente en la proteína de origen natural y/o añadiendo al menos un residuo aminoacídico. Los residuos aminoacídicos añadidos y/o intercambiados pueden ser residuos aminoacídicos codificables u otros residuos de origen natural o residuos aminoacídicos puramente sintéticos. Los análogos de insulina podrán ser aquellos en los que la posición 28 de la cadena B podrá modificarse del residuo de Pro natural a uno de Asp, Lys o Ile. En otro aspecto, la Lys de la posición B29 de la insulina se modifica a Pro o Glu. Asimismo, la  
 25 Asn de la posición A21 podrá modificarse en Ala, Gin, Glu, Gly, His, Ile, leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular en Gly, Ala, Ser o Thr y, preferentemente, en Gly. Además, la Asn en la posición B3 podrá modificarse en Lys, Thr, Ser, Gin, Glu o Asp. Algunos ejemplos adicionales de análogos de insulina son la des(B30) insulina humana; análogos de la des(B30) insulina humana; análogos de insulina donde se ha eliminado PheB1; análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión N-terminal y análogos de insulina donde la cadena  
 30 A y/o la cadena B tienen una extensión C terminal. Por lo tanto, se podrán añadir una o dos Arg a la posición B1.

Se utiliza un sistema sencillo para describir los análogos del péptido GLP-1. Por lo tanto, por ejemplo, [Gly<sup>8</sup>]GLP-1(7-37) designa un análogo de GLP-1(7-37) derivado formalmente de GLP-1(7-37) sustituyendo el residuo aminoacídico de origen natural en la posición 8 (Ala) por Gly. Los análogos de GLP-1 podrán ser aquellos en los que la Lys de origen natural en la posición 34 de GLP-1(7-37) haya sido sustituida por Arg. Se sobreentenderá que todos los  
 35 aminoácidos en los que no se especifica el isómero óptico son el isómero L.

En algunos aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 17 aminoácidos. En algunos aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 15 aminoácidos. En algunos aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 10 aminoácidos. En algunos aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 8 aminoácidos. En algunos aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 7 aminoácidos. En algunos  
 40 aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 6 aminoácidos. En algunos aspectos de la invención, se

han modificado un máximo de 5 aminoácidos. En algunos aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 4 aminoácidos. En algunos aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 3 aminoácidos. En algunos aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 2 aminoácidos. En algunos aspectos de la invención, se ha modificado 1 aminoácido.

- 5 Con “**des(B30) insulina**”, “**des(B30) insulina humana**” se hace referencia a la insulina o a uno de sus análogos en los que está ausente el residuo aminoacídico B30.

Con “**insulina original**” se hace referencia a la insulina natural tal como la insulina humana o insulina porcina. Como alternativa, la insulina original puede ser un análogo de insulina.

- 10 Con “**derivado**”, tal y como se utiliza en la presente, se hace referencia a una proteína de origen natural o a uno de sus análogos que han sido modificados químicamente, p. ej., introduciendo un sustituyente en una o más posiciones del esqueleto proteico u oxidando o reduciendo grupos de los residuos aminoacídicos en la proteína o acilando un grupo amino o un grupo hidroxilo libres.

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

- 15 Con el proceso de la invención, es posible obtener un polvo proteico seco con un pH que es diferente del pH de la solución proteica que está seca.

La presente invención trata sobre un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 para secar un proceso para secar una solución proteica, donde

- 20 a) Se obtiene una solución proteica al mezclar una proteína con agua que comprende opcionalmente excipientes y ajustar el pH con una base volátil, una base no volátil y, opcionalmente, un ácido no volátil para hacer que la solución proteica se vuelva alcalina, y
- b) Secar la solución proteica.

En un aspecto de la invención, el proceso comprende:

- 25 a) Seleccionar un pH objetivo de la proteína seca,
- b) Seleccionar un pH objetivo para la solución proteica,
- c) Proporcionar una fase acuosa,
- d) Añadir una proteína,
- e) Opcionalmente, añadir excipientes,
- f) Ajustar el pH con una base no volátil y opcionalmente un ácido no volátil hasta el pH objetivo de la proteína seca,
- 30 g) Ajustar el pH con una base volátil hasta el pH objetivo de la solución proteica que se va a secar, y
- h) Secar por aspersión la solución proteica,

donde los pasos d, e, f y g se pueden llevar a cabo en cualquier orden mientras se agita de manera continua. En un aspecto de la invención, los pasos d, e y f se pueden llevar a cabo en cualquier orden mientras se agita de manera

continua.

En un aspecto, la solución proteica se ajusta con una base volátil y una base no volátil. En un aspecto del proceso, la solución proteica se obtiene a una temperatura por debajo de aproximadamente 8 °C, por debajo de aproximadamente 6 °C, por debajo de aproximadamente 5 °C, por debajo de aproximadamente 4 °C, por debajo de aproximadamente 3 °C, por debajo de aproximadamente 2 °C o por debajo de aproximadamente 1 °C.

En un aspecto, el punto de congelación del agua se hace disminuir y la solución proteica se obtiene a una temperatura por debajo de 0 °C.

En un aspecto, la solución proteica tiene un pH o un pH objetivo por encima de aproximadamente 7.4, por encima de aproximadamente 7.6, por encima de aproximadamente 7.8, por encima de aproximadamente 8.0, por encima de aproximadamente 8.2, por encima de aproximadamente 8.4 o por encima de aproximadamente 8.6. La tendencia de las proteínas a fibrilar es menos pronunciada cuando el pH de la solución proteica está comprendido entre aproximadamente 7.6 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 7.6 y aproximadamente 10.5, entre aproximadamente 7.8 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 7.8 y aproximadamente 10.5, entre aproximadamente 8.0 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 8.0 y aproximadamente 10.5, entre aproximadamente 8.2 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 8.4 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 8.6 y aproximadamente 10.0, entre aproximadamente 8.8 y aproximadamente 10.0, entre aproximadamente 9.0 y aproximadamente 10.0 o entre aproximadamente 9.2 y aproximadamente 10.0.

En un aspecto de la invención, se añade la proteína a una solución acuosa. La solución acuosa puede ser agua pura o puede contener excipientes o un compuesto alcalino. En un aspecto de la invención, el pH de la solución proteica se ajusta con una solución alcalina que comprende una base no volátil. La base no volátil se puede seleccionar a partir del grupo constituido por sales de metales alcalinos, hidróxidos de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, hidróxidos de metales alcalinotérreos y aminoácidos o una combinación de estos. Por ejemplo, el pH se puede ajustar con hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, óxido de calcio o cualquier combinación de estos.

En un aspecto de la invención, el pH de la solución proteica se ajusta con una solución alcalina que comprende una base volátil. La base volátil se puede seleccionar a partir del grupo constituido por hidróxidos de amonio, hidróxidos de tetraalquilamonio, aminas secundarias, aminas terciarias, arilaminas, aminas alifáticas o bicarbonato de amonio o una combinación. Por ejemplo, la base volátil puede ser bicarbonato, carbonato, amoníaco, hidrazina o una base orgánica tal como las aminas alifáticas inferiores, p. ej., trimetilamina, trietilamina, dietanolaminas, trietanolamina y sus sales. Además, la base volátil puede ser hidróxido de amonio, etilamina o metilamina o una combinación de estos.

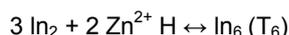
Después de añadir hidróxido de amonio a una solución acuosa que contiene insulina, la proteína, por ejemplo, insulina, se disolverá más rápidamente.

En un aspecto de la invención, se ajusta el pH de la solución proteica con una solución alcalina que comprende una base volátil y una base no volátil. En un aspecto, el pH de la solución proteica se ajusta con hidróxido de sodio hasta el pH objetivo de la proteína seca y con hidróxido amonio para obtener el pH seleccionado para la solución proteica que se va a secar por aspersion.

En un aspecto de la invención, se utiliza la base volátil para ajustar el pH de la solución proteica con al menos

aproximadamente 0.5 unidades de pH, al menos aproximadamente 0.7 unidades de pH, o al menos aproximadamente 0.9 unidades de pH, o al menos aproximadamente 1.1 unidades de pH, o al menos aproximadamente 1.3 unidades de pH o al menos aproximadamente 1.5 unidades de pH.

5 En solución, el patrón de autoasociación de la insulina es una función compleja de la concentración proteica, iones metálicos, pH, fuerza iónica y composición del disolvente. Para algunas de las soluciones utilizadas en la actualidad que contiene insulina, iones de zinc, sales y compuestos fenólicos, se debe considerar el siguiente equilibrio:



10 donde In es insulina, In<sub>2</sub> es insulina dimérica, In<sub>6</sub> es insulina hexamérica, T<sub>6</sub> es la insulina hexamérica en la conformación T<sub>6</sub>, T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> es la insulina hexamérica en la conformación T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> y R<sub>6</sub> es la insulina hexamérica en el estado R<sub>6</sub> hexamérico.

15 Los patrones de degradación conocidos de la insulina incluyen a) la formación de fibrillas; b) desamidaciones en A18, A21 y B3; c) dimerizaciones mediante una transamidación o la formación de la base de Schiff; d) reacciones de intercambio de disulfuro.

20 De acuerdo con Brange (Stability of Insuline, Kluwer Academic Press, 1994), cada una de estas reacciones de degradación ocurren mucho más rápidamente en el estado monomérico que en el estado hexamérico. Por lo tanto, el medio más eficaz para estabilizar las preparaciones de insulina es desplazando el equilibrio anterior hacia la derecha tanto como sea posible. Además de este efecto general de la acción de masas, la reactividad de los residuos seleccionados se modifica adicionalmente dependiendo de su implicación directa en el cambio conformacional T→R. Por lo tanto, la reactividad de B3Asn es mucho más baja en el estado R (cuando el residuo se encuentra en una hélice alfa) que en el estado T. La interconversión entre las conformaciones T<sub>6</sub>, T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> y R<sub>6</sub> del hexámero de insulina con dos zinc se modula mediante la unión del ligando a las formas T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> y R<sub>6</sub>. Los aniones tales como el cloruro tienen afinidad por la cuarta posición de coordinación en los iones metálicos de T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> y R<sub>6</sub>, 25 mientras que los conservantes tales como el fenol se unen a las cavidades hidrófobas situadas cerca de las superficies de las formas T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> y R<sub>6</sub> (Derewenda, Nature y Brzovic, *Biochemistry* 33, 130557, 1994).

Por lo tanto, las condiciones que favorecen la conformación R<sub>6</sub> de la insulina en solución suponen una ventaja tanto durante el proceso de secado, con el fin de evitar la desnaturalización de la insulina, como durante el almacenamiento, con el fin de maximizar la estabilidad química.

30 En un aspecto de la invención, la solución proteica comprende fenol. En un aspecto, la solución proteica comprende al menos aproximadamente 2 moles de fenol por mol de proteína, o al menos aproximadamente 3 moles de fenol por mol de proteína o al menos aproximadamente 4 moles de fenol por mol de proteína. En un aspecto, la solución proteica comprende aproximadamente 4 moles de fenol por mol de insulina. En un aspecto, la solución proteica comprende aproximadamente 4 moles de fenol por mol de insulina y la solución proteica comprende zinc. Cuando la 35 solución proteica comprende insulina, el fenol estabiliza el hexámero de insulina.

La proteína se selecciona a partir del grupo constituido por insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1 y derivados de GLP-1, glucagón y/o cualquier combinación de estos.

En un aspecto de la invención, la solución proteica comprende una proteína seleccionada a partir del grupo constituido por insulina, análogos de insulina, derivados de insulina y la solución además comprende zinc. El contenido de zinc de la solución proteica que comprende insulina puede estar comprendido en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 iones de zinc por hexámero de insulina, o el contenido de zinc puede estar comprendido en el intervalo de aproximadamente 2.1 a aproximadamente 3 iones de zinc por hexámero de insulina o el contenido de zinc puede estar comprendido en el intervalo de aproximadamente 2.2 a aproximadamente 2.7 iones de zinc por hexámero de insulina. El contenido de zinc de la solución proteica que comprende insulina puede ser de aproximadamente 2.3 iones de zinc por hexámero de insulina.

En un aspecto de la invención, la solución proteica comprende un tampón, un detergente, un estabilizante, un inhibidor de proteasa, un sabor, un portador, un agente protector de absorción, un agente de relleno o un agente para mejorar las propiedades de fluidez o un potenciador de la penetración.

En un aspecto de la invención, la solución proteica comprende glicilglicina. Cuando se añade glicilglicina a la solución proteica, la proteína se disuelve más rápidamente. En un aspecto, se añade glicilglicina a una solución acuosa que comprende insulina. La concentración de glicilglicina en la solución estará comprendida entre aproximadamente 4 mM y aproximadamente 200 mM. En un aspecto de la invención, en el método para secar o secar por aspersion una solución proteica se determina un pH objetivo de la proteína seca. El pH de la solución proteica que se va a secar o secar por aspersion es superior al pH objetivo de la proteína seca. El pH de la solución proteica podrá estar al menos aproximadamente 0.5 unidades de pH por encima del pH de la proteína seca. El pH de la solución proteica podrá estar al menos aproximadamente 0.7, al menos aproximadamente 0.9, al menos aproximadamente 1.1, al menos aproximadamente 1.3, o al menos aproximadamente 1.5, o al menos aproximadamente 2.0 o al menos aproximadamente 2.5 unidades de pH por encima del pH de la proteína secada por aspersion.

En un aspecto de la invención, el pH o el pH objetivo de la proteína secada por aspersion está comprendido entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 8.5, entre aproximadamente 6.2 y aproximadamente 8.4, entre aproximadamente 6.4 y aproximadamente 8.3, entre aproximadamente 6.6 y aproximadamente 8.2, entre aproximadamente 6.8 y aproximadamente 8.1, entre aproximadamente 7.0 y aproximadamente 8.0, entre aproximadamente 7.2 y aproximadamente 7.9, entre aproximadamente 7.4 y aproximadamente 7.8 o entre aproximadamente 7.6 y aproximadamente 7.7.

En un aspecto de la invención, la solución proteica se seca o se seca por aspersion para obtener un contenido acuoso por debajo de aproximadamente un 10%. El contenido de agua podrá estar por debajo de aproximadamente un 6%, por debajo de aproximadamente un 4%, por debajo de aproximadamente un 2% o por debajo de aproximadamente un 1% calculado/medido según la pérdida en un ensayo de secado (gravimétrico) según se menciona en la parte experimental.

En un aspecto de la invención, la proteína que se va a secar o secar por aspersion se selecciona a partir del grupo constituido por insulina humana AspB28; insulina humana LysB28ProB29 e insulina humana LysB3GluB29.

En un aspecto, la invención se refiere a una proteína seca que se puede obtener según el proceso de la invención.

En un aspecto, la invención se refiere a una proteína seca tal y como se describe en los ejemplos.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad

terapéuticamente eficaz de una proteína seca, tal como insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón y/o combinaciones de estos de acuerdo con la invención, donde la composición se puede proporcionar para el tratamiento de la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en pacientes que necesiten un tratamiento de este tipo.

- 5 En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína seca, tal como insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón y/o cualquier combinación de estos junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o un aditivo farmacéuticamente aceptable, donde la composición se puede proporcionar para el tratamiento de la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan  
10 hiperglucemia en pacientes que necesiten un tratamiento de este tipo.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en un paciente que necesite un tratamiento de este tipo, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende la proteína secada de acuerdo con la invención, tal como insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1,  
15 análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón y/o cualquier combinación de estos.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en un paciente que necesite un tratamiento de este tipo, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende la proteína secada de acuerdo con la invención, tal como insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1,  
20 análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón y/o cualquier combinación de estos, opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en un paciente que necesite un tratamiento de este tipo, donde la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína secada de acuerdo  
25 con la invención, tal como insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón, mezclada con una o dos proteínas secadas por aspersión de acuerdo con la invención, tales como insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón opcionalmente junto con portadores y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros  
30 estados que causan hiperglucemia en un paciente que necesite un tratamiento de este tipo, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína secada de acuerdo con la invención, tal como insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón, mezclada con una o dos proteínas secadas de acuerdo con la invención, tales como insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de  
35 GLP-1, glucagón opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

Un aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína secada de acuerdo con la invención, tal como insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón y/o cualquier combinación

de estos, opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o un aditivo farmacéuticamente aceptable, que se puede proporcionar para el tratamiento pulmonar de la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en pacientes que necesiten un tratamiento de este tipo.

5 En un aspecto, la invención se refiere a la aplicación de una composición farmacéutica para el tratamiento pulmonar de la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en un paciente que necesite un tratamiento de este tipo, donde la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína secada de acuerdo con la invención, tal como insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón y/o cualquier combinación de estos, opcionalmente en una mezcla con insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido, junto con portadores y/o  
10 aditivos farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para la producción de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia, donde la composición se usa por vía pulmonar y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína secada de acuerdo con la invención, tal como insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos  
15 de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón y/o cualquier combinación de estos, opcionalmente en una mezcla con insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

#### **PRODUCCIÓN DE INSULINA**

La insulina o un precursor de esta se puede producir mediante la conocida síntesis de péptidos o mediante la  
20 conocida producción recombinante en microorganismos transformados adecuados. Por lo tanto, la insulina se puede producir mediante un método que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y capaz de expresar el polipéptido en un medio nutriente adecuado en condiciones que permiten la expresión del péptido, tras lo cual se recupera el péptido resultante a partir del cultivo.

Cuando se están preparando los derivados de insulina que se van a utilizar en la formulación farmacéutica de  
25 acuerdo con la invención, el producto de partida para la sustitución, la insulina original o el análogo de insulina o un precursor de estos, se puede producir mediante la conocida síntesis de péptidos o mediante la conocida producción recombinante en microorganismos transformados adecuados. Por lo tanto, el producto de partida de tipo insulina se puede producir mediante un método que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de  
30 ADN que codifica el polipéptido y capaz de expresar el polipéptido en un medio nutriente adecuado en condiciones que permiten la expresión del péptido, tras lo cual se recupera el péptido resultante a partir del cultivo. Se hace referencia a la solicitud de patente internacional WO 2005/012347.

#### **COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS**

La proteína seca de esta invención se puede administrar, por ejemplo, por vía subcutánea, oral, nasal o pulmonar.

Para la administración subcutánea, se formula la insulina seca de manera análoga a la formulación de la insulina  
35 conocida. Además, para la administración subcutánea, la insulina seca de esta invención se administra de manera análoga a la administración de la insulina conocida y, por lo general, los médicos estarán familiarizados con este procedimiento.

La insulina seca de esta invención se podrá administrar por inhalación en un modo de dosis eficaz para incrementar

los niveles de insulina circulante y/o para disminuir los niveles de glucosa circulante. Una administración de este tipo puede ser eficaz para tratar trastornos tales como la diabetes o hiperglucemia. Lograr dosis eficaces de insulina requiere la administración de una dosis inhalada de insulina seca de esta invención de entre más de aproximadamente 0.5 µg/kg y 50 µg/kg. El facultativo experto, que tendrá en cuenta factores que incluyen el nivel de insulina, niveles de glucosa sanguínea, la condición física del paciente, el estado pulmonar del paciente o similares, puede determinar una cantidad terapéuticamente eficaz.

De acuerdo con la invención, se podrá suministrar la insulina seca de esta invención por inhalación para lograr una rápida absorción de esta. La administración por inhalación puede conllevar una farmacocinética comparable a la de la administración subcutánea de insulina. La inhalación de insulina seca de esta invención conduce a una elevación rápida del nivel de insulina circulante seguida por un descenso rápido de los niveles de glucosa sanguínea. Normalmente, diferentes dispositivos de inhalación proporcionan una farmacocinética similar cuando se comparan tamaños de partícula similares y niveles de depósito en el pulmón similares.

De acuerdo con la invención, la insulina seca de esta invención se podrá suministrar mediante uno cualquiera de una variedad de dispositivos de inhalación conocidos en la técnica para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos dispositivos incluyen inhaladores dosificadores, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores y similares. La insulina seca de esta invención se suministra mediante un pulverizador o inhalador de polvo seco. Existen varios rasgos deseables de un dispositivo de inhalación para administrar la insulina seca de esta invención. Por ejemplo, el suministro mediante un dispositivo de inhalación es convenientemente fiable, reproducible y exacto. El dispositivo de inhalación deberá suministrar partículas pequeñas, por ejemplo, partículas inferiores a aproximadamente 10 µm, por ejemplo, aproximadamente 1-5 µm, para una buena respirabilidad. Algunos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación comercializados adecuados para llevar a la práctica esta invención son Turbohaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), inhalador Spiros™ (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, AERx™ (Aradigm), el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), el nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products), el inhalador dosificador Ventolin® (Glaxo), el inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons) o similares.

Como reconocerán los expertos en la técnica, la formulación de la proteína seca de la invención, la cantidad de la formulación suministrada y la duración de la administración de una única dosis dependen del tipo de dispositivo de inhalación empleado. Para algunos sistemas de suministro en aerosol, tales como nebulizadores, la frecuencia de administración y la duración del período en el cual el sistema se activa dependerán principalmente de la concentración del conjugado de insulina en el aerosol. Por ejemplo, se pueden utilizar periodos de administración más cortos con concentraciones más elevadas del conjugado de insulina en la solución del nebulizador. Los dispositivos tales como los inhaladores dosificadores pueden producir concentraciones de aerosol más elevadas y se pueden operar durante periodos más cortos para suministrar la cantidad deseada del conjugado de insulina. Los dispositivos tales como inhaladores de polvo suministran el agente activo hasta que se expulsa una descarga de agente concreta desde el dispositivo. En este tipo de inhalador, la cantidad de insulina seca de esta invención en una cantidad de polvo concreta determina la dosis administrada en una única administración.

El tamaño de la partícula de la insulina seca de esta invención en la formulación suministrada mediante el dispositivo de inhalación es crucial en lo que se refiere a la capacidad de la insulina para alcanzar los pulmones y las vías respiratorias bajas o alveolos. La insulina seca de esta invención se puede formular de manera que al menos aproximadamente un 10% del conjugado de insulina suministrado se deposite en el pulmón, por ejemplo, de aproximadamente un 10 a aproximadamente un 20% o más. Se sabe que la máxima eficacia del depósito pulmonar

para seres humanos que respiran a través de la boca se obtiene con tamaños de partículas de entre aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ . El depósito pulmonar disminuye sustancialmente cuando los tamaños de partícula son superiores a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . Los tamaños de partícula inferiores a aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  provocan que el depósito pulmonar disminuya y se vuelva más difícil suministrar una masa suficiente de partículas que sea terapéuticamente eficaz. Por lo tanto, las partículas de proteína seca suministradas mediante la inhalación tienen un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, en el intervalo comprendido entre aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . La formulación de la proteína seca se selecciona para generar el tamaño de partícula deseado en el dispositivo de inhalación escogido.

Convenientemente para la administración como un polvo seco, la proteína seca de esta invención se prepara en una forma particulada con un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula es eficaz para el suministro en los alveolos del pulmón del paciente. El polvo seco está compuesto principalmente por partículas producidas de manera que la mayoría de las partículas tengan un tamaño en el intervalo deseado. Convenientemente, al menos aproximadamente un 50% del polvo seco está compuesto por partículas que tiene un diámetro inferior a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ .

Normalmente, las partículas se separan a partir de una formulación de polvo seco en un recipiente y a continuación se transportan al pulmón de un paciente mediante una corriente de aire portadora. Normalmente, en los inhaladores de polvo seco actuales, la fuerza para romper el sólido está proporcionada únicamente por la inhalación del paciente. En otro tipo de inhalador, un flujo de aire generado por la inhalación del paciente activa un motor impulsor que desaglomera las partículas.

Las formulaciones de proteína seca de esta invención para la administración a partir de un inhalador de polvo seco normalmente incluyen un polvo seco finamente dividido que contiene la proteína seca, pero el polvo también puede incluir un agente de relleno, un portador, un excipiente, otro aditivo o similares. Se pueden incluir aditivos en una formulación de polvo seco del conjugado de insulina, por ejemplo, para diluir el polvo según se requiera para el suministro a partir de un inhalador de polvo particular, para facilitar el procesamiento de la formulación, para proporcionar propiedades de polvo convenientes a la formulación, para facilitar la dispersión del polvo a partir del dispositivo de inhalación, para estabilizar la formulación (por ejemplo, antioxidantes o tampones), para proporcionar sabor a la formulación o similares. Convenientemente, el aditivo no afecta de manera adversa a las vías respiratorias del paciente. La proteína seca se puede mezclar con un aditivo a un nivel molecular o la formulación sólida puede incluir partículas de la proteína conjugada mezclada con las partículas del aditivo o que recubren estas. Los aditivos normales incluyen mono-, di- y polisacáridos; alcoholes polihídricos y otros polioles tales como, por ejemplo, lactosa, glucosa, rafinosa, melezitosa, lactitol, maltitol, trehalosa, sacarosa, manitol, almidón o combinaciones de estos; surfactantes, tales como sorbitoles, difosfatidilcolina o lecitina; o similares. Normalmente un aditivo, tal como un agente de relleno, está presente en una cantidad eficaz para un objetivo descrito anteriormente, a menudo entre aproximadamente un 50% y aproximadamente un 99% en peso de la formulación. También se pueden incluir en la formulación agentes adicionales conocidos en la técnica de la formulación de una proteína tal como una proteína análoga de la insulina.

La solución proteica podrá combinarse opcionalmente con portadores o excipientes farmacéuticos que sean adecuados para la administración respiratoria y pulmonar. Tales portadores podrán actuar simplemente como agentes de relleno cuando se desee reducir la concentración de insulina en el polvo que se está suministrando a un

paciente, pero también podrán servir para potenciar la estabilidad de las composiciones de insulina y para mejorar la dispersabilidad del polvo dentro de un dispositivo de dispersión de polvo con el fin de proporcionar un suministro más eficaz y reproducible de la insulina y para mejorar las características de manejo de la insulina tales como la fluidez y consistencia para facilitar la producción y el rellenado con el polvo.

- 5 Los materiales portadores adecuados podrán estar en forma de un polvo amorfo, un polvo cristalino o una combinación de polvos amorfos y cristalinos. Los materiales adecuados incluyen carbohidratos, p. ej., monosacáridos tales como la fructosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos tales como la lactosa, trehalosa, celobiosa y similares; ciclodextrinas tales como la 2-hidroxiopropilciclodextrina; y polisacáridos tales como la rafinosa, maltodextrinas, dextranos y similares; (b) aminoácidos tales como la glicina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, lisina y similares; (c) sales orgánicas preparadas a partir de bases y ácidos orgánicos tales como el citrato de sodio, ascorbato de sodio, gluconato de magnesio, gluconato de sodio, clorhidrato de trometamina y similares; (d) péptidos y proteínas tales como el aspartamo, albúmina sérica humana, gelatina y similares; (e) alditos tales como manitol, xilitol y similares. Un grupo preferido de portadores incluye la lactosa, trehalosa, rafinosa, maltodextrinas, glicina, citrato de sodio, clorhidrato de trometamina, albúmina sérica humana y manitol. Tales materiales portadores podrán combinarse con la insulina antes del secado por aspersion, es decir, añadiendo el material portador a la solución proteica o la fase acuosa que se prepara para el secado por aspersion. De esta manera, el material portador se formará simultáneamente con las partículas proteicas y como parte de estas.

20 Normalmente, cuando el portador se forma por secado por aspersion junto con la proteína, la proteína estará presente en cada partícula individual con un porcentaje en peso comprendido en el intervalo entre un 5% y un 95%, preferentemente entre un 20% y un 80%. El resto de la partícula será principalmente material portador (que normalmente está entre un 5% y un 95%, que habitualmente está entre un 20% y un 80% en peso), pero también incluirá un tampón o tampones y podrá incluir otros componentes tal como se ha descrito anteriormente.

25 Como alternativa, los portadores se podrán preparar por separado en una forma de polvo seco y combinarse con la proteína en polvo seco mezclándolos. Los portadores en polvo preparados por separado normalmente serán cristalinos (para evitar la absorción de agua), pero en algunos casos podrán ser amorfos o mezclas de formas cristalinas y amorfas. El tamaño de las partículas portadoras se podrá seleccionar para mejorar la fluidez del polvo de insulina, habitualmente estará comprendido en el intervalo entre 25 m y 100 m. Las partículas portadoras en este intervalo de tamaño por lo general no penetrarán en la región alveolar del pulmón y a menudo se separarán de la insulina en el dispositivo de suministro antes de la inhalación. Por lo tanto, las partículas que penetran en la región alveolar del pulmón estarán constituidas esencialmente por insulina y tampón. Un material portador preferido es el manitol cristalino que tiene un tamaño comprendido en el intervalo mencionado anteriormente. Los polvos de insulina secos de la presente invención también se podrán combinar con otros componentes activos. Por ejemplo, podrá ser deseable combinar pequeñas cantidades de amilina análogos de amilina activos con los polvos de insulina para mejorar el tratamiento de la diabetes. La amilina es una hormona que se secreta con la insulina a partir de las células  $\beta$  pancreáticas en individuos normales (no diabéticos). Se cree que la amilina modula la actividad de la insulina *in vivo* y se ha propuesto que la administración simultánea de la amilina con la insulina podría mejorar el control de la glucosa sanguínea. La combinación de la amilina en polvo seco con la insulina en las composiciones de la presente invención proporcionará un producto especialmente conveniente para lograr tal administración simultánea. La amilina se podrá combinar con la insulina entre un 0.1% en peso y un 10% en peso (en función del peso total de insulina en una dosis), preferentemente entre un 0.5% en peso y un 2.5% en peso. La amilina se

puede adquirir de proveedores comerciales, tales como Amylin Corporation, San Diego, California y se puede formular fácilmente en las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, se podrá disolver la amilina en soluciones adecuadas acuosas o de otro tipo junto con la insulina, y opcionalmente portadores, y secar por aspersion la solución para producir el producto en polvo.

- 5 Se puede producir un pulverizado que incluye la proteína seca de esta invención forzando el paso con presión de una suspensión o solución del conjugado proteico a través de una boquilla. El tamaño y la configuración de la boquilla, la presión aplicada y la tasa de alimentación del líquido se pueden escoger para lograr el tamaño de partícula y corriente de salida deseados. Se puede producir un electropulverizado, por ejemplo, mediante un campo eléctrico conectado con una alimentación de la boquilla o capilar. Convenientemente, las partículas del conjugado de
- 10 insulina suministradas mediante un pulverizador tienen un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, en el intervalo entre aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ .

Las formulaciones de la proteína seca de esta invención adecuadas para su uso con un pulverizador incluirán normalmente proteínas en una solución acuosa con una concentración entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 20 mg de conjugado proteico por mL de solución. La formulación puede incluir agentes tales como

15 un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un surfactante y, por ejemplo, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para la estabilización de los cristales, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína de relleno o un carbohidrato. Las proteínas de relleno útiles en la formulación de conjugados proteicos secos incluyen la albúmina, protamina o similares. Los carbohidratos típicos útiles en la formulación de conjugados proteicos incluyen la sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa o similares. La

20 formulación cristalina también puede incluir un surfactante, que puede reducir o evitar la agregación inducida superficialmente del conjugado de insulina provocada por la atomización de la solución al formar un aerosol. Se pueden emplear diversos surfactantes convencionales, tales como alcoholes y ésteres de ácidos grasos y polioxietileno y ésteres de ácidos grasos y sorbitol y polioxietileno. Por lo general, las cantidades estarán comprendidas en el intervalo entre aproximadamente un 0.001 y aproximadamente un 4% en peso de la

25 formulación. Las composiciones farmacéuticas que contienen una proteína secada de acuerdo con la invención también se podrán administrar por vía nasal. La composición farmacéutica se podrá administrar como una composición líquida, una composición seca o un gel. Para el suministro del fármaco mediante la nariz, los cristales podrán ser superiores a 10  $\mu\text{m}$  con el fin de asegurar el depósito en la cavidad nasal y para evitar que las partículas se vean arrastradas hacia la región traqueobronquial y pulmonar. Se carece de un conocimiento claro del límite del

30 tamaño superior, pero probablemente existe un tamaño de partícula superior por encima del cual las partículas, por varias razones, no demostrarán eficacia y tal vez puedan incluso provocar una irritación local.

Las composiciones farmacéuticas que contienen una proteína secada de acuerdo con la presente invención también se podrán administrar por vía parenteral a los pacientes que necesiten un tratamiento de este tipo. La administración parenteral se podrá realizar mediante una inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una

35 jeringuilla, opcionalmente una jeringuilla de tipo bolígrafo. Como alternativa, se puede realizar una administración parenteral por medio de una bomba de infusión.

Se pueden preparar composiciones inyectables de la proteína seca de la invención utilizando las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que conllevan disolver y mezclar los ingredientes según sea necesario para obtener el producto final deseado. Por lo tanto, de acuerdo con un procedimiento, se disuelve un cristal que

40 comprende la insulina de acuerdo con la invención en una cantidad de agua que es algo inferior al volumen final de

la composición que se va preparar. Se añaden un agente isotónico, un conservante y un tampón según sea necesario y se ajusta el valor del pH de la solución, si es necesario, utilizando un ácido, p. ej., ácido clorhídrico, o una base, p. ej., hidróxido de sodio acuoso según sea necesario. Finalmente, se ajusta el volumen de la solución con agua para obtener la concentración deseada de los ingredientes.

- 5 En un aspecto adicional de la invención, se selecciona el tampón a partir del grupo constituido por acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, glicina, arginina, dihidrógenofosfato de sodio, hidrógenofosfato de disodio, fosfato de sodio y tris(hidroximetil)aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de estos. Cada uno de estos tampones específicos constituye un aspecto alternativo de la invención.
- 10 En un aspecto adicional de la invención, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable que se podrá seleccionar a partir del grupo constituido por fenol, *o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol, *p*-hidroxibenzoato de metilo, *p*-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, *p*-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencilico, clorobutanol y trimerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, *p*-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorofenesina (3-*p*-clorofenoxipropano-1,2-diol)
- 15 o mezclas de estos. En un aspecto adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración comprendida entre 0.1 mg/mL y 20 mg/mL. En un aspecto adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración comprendida entre 0.1 mg/mL y 5 mg/mL. En un aspecto adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración comprendida entre 5 mg/mL y 10 mg/mL. En un aspecto adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración comprendida entre 10 mg/mL y 20 mg/mL. Cada uno
- 20 de estos conservantes específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El experto en la técnica está familiarizado con el uso de un conservante en composiciones farmacéuticas. Por razones de conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19.<sup>a</sup> edición, 1995.

- En un aspecto adicional de la invención, la formulación además comprende un agente isotónico que se podrá seleccionar a partir del grupo constituido por una sal (p. ej., cloruro de sodio), un azúcar o azúcar polihídrico, un
- 25 aminoácido (p. ej., glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej., glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol), polietilenglicol (p. ej., PEG400) o mezclas de estos. Se podrá utilizar cualquier azúcar tal como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles incluidos, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietilalmidón y carboximetilcelulosa-Na.
- 30 En un aspecto, el aditivo de tipo azúcar es sacarosa. Se define un azúcar polihídrico como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En un aspecto, el aditivo de tipo azúcar polihídrico es manitol. Los azúcares o azúcares polihídricos mencionados anteriormente se podrán utilizar individualmente o combinados. No existe un límite fijo para la cantidad utilizada, siempre que el azúcar o azúcar polihídrico sea soluble en la preparación líquida y no tenga un efecto adverso frente
- 35 a los efectos estabilizantes logrados utilizando los métodos de la invención. En un aspecto, la concentración de azúcar o azúcar polihídrico está comprendida entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 150 mg/mL. En un aspecto adicional de la invención, el agente isotónico está presente con una concentración entre 1 mg/mL y 50 mg/mL. En un aspecto adicional de la invención, el agente isotónico está presente con una concentración entre 1 mg/mL y 7 mg/mL. En un aspecto adicional de la invención, el agente isotónico está presente con una concentración
- 40 entre 8 mg/mL y 24 mg/mL.

En un aspecto adicional de la invención, el agente isotónico está presente con una concentración entre 25 mg/mL y 50 mg/mL. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El experto en la técnica está familiarizado con el uso de un agente isotónico en las composiciones farmacéuticas. Por razones de conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19.<sup>a</sup> edición, 5 1995.

Los agentes isotónicos típicos son el cloruro de sodio, manitol, dimetilsulfona y glicerol y los conservantes típicos son el fenol, *m*-cresol, *p*-hidroxibenzoato de metilo y alcohol bencílico.

Algunos ejemplos de tampones adecuados son el acetato de sodio, glicilglicina, HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinoetanosulfónico) y fosfato de sodio.

10 Las composiciones que contienen la proteína seca de esta invención tal como la insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón se pueden utilizar en el tratamiento de estados que son sensibles a la insulina. Por lo tanto, se puede utilizar en el tratamiento de la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 e hiperglucemia, por ejemplo, tal y como se observa a veces en personas gravemente heridas y personas que se han sometido a cirugía mayor. El nivel de la dosis óptima para cada paciente dependerá de varios 15 factores, incluidos la eficacia de la insulina específica empleada, la edad, el peso corporal, la actividad física y la dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos y de la gravedad del estado que se va a tratar. Se recomienda que el experto en la técnica determine la dosis diaria de la proteína seca de esta invención para cada paciente individual de manera similar a la de las composiciones farmacéuticas conocidas.

20 Cuando sea oportuno, se podrá utilizar la proteína seca de esta invención en una mezcla con otros tipos de proteínas, p. ej., análogos de insulina con un inicio de acción más rápido. Los ejemplos de tales análogos de insulina se describen, p. ej., en las solicitudes de patente europea que tienen los n.<sup>os</sup> de publicación EP 214826 (Novo Nordisk A/S), EP 375437 (Novo Nordisk A/S) y EP 383472 (Eli Lilly & Co.).

Se resumirá la invención en los siguientes párrafos:

1. Un proceso para secar una solución proteica, donde
  - 25 a) se obtiene una solución proteica al mezclar una proteína con agua que comprende opcionalmente excipientes y ajustar el pH con una base volátil, una base no volátil y, opcionalmente, un ácido no volátil para hacer que la solución proteica se vuelva alcalina, y
  - b) secar la solución proteica.
2. Un proceso de acuerdo con el párrafo 1, que comprende:
  - 30 a) Seleccionar un pH objetivo de la proteína seca,
  - b) Seleccionar un pH objetivo para la solución proteica,
  - c) Proporcionar una fase acuosa,
  - d) Añadir una proteína,
  - e) Opcionalmente, añadir excipientes,

- f) Ajustar el pH con una base no volátil y opcionalmente un ácido no volátil hasta el pH objetivo de la proteína seca,
- g) Ajustar el pH con una base volátil hasta el pH objetivo de la solución proteica que se va a secar, y
- h) Secar por aspersion la solución proteica,
- 5 donde los pasos d, e, f y g se pueden llevar a cabo en cualquier orden mientras se agita de manera continua.
3. Un proceso de acuerdo con el párrafo 2, donde los pasos d, e y f se pueden llevar a cabo en cualquier orden mientras se agita de manera continua.
4. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-3, donde la solución proteica se obtiene a una temperatura por  
10 debajo de 8 °C.
5. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-4, donde la solución proteica se obtiene a una temperatura por debajo de 6 °C, por debajo de 5 °C, por debajo de 4 °C, por debajo de 3 °C, por debajo de 2 °C o por debajo de 1 °C.
6. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-5, donde el punto de congelación de la fase acuosa se hace  
15 disminuir y se obtiene una solución proteica a una temperatura por debajo de 0 °C.
7. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-6, donde el método de secado se selecciona a partir del grupo constituido por secado por aspersion, liofilización por aspersion, secado en lecho fluido, liofilización y secado al vacío.
8. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-7, donde la solución proteica tiene un pH por encima de 7.4.
- 20 9. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-8, donde la solución proteica tiene un pH por encima de 7.6, por encima de 7.8, por encima de 8.0, por encima de 8.2, por encima de 8.4 o por encima de 8.6.
10. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-8, donde la solución proteica tiene un pH entre 7.4 y 11.0.
11. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-8 y 10, donde la solución proteica tiene un pH entre  
25 aproximadamente 7.6 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 7.6 y aproximadamente 10.5, entre aproximadamente 7.8 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 7.8 y aproximadamente 10.5, entre aproximadamente 8.0 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 8.0 y aproximadamente 10.5, entre aproximadamente 8.2 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 8.4 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 8.6 y aproximadamente 10.0, entre aproximadamente 8.8 y aproximadamente 10.0, entre aproximadamente 9.0 y aproximadamente 10.0 o entre aproximadamente 9.2 y aproximadamente 10.0.
- 30 12. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-11, donde la base no volátil se selecciona a partir del grupo constituido por sales de metales alcalinos, hidróxidos de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, hidróxidos de metales alcalinotérreos y aminoácidos o una combinación de estos.
13. El proceso de acuerdo con el párrafo 12, donde la base no volátil es hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, óxido de calcio o cualquier combinación de estos.

14. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-13, donde la base volátil se selecciona a partir del grupo constituido por hidróxidos de amonio, hidróxidos de tetraalquilamonio, aminas secundarias, aminas terciarias, arilaminas, aminas alifáticas o bicarbonato de amonio o una combinación de estos.
- 5 15. El proceso de acuerdo con el párrafo 14, donde la base volátil es hidróxido de amonio, etilamina o metilamina o una combinación de estos.
16. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-15, donde la base volátil ajusta el pH de la solución proteica con al menos 0.5 unidades de pH.
17. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-16, donde la base volátil ajusta el pH de la solución proteica con al menos 0.7 unidades de pH, o al menos 0.9 unidades de pH o al menos 1.1 unidades de pH, o al menos  
10 1.3 unidades de pH o al menos 1.5 unidades de pH.
18. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-17, donde el pH de la solución proteica se ajusta con una solución que comprende hidróxido de sodio e hidróxido de amonio.
19. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-18, donde la proteína se selecciona a partir del grupo constituido por insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1 y derivados de GLP-1,  
15 glucagón y/o cualquier combinación de estos.
20. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-19, donde la solución proteica comprende una proteína seleccionada a partir del grupo constituido por insulina, análogos de insulina, derivados de insulina y además la solución comprende zinc.
21. El proceso de acuerdo con el párrafo 20, donde la solución proteica comprende fenol.
- 20 22. El proceso de acuerdo con los párrafos 20-21, donde la solución proteica comprende aproximadamente 4 moles de fenol por mol de proteína.
23. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-22, donde la solución proteica comprende un tampón, un detergente, un estabilizante, un inhibidor de proteasa, un sabor, un portador, un agente protector de absorción, un agente de relleno o un agente para mejorar las propiedades de fluidez o un potenciador de la  
25 penetración o una combinación de estos.
24. El proceso de acuerdo con el párrafo 23, donde la solución proteica comprende glicilglicina.
25. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-24, donde el pH de la solución proteica está por encima del pH de la proteína seca.
26. El proceso de acuerdo con el párrafo 25, donde el pH de la solución proteica está al menos 0.5 unidades  
30 de pH por encima del pH de la proteína seca.
27. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-26, donde el pH de la solución proteica está al menos 0.7, al menos 0.9, al menos 1.1, al menos 1.3 o al menos 1.5 unidades de pH por encima del pH de la proteína seca.
28. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-27, donde el pH de la proteína seca está entre aproximadamente

6.0 y aproximadamente 8.5.

29. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-28, donde el pH de la proteína seca está entre aproximadamente 6.2 y aproximadamente 8.4, entre aproximadamente 6.4 y aproximadamente 8.3, entre aproximadamente 6.6 y aproximadamente 8.2, entre aproximadamente 6.8 y aproximadamente 8.1, entre aproximadamente 7.0 y aproximadamente 8.0, entre aproximadamente 7.2 y aproximadamente 7.9, entre aproximadamente 7.4 y aproximadamente 7.8 o entre aproximadamente 7.6 y aproximadamente 7.7.
30. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-29, donde la solución proteica se seca para obtener un contenido acuoso de la proteína secada por aspersión por debajo de aproximadamente un 10%, por debajo de aproximadamente un 6%, por debajo de aproximadamente un 4%, por debajo de aproximadamente un 2% o por debajo de aproximadamente un 1%.
31. El proceso de acuerdo con los párrafos 1-30, donde la proteína es un análogo de insulina y se selecciona a partir del grupo constituido por insulina humana AspB28; insulina humana LysB28ProB29 e insulina humana LysB3GluB29.
32. La proteína seca que se puede obtener mediante el proceso de los párrafos 1-31.
33. La composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína secada por aspersión de acuerdo con el párrafo 32.
34. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 33, donde la composición es para el tratamiento pulmonar, parenteral, nasal u oral de la diabetes o hiperglucemia.
35. La composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes o hiperglucemia en un paciente que necesite un tratamiento de este tipo, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína secada de acuerdo con el párrafo 32, donde la proteína se selecciona a partir del grupo constituido por insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón y/o cualquier combinación de estos.
36. Un método para tratar la diabetes en un paciente que necesite un tratamiento de este tipo, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína secada de acuerdo con cualquiera de los párrafos 32 o una composición farmacéutica de acuerdo con los párrafos 33-35.
37. Un método de acuerdo con el párrafo 36, donde la proteína se selecciona a partir del grupo constituido por insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, glucagón y/o cualquier combinación de estos.
38. La proteína secada tal como se ha descrito en los ejemplos.
- 1a. Un proceso para secar una solución proteica, donde
- a) Se obtiene una solución proteica al mezclar una proteína con agua que comprende opcionalmente excipientes y ajustar el pH para que se vuelva alcalino, y
- b) Secar la solución proteica.

2a. Un proceso para producir una proteína seca a partir de una solución proteica comprende:

- a) Seleccionar un pH objetivo de la proteína seca,
- b) Seleccionar un pH objetivo para la solución proteica,
- c) Proporcionar una fase acuosa,
- 5 d) Añadir una proteína,
- e) Opcionalmente, añadir excipientes,
- f) Ajustar el pH con una base no volátil hasta el pH objetivo de la proteína seca,
- g) Ajustar el pH con una base volátil hasta el pH objetivo de la solución proteica que se va a secar, y
- h) Secar por aspersión la solución proteica,

10 donde los pasos d, e, f y g se pueden llevar a cabo en cualquier orden a la vez que se agita de manera continua.

3a. El proceso de acuerdo con el párrafo 1a, donde la solución proteica se ajusta con una base volátil y una base no volátil.

15 4a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-3a, donde la solución proteica se obtiene a una temperatura por debajo de 8 °C.

5a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-4a, donde la solución proteica se obtiene a una temperatura por debajo de 6 °C, por debajo de 5 °C, por debajo de 4 °C, por debajo de 3 °C, por debajo de 2 °C o por debajo de 1 °C.

20 6a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-5a, donde el punto de congelación de la fase acuosa se hace disminuir y se obtiene una solución proteica a una temperatura por debajo de 0 °C.

7a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-6a, donde el método de secado se selecciona a partir del grupo constituido por secado por aspersión, liofilización por aspersión, secado en lecho fluido, liofilización y secado al vacío.

25 8a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-7a, donde la solución proteica tiene un pH por encima de 7.4.

9a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-8a, donde la solución proteica tiene un pH por encima de 7.6, por encima de 7.8, por encima de 8.0, por encima de 8.2, por encima de 8.4 o por encima de 8.6.

10a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-8a, donde la solución proteica tiene un pH entre 7.4 y 11.0.

30 11a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-8a y 10a, donde la solución proteica tiene un pH entre aproximadamente 7.6 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 7.6 y aproximadamente 10.5, entre aproximadamente 7.8 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 7.8 y aproximadamente 10.5, entre aproximadamente 8.0 y aproximadamente 11.0, entre aproximadamente 8.0 y aproximadamente 10.5, entre aproximadamente 8.2 y aproximadamente 11.0 entre aproximadamente 8.4 y aproximadamente 11.0, entre

aproximadamente 8.6 y aproximadamente 10.0, entre aproximadamente 8.8 y aproximadamente 10.0, entre aproximadamente 9.0 y aproximadamente 10.0 o entre aproximadamente 9.2 y aproximadamente 10.0.

5 12a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-11a, donde la base no volátil se selecciona a partir del grupo constituido por sales de metales alcalinos, hidróxidos de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, hidróxidos de metales alcalinotérreos y aminoácidos o una combinación de estos.

13a. El proceso de acuerdo con el párrafo 12a, donde la base no volátil es hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, óxido de calcio o cualquier combinación de estos.

10 14a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-11a, donde la base volátil se selecciona a partir del grupo constituido por hidróxidos de amonio, hidróxidos de tetraalquilamonio, aminas secundarias, aminas terciarias, arilaminas, aminas alifáticas o bicarbonato de amonio o una combinación de estos.

15a. Proceso de acuerdo con el párrafo 14a, donde la base volátil es hidróxido de amonio, etilamina o metilamina o una combinación de estos.

16a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-15a, donde la base volátil ajusta el pH de la solución proteica con al menos 0.5 unidades de pH.

15 17a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-16a, donde la base volátil ajusta el pH de la solución proteica con al menos 0.7 unidades de pH, o al menos 0.9 unidades de pH, o al menos 1.1 unidades de pH, o al menos 1.3 unidades de pH o al menos 1.5 unidades de pH.

18a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-17a, donde el pH de la solución proteica se ajusta con una solución que comprende hidróxido de sodio e hidróxido de amonio.

20 19a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-18a, donde la solución proteica comprende fenol.

20a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-19a, donde la proteína se selecciona a partir del grupo constituido por insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, exendina, análogos y derivados de exendina y/o cualquier combinación de estos.

25 21a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-20a, donde la proteína se selecciona a partir del grupo constituido por amilina, análogos de amilina, derivados de amilina,  $\alpha$ -MSH, análogos de  $\alpha$ -MSH, derivados de  $\alpha$ -MSH y/o cualquier combinación de estos.

22a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-20a, donde la solución proteica comprende una proteína seleccionada a partir del grupo constituido por insulina, análogos de insulina, derivados de insulina y la solución además comprende zinc.

30 23a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-22a, donde la solución proteica comprende un tampón, un detergente, un estabilizante, un inhibidor de proteasa, un sabor, un portador, un agente protector de absorción, un agente de relleno o un agente para mejorar las propiedades de fluidez o un potenciador de la penetración o una combinación de estos.

24a. El proceso de acuerdo con el párrafo 23a, donde la solución proteica comprende glicilglicina.

35 25a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-24a, donde el pH de la solución proteica está por encima

del pH de la proteína seca.

26a. El proceso de acuerdo con el párrafo 25a, donde el pH de la solución proteica está al menos 0.5 unidades de pH por encima del pH de la proteína seca.

5 27a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-26a, donde el pH de la solución proteica está al menos 0.7, al menos 0.9, al menos 1.1, al menos 1.3 o al menos 1.5 unidades de pH por encima del pH de la proteína seca.

28a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-27a, donde el pH de la proteína seca está entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 8.5.

10 29a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-28a, donde el pH de la proteína seca está entre aproximadamente 6.2 y aproximadamente 8.4, entre aproximadamente 6.4 y aproximadamente 8.3, entre aproximadamente 6.6 y aproximadamente 8.2, entre aproximadamente 6.8 y aproximadamente 8.1, entre aproximadamente 7.0 y aproximadamente 8.0, entre aproximadamente 7.2 y aproximadamente 7.9, entre aproximadamente 7.4 y aproximadamente 7.8 o entre aproximadamente 7.6 y aproximadamente 7.7.

15 30a. El proceso acuerdo con los párrafos 1a-29a, donde la solución proteica se seca para obtener un contenido acuoso de la proteína secada por aspersion por debajo de aproximadamente un 10%, por debajo de aproximadamente un 6%, por debajo de aproximadamente un 4%, por debajo de aproximadamente un 2% o por debajo de aproximadamente un 1%.

20 31a. El proceso de acuerdo con los párrafos 1a-30a, donde la proteína es un análogo de insulina y se selecciona a partir del grupo constituido por insulina humana AspB28; insulina humana LysB28ProB29 e insulina humana LysB3GluB29.

32a. La proteína seca se puede obtener mediante el proceso de los párrafos 1a-31a.

33a. La composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína secada por aspersion de acuerdo con el párrafo 32a.

25 34a. La composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 33a, donde la composición es para el tratamiento pulmonar, parenteral, nasal u oral de la diabetes o hiperglucemia. 35a. La composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes o hiperglucemia en un paciente que necesite un tratamiento de este tipo, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína secada de acuerdo con el párrafo 32a, donde la proteína se selecciona a partir del grupo constituido por insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, exendina, análogos y  
30 derivados de exendina y/o cualquier combinación de estos.

36a. Un método para tratar la diabetes en un paciente que necesite un tratamiento de este tipo, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína secada de acuerdo con cualquiera de los párrafos 32a o una composición farmacéutica de acuerdo con los párrafos 33a-35a. 37a. Un método de acuerdo con el párrafo 36a, donde la proteína se selecciona a partir del grupo  
35 constituido por insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, exendina, análogos y derivados de exendina y/o cualquier combinación de estos.

38a. La proteína secada tal como se ha descrito en los ejemplos.

## MÉTODOS ANALÍTICOS

5 Se determinó el contenido HMWP mediante un método de cromatografía isocrática de exclusión por tamaño basado en un método de la Farmacopea Europea. Se utilizó una columna Insulin HMWP 7.8 x 300 mm de Waters con una fase móvil constituida por un 65% de una solución de L-arginina de 1.0 mg/mL, un 20% de acetonitrilo y un 15% de ácido acético glacial con un flujo de 0.5 mL/min. Los volúmenes de inyección fueron de 100 µL. La temperatura de la columna fue temperatura ambiente. Se realizó la detección mediante absorbancia ultravioleta a 276 nm. Se analizaron los cromatogramas basándose en el área del pico frente al área total del pico.

10 Se determinó la pureza con un método de cromatografía en fase inversa utilizando una columna Sunfire C18, 3.5 µm, d.i. 150 x 4.6 mm de Waters. La temperatura de la columna fue de 35 °C y el caudal fue 1 mL/min. Se utilizó un sistema de gradiente con una fase móvil A que contenía un 1.4% (p/p) de sulfato de sodio, un 0.2% (p/p) de ácido  $\alpha$ -fosfórico, un 7.7% (p/p) de acetonitrilo, pH 3.6 y una fase móvil B que contenía un 42.8% (p/p) de acetonitrilo en agua. El sistema de gradiente comenzó isocráticamente con aproximadamente un 42% de fase móvil B durante 30  
15 min. A continuación se incrementó la fase móvil B de manera lineal desde un 42% hasta un 80% a lo largo de 3 min y permaneció en modo isocrático durante 2 min. A continuación las condiciones iniciales volvieron a un 42% de fase móvil B a lo largo de 1 min y se mantuvo durante 20 min. La detección se realizó mediante absorbancia ultravioleta a 214 nm. El volumen de inyección fue de 10 µL. Se analizaron los cromatogramas basándose en el área del pico frente al área total del pico. El método detecta impurezas relacionadas con la insulina incluidas las formas desamido  
20 de la insulina y se describen como impurezas relacionadas con la insulina.

Se determinó la distribución del tamaño de partículas en volumen de los polvos secados por aspersión utilizando un aparato de difracción láser, Mastersizer (Malvern Instruments, Reino Unido) operado en modo húmedo. El aparato se equipó con un sistema de dispersión húmeda (Unidad de Dispersión de Muestra con un Volumen Pequeño QS de Malvern) en el cual se suspendieron las micropartículas en isopropanol que contenía aproximadamente un 0.05% de  
25 Tween 80. A continuación la muestra se midió y basándose en los datos de dispersión se calculó la distribución del tamaño de partículas utilizando un software de Malvern. El diámetro mediano en volumen  $D[v,0.5]$  es el diámetro donde un 50% de la distribución está por encima y un 50% por debajo.

La distribución del tamaño de partículas aerodinámica de los polvos secados por aspersión se determinó utilizando un espectrómetro Aerodynamic Particle Sizer® (APS) modelo 3321 (TSI incorporado), que es un instrumento para  
30 clasificar por tamaños las partículas basado en láser que mide el diámetro aerodinámico de partículas individuales basándose en las velocidades de las partículas inmediatamente después de una boquilla de aceleración del flujo. Se obtuvo un aerosol a partir de los polvos con un Dispensor de polvo a Pequeña Escala, modelo 3433 (TSI incorporado). A partir de estas medidas, se determinaron las distribuciones del tamaño casi en tiempo real. El diámetro aerodinámico mediano másico (MMAD, por sus siglas en inglés) es el diámetro aerodinámico donde un  
35 50% de la distribución está por encima y un 50% por debajo.

Se determinó el contenido en humedad residual del polvo secado por aspersión según la pérdida al secar a 110 °C durante 3 horas como mínimo utilizando un analizador termogravimétrico Pyris TGA1 de Perkin Elmer. El cambio del peso provocado por la pérdida de humedad se registró y se expresó en porcentaje en peso.

**EJEMPLOS**

**EJEMPLO 1** (no de acuerdo con la reivindicación 1)

5 Disolución de insulina humana a pH 9.5 se dispersaron 10.0 g de insulina humana en 387.3 g de agua enfriada con hielo. Se colocó la dispersión en un baño de hielo y se midió el pH como pH de 5.03. A continuación se añadió hidróxido de sodio 0.2 N enfriado con hielo en porciones hasta un pH de 8.99. Después de 45 minutos, el pH disminuyó hasta 8.77 y a lo largo de las siguientes 4 horas se añadió hidróxido de sodio 0.2 N enfriado con hielo hasta un pH de 8.75. La solución aún no era transparente y se colocó en un frigorífico durante toda la noche.

10 Al día siguiente se midió el pH como 8.75 y la solución todavía no era transparente. Se ajustó el pH hasta 9.48 con hidróxido de sodio 0.2 N enfriado con hielo y a continuación se colocó la solución no transparente en el frigorífico durante los siguientes 5 días.

Después de 5 días, la solución era transparente y se ajustó el pH desde 9.37 hasta 7.59 con cloruro de hidrógeno 0.2 N.

**EJEMPLO 2**

- A) Secado por aspersión de la solución proteica con una base volátil y
- 15 B) Medida del pH de la proteína secada por aspersión.

Se dispersaron 9.5 g de insulina humana en 200 g de agua enfriada con hielo. La suspensión se colocó en un baño de hielo y se midió el pH inicial como pH 5.12. Se ajustó el pH hasta 7.04 con 5.8 g de hidróxido de sodio 0.2 N enfriado con hielo. La solución se mantuvo en el baño de hielo durante otras 2 horas y a continuación se añadió agua desmineralizada hasta un peso total de 240 g.

20 Se procesaron adicionalmente 50 g de la solución con un pH de 7.04. Se ajustó el pH desde 7.04 hasta 7.50 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 N enfriado con hielo y a continuación se colocó en un frigorífico durante toda la noche. Al día siguiente se midió el pH como 7.32 y se ajustó el pH con  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 N enfriado con hielo hasta un pH de 8.06. A continuación se añadió agua hasta 60.0 g. La concentración final de insulina humana fue de aproximadamente 30 mg/mL.

25 Se prepararon micropartículas sólidas y secas en un minisecador por aspersión B-290 Büchi (Büchi, Labortechnik AG Flawil, Suiza) equipado con una boquilla de doble fluido de corriente conjunta de 0.7 mm. Se atomizó la solución de insulina humana en una corriente de aire caliente en una cámara de secado con una tasa de alimentación del líquido de 2 mL/min y un flujo de aire atomizante de 600-800 litros/hora.

El aire de secado tuvo una temperatura de entrada de 150 °C y un caudal de aire de secado de 35 m<sup>3</sup>/hora. La temperatura de salida fue de aproximadamente 70 °C.

30 Se capturaron las micropartículas sólidas mediante un separador ciclónico conectado con la cámara de secado y a continuación se combinaron y se almacenaron en condiciones secas.

La insulina humana secada por aspersión (el pH de la solución proteica fue de 8.06 antes del secado por aspersión) se redisolvió en agua desmineralizada con concentraciones de 40 mg/mL, 80 mg/mL y 160 mg/mL para investigar si las diferentes concentraciones tenían alguna influencia sobre el valor del pH medido:

se añadieron 25.3 mg a 633 µL de agua: se midió el pH como 6.95

se añadieron 43.5 mg a 545 µL de agua: se midió el pH como 6.95

se añadieron 81.7 mg a 510 µL de agua: se midió el pH como 7.01

### **EJEMPLO 3**

- 5 Secado por aspersión de insulina aspart (insulina humana B28<sup>Asp</sup>) disuelta con diversas proporciones de base volátil y no volátil.

Se prepararon diversas soluciones de insulina aspart con y sin excipientes estabilizantes antes del secado por aspersión:

#### Preparación A

- 10 Solución A1: se suspendieron 16 g de insulina aspart en 150 mL de agua en un baño de hielo. A continuación, se añadieron 2.6 mL de amoníaco acuoso concentrado enfriado con hielo (25% p/p) en porciones hasta alcanzar un pH de 7.53 y se obtuvo una solución transparente. Finalmente, se añadió agua hasta un volumen total de 200 mL. La concentración de insulina aspart fue de 80 mg/mL.

- 15 Solución A2: se diluyeron adicionalmente 65 mL de la solución A1 hasta 130 mL. La concentración de insulina aspart fue de 40 mg/mL.

#### Preparación B

- 20 Solución B1: se suspendieron 16 g de insulina aspart en 150 mL de agua en un baño de hielo. Inicialmente, se añadieron en porciones 2.2 mL de NaOH 1 N enfriado con hielo y a continuación 750 µL de amoníaco acuoso concentrado (25% p/p) enfriado con hielo hasta alcanzar un pH de 7.52 y se obtuvo una solución transparente. Finalmente, se añadió agua hasta un volumen total de 200 mL. La concentración de insulina aspart fue de 80 mg/mL.

Solución B2: se diluyeron adicionalmente 65 mL de la solución B1 hasta 130 mL. La concentración de insulina aspart fue de 40 mg/mL.

#### Preparación C

- 25 Solución C1: se suspendieron 16 g de insulina aspart en 150 mL de agua en un baño de hielo. Inicialmente, se añadieron en porciones 4.4 mL de NaOH 1 N enfriado con hielo y a continuación 750 µL de amoníaco acuoso concentrado (25% p/p) enfriado con hielo hasta alcanzar un pH de 7.48 y se obtuvo una solución transparente. Finalmente, se añadió agua hasta un volumen total de 200 mL. La concentración de insulina aspart fue de 80 mg/mL.

- 30 Solución C2: se diluyeron adicionalmente 65 mL de la solución C1 hasta 130 mL. La concentración de insulina aspart fue de 40 mg/mL.

#### Preparación D

Solución D1: se suspendieron 16 g de insulina aspart en 150 mL de agua en un baño de hielo. Inicialmente, se añadieron en porciones 6.6 mL de NaOH 1 N enfriado con hielo y a continuación 370 µL de amoníaco acuoso

concentrado (25% p/p) enfriado con hielo hasta alcanzar un pH de 7.47 y se obtuvo una solución transparente. Finalmente, se añadió agua hasta un volumen total de 200 mL. La concentración de insulina aspart fue de 80 mg/mL.

5 Solución D2: se diluyeron adicionalmente 65 mL de la solución D1 hasta 130 mL. La concentración de insulina aspart fue de 40 mg/mL.

#### Preparación E

10 Solución E1: se suspendieron 16 g de insulina aspart en 150 mL de agua en un baño de hielo. Inicialmente, se añadieron en porciones 6.6 mL de NaOH 1 N enfriado con hielo y a continuación 370 µL de amoníaco acuoso concentrado (25% p/p) enfriado con hielo hasta alcanzar un pH de 7.47 y se obtuvo una solución transparente. Finalmente, se añadió agua hasta un volumen total de 200 mL. La concentración de insulina aspart fue de 80 mg/mL.

Solución E2: se diluyeron adicionalmente 65 mL de la solución E1 hasta 130 mL. La concentración de insulina aspart fue de 40 mg/mL.

#### Preparación F

15 Se suspendieron 1.8 g de insulina aspart en 40 mL de agua en un baño de hielo. Inicialmente, se añadieron en porciones 175 µL de amoníaco acuoso concentrado (25% p/p) enfriado con hielo hasta alcanzar un pH de 7.83.

Se añadieron además a la solución 1.1 mL de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 0.1 M y 3.6 mL de una solución de fenol 0.32 M.

20 Finalmente, el pH se ajustó a 7.99 con 85 µL de amoníaco acuoso diluido (8% p/p) y se añadió agua hasta un volumen total de 60 mL. La solución fue transparente y la concentración de insulina aspart fue de 30 mg/mL.

#### Preparación G

Se suspendieron 1.8 g de insulina aspart en 40 mL de agua en un baño de hielo. Inicialmente, se añadieron en porciones 288 µL de NaOH 1 N enfriado con hielo y a continuación 120 µL de amoníaco acuoso concentrado (25% p/p) enfriado con hielo hasta alcanzar un pH de 7.86.

25 Se añadieron además a la solución 1.1 mL de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 0.1 M y 3.6 mL de una solución de fenol 0.32 M.

Finalmente, el pH se ajustó a 8.03 con 80 µL de amoníaco acuoso diluido (8% p/p) y se añadió agua hasta un volumen total de 60 mL. La solución fue transparente y la concentración de insulina aspart fue de 30 mg/mL.

#### Preparación H

30 Se suspendieron 1.8 g de insulina aspart en 40 mL de agua en un baño de hielo. Inicialmente, se añadieron en porciones 864 µL de NaOH 1 N enfriado con hielo y a continuación 50 µL de amoníaco acuoso concentrado (25% p/p) enfriado con hielo hasta alcanzar un pH de 7.85.

Se añadieron además a la solución 1.1 mL de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 0.1 M y 3.6 mL de una solución de fenol 0.32 M.

Finalmente, el pH se ajustó a 7.98 con 60 µL de amoníaco acuoso diluido (8% p/p) y se añadió agua hasta un volumen total de 60 mL. La solución fue transparente y la concentración de insulina aspart fue de 30 mg/mL.

#### Preparación I

5 Se suspendieron 1.8 g de insulina aspart en 40 mL de agua en un baño de hielo. Inicialmente, se añadieron en porciones 150 µL de amoníaco acuoso concentrado (25% p/p) enfriado con hielo hasta alcanzar un pH de 7.99.

Se añadieron además a la solución 4.6 mL de una solución de glicilglicina 0.25 M, 1.1 mL de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 0.1 M y 3.6 mL de una solución de fenol 0.32 M.

Finalmente, el pH se ajustó a 7.98 con 245 µL de amoníaco acuoso diluido (8% p/p) y se añadió agua hasta un volumen total de 60 mL. La solución fue transparente y la concentración de insulina aspart fue de 30 mg/mL.

#### 10 Preparación J

Se suspendieron 1.8 g de insulina aspart en 40 mL de agua en un baño de hielo. Inicialmente, se añadieron en porciones 288 µL de NaOH 1 N enfriado con hielo y a continuación 125 µL de amoníaco acuoso concentrado (25% p/p) enfriado con hielo hasta alcanzar un pH de 8.18.

15 Se añadieron además a la solución 4.6 mL de una solución de glicilglicina 0.25 M, 1.1 mL de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 0.1 M y 3.6 mL de una solución de fenol 0.32 M.

Finalmente, el pH se ajustó a 7.98 con 125 µL de amoníaco acuoso diluido (8% p/p) y se añadió agua hasta un volumen total de 60 mL. La solución fue transparente y la concentración de insulina aspart fue de 30 mg/mL.

#### Preparación K

20 Se suspendieron 1.8 g de insulina aspart en 40 mL de agua en un baño de hielo. Inicialmente, se añadieron en porciones 288 µL de NaOH 1 N enfriado con hielo y a continuación 125 µL de amoníaco acuoso concentrado (25% p/p) enfriado con hielo hasta alcanzar un pH de 7.93.

Se añadieron además a la solución 1.1 mL de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 0.1 M y 1.9 mL de una solución de fenol 0.32 M.

25 Finalmente, el pH se ajustó a 7.98 con 40 µL de amoníaco acuoso diluido (8% p/p) y se añadió agua hasta un volumen total de 60 mL. La solución fue transparente y la concentración de insulina aspart fue de 30 mg/mL.

30 Se prepararon micropartículas sólidas y secas en un minisecador por aspersión B-290 Büchi (Büchi, Labortechnik AG Flawil, Suiza) equipado con una boquilla de doble fluido de corriente conjunta de 0.7 mm. Se atomizó la alimentación líquida (preparación A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2, E1, E2, F, G, H, I, J y K) en una corriente de aire caliente en una cámara de secado con una tasa de alimentación del líquido de 2 mL/min y un flujo de aire atomizante de 600-800 litros/hora.

El aire de secado tuvo una temperatura de entrada de 150 °C y un caudal de aire de secado de 35 m<sup>3</sup>/hora. La temperatura de salida varió entre 41 y 61 °C.

Se capturaron las micropartículas sólidas mediante un separador ciclónico conectado con la cámara de secado y a continuación se combinaron y se almacenaron en condiciones secas.

Se estudió la inestabilidad química de la insulina mediante un análisis de HPLC tal y como se describe en Hvass, 2003 (A. Hvass, M. Hach y M.U. Jars. Complementary analytical HPLC methods for insulin-related degradation products. American Biotechnology Laboratory 21(2): 8-12, 2003) tras el almacenamiento durante 1 mes a 40 °C. Se analizaron los dímeros con enlace covalente y los polímeros de elevado peso molecular (HMWP, por sus siglas en inglés) mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SE, por sus siglas en inglés). Se utilizó la cromatografía en fase inversa (RP, por sus siglas en inglés) (pH 3.6) con una elución en gradiente para la separación de los productos de degradación (formas desamido de la insulina y otras impurezas relacionadas con la insulina).

Se determinó el contenido en humedad de las micropartículas secas según la pérdida al secar a 110 °C durante 3 horas como mínimo utilizando un analizador termogravimétrico Pyris TGA1 de Perkin Elmer. El cambio del peso provocado por la pérdida de humedad se registró y se expresó en porcentaje en peso.

Se utilizó un espectrómetro Aerodynamic Particle Sizer® (APS) para determinar la distribución del tamaño de partículas (diámetro aerodinámico mediano másico).

Se midió el pH de la insulina secada por aspersión disolviendo los polvos secados por aspersión en agua desmineralizada hasta una concentración de aproximadamente 40 mg/mL y midiendo el pH con un potenciómetro (Radiometer, Dinamarca).

Los resultados de la caracterización de las preparaciones A-K secadas por aspersión se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Polvos de insulina aspart secada por aspersión

ID de la preparación	Humedad (%)	pH de la solución	pH de la insulina secada por aspersión	MMAD <sup>A)</sup> (µm)	Impurezas relacionadas con la insulina aspart <sup>B)</sup> (%)	HMWP <sup>C)</sup> (%)
A1	5.6	7.5	5.35	2.7	1.1	0.43
A2	6.6	7.5	6.03	3.3	1.4	0.45
B1	6.3	7.5	6.04	3.0	1.1	2.17
B2	7.0	7.5	6.17	4.8	1.3	0.75
C1	6.7	7.5	6.27	3.3	0.8	0.63
C2	7.1	7.5	6.44	4.0	1.4	0.67
D1	5.9	7.5	6.66	3.3	0.3	0.26
D2	5.8	7.5	6.89	3.9	1.0	2.87
E1	6.6	7.5	7.43	3.2	0.4	0.22
E2	5.2	7.5	7.43	3.9	0.7	0.31
F	6.9	8.0	4.91	2.6	2.0	0.35

## ES 2 563 038 T3

G	9.3	8.0	5.16	2.6	1.9	0.51
H	9.6	8.0	6.33	2.8	1.4	0.35
I	7.2	8.0	5.04	2.7	2.3	0.30
J	8.2	8.0	5.79	2.8	1.9	0.24
K	8.9	8.0	5.37	2.7	1.8	0.47

---

A) MMAD es el diámetro aerodinámico mediano másico determinado por APS

B) Impurezas relacionadas con la insulina aspart formadas tras el almacenamiento durante 1 mes a 40 °C, medidas por RP-HPLC (incluidas las formas desamido y de otro tipo de degradación de la insulina aspart)

C) Polímeros de peso molecular elevado formados tras el almacenamiento durante 1 mes a 40 °C, medidos por SE-HPLC

---

### **EJEMPLO 4** (no de acuerdo con la reivindicación 1)

5 Secado por aspersión de insulina aspart se dispersaron 361.8 g de insulina aspart en 4.5 litros de agua desmineralizada enfriada con hielo. Se ajustó el pH a 7.68 con NaOH 0.2 enfriada con hielo. Se añadió agua hasta 9 litros. La concentración final de insulina aspart fue de 37 g/L. Se filtró la solución a través de un filtro estéril (0.2 µm) antes de secar por aspersión.

El secado por aspersión de la solución de insulina aspart se realizó en un secador por aspersión a escala piloto (modelo Mobile Mino, Niro, Dinamarca) con una boquilla de doble fluido con un diámetro de orificio de 1.0 mm. Se utilizó nitrógeno tanto como gas de secado como gas de atomización.

10 Las temperaturas de entrada y de salida fueron de 110 y 62 °C respectivamente. El flujo de alimentación fue de aproximadamente 1 kg/h y la relación de gas/alimentación fue de aproximadamente 11.

El secador por aspersión se equipó con filtros de bolsa y separador ciclónico. El polvo se recogió simultáneamente a partir de los filtros de bolsa y separador ciclónico durante el secado por aspersión.

15 Se analizó la distribución del tamaño de partículas tanto por difracción láser (Mastersizer, Malvern) como por espectroscopía aerodinámica de clasificación por tamaño de partículas (APS, por sus siglas en inglés). Se estudió la integridad química de la insulina aspart secada por aspersión tras un almacenamiento de 1 mes a 40 °C mediante SE o RP-HPLC tal y como se describe en el ejemplo 2.

	Fracción ciclónica	Fracción del filtro de bolsa
D <sub>50</sub> <sup>A)</sup> (µm)	4.2	2.5
MMAD <sup>B)</sup> (µm)	3.5	2.1
Rendimiento (%)	78	23
HMWP formado por mes a 40 °C (%)	0.2	0.4
Impurezas relacionadas con la insulina formadas por mes a 40 °C (%)	0.8	1.3
A) D50 es el diámetro mediano en volumen determinado por difracción láser		
B) MMAD es el diámetro aerodinámico mediano másico determinado por APS		

**EJEMPLO 5** (no de acuerdo con la reivindicación 1)

Estabilidad en el almacenamiento de polvos secos de insulina aspart liofilizada con diversos valores de pH se dispersaron 0.806 g de insulina aspart en 10 mL de agua enfriada con hielo. Se colocó la suspensión en un baño de hielo y se midió el pH inicial como pH 4.58. Se ajustó el pH a 7.39 con hidróxido de sodio 0.2 N enfriado con hielo, para solubilizar de esta manera la insulina aspart. Se añadió agua desmineralizada hasta un peso total de 20.4 g.

Se dividió la insulina aspart solubilizada en 6 alícuotas de 2.5 mL, que se ajustaron a un pH de 7.0, 7.7, 8.0, 8.5, 9.0 y 9.5 respectivamente. Se añadió agua desmineralizada hasta un peso total de 3.06 g.

Las soluciones de insulina aspart se liofilizaron en un aparato Christ Alpha 2-4 LSC (Christ Alpha, Alemania) en alícuotas de 0.9 mL en viales de vidrio utilizando un programa de liofilización estándar.

Se midió el pH de los polvos de insulina aspart liofilizada añadiendo 0.5 mL de agua desmineralizada a aproximadamente 33 mg de polvo de insulina aspart y a continuación se midió el pH con un potenciómetro equipado con un electrodo de pH después de 15 minutos.

Se estudió la integridad química de la insulina aspart secada por aspersion tras un almacenamiento seco (por encima de gel de sílice) durante 2 semanas a 40 °C respecto a los controles a -18 °C mediante SE-HPLC tal y como se describe en el ejemplo 2.

Tabla 3. Polvos de insulina aspart liofilizada

pH de la solución	pH de la insulina liofilizada	HMWP <sup>A)</sup> (%)
7.0	6.69	0.20
7.7	7.58	0.17
8.0	7.83	0.11
8.5	8.42	0.07

9.0	8.81	0.10
9.5	9.27	0.10

A) Dímeros y polímeros de peso molecular elevado formados tras su almacenamiento durante 2 semanas a 40 °C, medido por SE-HPLC

**EJEMPLO 6** (no de acuerdo con la reivindicación 1)

5 Estabilidad en el almacenamiento de polvos secos de insulina aspart secada por aspersion con diversos valores de pH se dispersaron 20.6 g de insulina aspart en 300 mL de agua enfriada con hielo. Se colocó la suspensión en un baño de hielo y se midió el pH inicial como pH 4.63. Se ajustó el pH a 7.50 con 100 mL de hidróxido de sodio 0.1 N enfriado con hielo, para solubilizar de esta manera la insulina aspart.

Se dividió la insulina aspart solubilizada en 6 alícuotas de 65 g, que se ajustaron a un pH de 7.0, 7.7, 8.0, 8.5, 9.0 y 9.5 respectivamente con NaOH 0.1 N enfriada con hielo. Se añadió agua desmineralizada en cada alícuota hasta un peso total de 80.0 g. La concentración de insulina aspart fue de aproximadamente 38 mg/mL.

10 Se prepararon micropartículas sólidas y secas en un minisecador por aspersion B-290 Büchi (Büchi, Labortechnik AG Flawil, Suiza) equipado con una boquilla de doble fluido de corriente conjunta de 0.7 mm. Se atomizó la alimentación líquida (80 mL) en una corriente de aire caliente en una cámara de secado con una tasa de alimentación del líquido de 2 mL/min y un flujo de aire atomizante de 600-800 litros/hora.

15 El aire de secado tuvo una temperatura de entrada de 150 °C y un caudal de aire de secado de 35 m<sup>3</sup>/hora. La temperatura de salida varió entre 49 y 61 °C. Se capturaron las micropartículas sólidas mediante un separador ciclónico conectado con la cámara de secado y a continuación se combinaron y se almacenaron en condiciones secas.

20 Se midió el pH de la insulina aspart secada por aspersion disolviendo los polvos secados por aspersion en agua desmineralizada hasta una concentración de 70-80 mg/mL y midiendo el pH con un potenciómetro (Radiometer, Dinamarca).

Se estudió la integridad química de la insulina aspart secada por aspersion tras un almacenamiento seco (por encima de gel de sílice) durante 4 semanas a 40 °C respecto a los controles a -18 °C mediante SE-HPLC y RP-HPCL tal y como se describe en el ejemplo 2.

Tabla 3. Estabilidad de los polvos de insulina aspart secada por aspersion

pH de la solución	pH de la insulina aspart secada por aspersion	HMWP <sup>A)</sup> (%)	Pureza <sup>B)</sup> (%)
7.5	7.28	0.28	98.2
7.7	7.54	0.26	98.3
8.0	7.82	0.22	98.3
8.5	8.26	0.19	98.4



solución de hidróxido de amonio 2 N y una solución de hidróxido de sodio 1 N. Y finalmente, se ajustaron 2.25 mL de la solución a un pH de 12.6 con una solución de hidróxido amonio 2 N y una solución de hidróxido de sodio 1 N.

Las cuatro soluciones con el pH ajustado se mantuvieron en el frigorífico a 3-8 °C durante 24 horas tras las cuales se ajustaron las cuatro soluciones a un pH neutro con ácido clorhídrico 1 N con el fin de detener la degradación química.

5

Se estudió la inestabilidad química de la insulina en las soluciones neutralizadas mediante un análisis por HPLC de fase inversa y exclusión por tamaño tal y como se describe en el ejemplo 2.

Tabla 4. Estabilidad química de las soluciones de insulina aspart con diversos valores de pH

pH de la solución	HMWP <sup>A)</sup> (%)	Pureza <sup>B)</sup> (%)
7.6	0.0	97.2
10.0	0.5	97.8
11.0	1.8	92.2
12.0	49.8	7.8
12.6	39.5	2.3

A) Dímeros y polímeros con un peso molecular elevado formados tras el almacenamiento durante 24 horas a 3-8 °C, medidos por HPLC-SE

B) Pureza de la insulina aspart tras el almacenamiento durante 24 horas a 3-8 °C, medida por RP-HPLC

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para secar una solución proteica que comprende:
  - a) Seleccionar un pH objetivo de la proteína seca, donde el pH objetivo está entre 6.0 y 8.5
  - 5 b) Seleccionar un pH objetivo para la solución proteica, donde el pH objetivo está entre 7.4 y 11.0
  - c) Proporcionar una fase acuosa,
  - d) Añadir una proteína,
  - e) Opcionalmente, añadir excipientes,
  - 10 f) Ajustar el pH con una base no volátil y, opcionalmente, un ácido no volátil hasta el pH objetivo de la proteína seca, donde la base tiene una presión de vapor por debajo de 65 Pa a temperatura ambiente y donde el ácido tiene una presión de vapor por debajo de 65 Pa a temperatura ambiente,
  - 15 g) Ajustar el pH con una base volátil hasta el pH objetivo de la solución proteica que se va a secar, donde la base tiene una presión de vapor por encima de 65 Pa a temperatura ambiente o donde la base es una mezcla azeotrópica acuosa que incluye una base que tiene una presión de vapor por encima de 65 Pa a temperatura ambiente y
  - h) Secar por aspersión, liofilizar por aspersión o liofilizar la solución proteica, donde los pasos d, e, f y g se pueden llevar a cabo en cualquier orden mientras se agita de manera continua, donde la proteína se selecciona a partir del grupo constituido por insulina, análogos de insulina, derivados de insulina, GLP-1, análogos de GLP-1 y derivados de GLP-1, glucagón y/o cualquier combinación de estos.
- 20 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la solución proteica se obtiene a una temperatura por debajo de 8 °C.
3. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, donde la base volátil ajusta el pH de la solución proteica con al menos 0.5 unidades de pH.
4. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, donde la solución proteica comprende un tampón, un detergente, un estabilizante, un inhibidor de proteasa, un sabor, un portador, un agente espesante o un agente para mejorar las propiedades de fluidez o un potenciador de la penetración o una combinación de estos.
- 25 5. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, donde la solución proteica comprende glicilglicina y/o fenol.
6. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, donde la solución proteica comprende 4 moles de fenol por mol de proteína.
- 30 7. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, donde el pH de la solución proteica está por encima del pH de la proteína seca.