(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 569 949**

(51) Int. Cl.:

C07K 1/36	(2006.01)	***C07K 14/62***	(2006.01)
C07D 241/08	(2006.01)	***A61K 9/00***	(2006.01)
A61K 38/09	(2006.01)	***A61K 9/16***	(2006.01)
A61K 38/23	(2006.01)	***A61K 9/14***	(2006.01)
A61K 38/26	(2006.01)	***A61K 47/22***	(2006.01)
A61K 38/29	(2006.01)	***A61K 47/48***	(2006.01)
A61K 38/31	(2006.01)	***B82Y 5/00***	(2011.01)
A61K 38/28	(2006.01)	***C07K 1/32***	(2006.01)
C07K 1/30	(2006.01)		
C07K 14/605	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2000** **E 10075474 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016** **EP 2280020**

(54) Título: **Formulaciones farmacéuticas que comprenden un péptido complejado con una dicetopiperazina**

(30) Prioridad:

29.06.1999 US 141433 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.05.2016

(73) Titular/es:

MANNKIND CORPORATION (100.0%)
25134 Rye Canyon Loop, Suite 300
Valencia, CA 91355, US

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 569 949 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

Formulaciones farmacéuticas que comprenden un péptido complejado con una dicetopiperazina

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

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

La insulina, un polipéptido con un peso molecular nominal de 6,000 Dalton, se ha producido tradicionalmente procesando páncreas de cerdo y vaca para aislar el producto natural. Más recientemente, sin embargo, se ha usado tecnología recombinante para producir insulina humana *in vitro*. La insulina humana natural y recombinante en solución acuosa está en una configuración hexamérica, esto es, seis moléculas de insulina recombinante se asocian de manera no covalente en un complejo hexamérico cuando se disuelve en agua en presencia de iones de cinc. La insulina hexamérica no se absorbe rápidamente. Para que la insulina humana se absorba dentro de la circulación del paciente, la forma hexamérica debe primero asociarse en formas diméricas y/o monoméricas antes de que la sustancia pueda moverse dentro del torrente sanguíneo. El retraso en la absorción requiere que la insulina humana recombinante se administre aproximadamente media hora antes de la hora de la comida con el fin de producir el nivel terapéutico de insulina en sangre, lo que puede ser laborioso para los pacientes, que tienen que anticipar con precisión las horas a las que comerán. Para superar este retraso, se han desarrollado análogos de la insulina recombinante humana, tales como HUMALOG™, que se disocian rápidamente en una forma virtualmente monomérica totalmente tras administración subcutánea. Los estudios clínicos han demostrado que HUMALOG™ se absorbe cuantitativamente más rápido que la insulina humana recombinante tras administración subcutánea. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nº 5.547.929 de Anderson Jr., et al.

En un esfuerzo de evitar las desventajas asociadas con la administración por inyección y para acelerar la absorción, se ha desarrollado la administración de análogos monoméricos de insulina por vía pulmonar. Por ejemplo, la Patente

de los Estados Unidos Nº 5.888.477 de Gonda, et al. divulga hacer que un paciente inhale una formulación de insulina monomérica en aerosol para depositar partículas de insulina en el tejido pulmonar del paciente. Sin embargo, la formulación monomérica es inestable y pierde actividad rápidamente, mientras que la velocidad de captación permanece inalterada.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición para su uso en la administración pulmonar de un péptido a un paciente, que comprende un péptido complejado a una dicetopiperazina, en la que el péptido se recubre sobre micropartículas de la dicetopiperazina. Para ponerlo de otra forma, la presente invención proporciona el uso de un péptido complejado a una dicetopiperazina en la fabricación de un medicamento para la administración pulmonar del péptido a un paciente, en el que el péptido se recubre sobre micropartículas de la dicetopiperazina.

La dicetopiperazina puede ser, por ejemplo, 2,5-diceto-3,6-di(4-X-aminobutil)piperazina, en la que X representa un grupo succinilo, glutarilo, maleílo o fumarilo, más preferentemente 2,5-diceto-3,6-di(4-fumaril-aminobutil)piperazina.

El péptido puede seleccionarse, por ejemplo, entre insulina, glucagón, calcitonina de salmón, hormona paratiroidea 1-34, octreotida, leuprolida o péptido RSV.

En una realización preferida, la composición comprende insulina y dispensa la insulina liberando insulina monomérica o dimérica tras la administración.

En otra realización preferida, la composición comprende insulina y la composición es para el tratamiento de la diabetes.

En otra realización preferida, la composición comprende insulina y la composición es para el tratamiento de la diabetes tipo II.

En el presente documento se proporcionan métodos para purificar péptidos y proteínas incorporando el péptido o proteína en una dicetopiperazina o un agente de complejación competitivo para facilitar la retirada de una o más impurezas, es decir, componentes no deseados, del péptido o proteína. En una realización preferida, un péptido, tal como insulina que contiene una o más impurezas, por ejemplo, iones de cinc, se atrapa en dicetopiperazina para formar un precipitado de péptido/dicetopiperazina/impureza, que después se lava con un disolvente para eliminar la impureza, que es una sustancia no disolvente para la dicetopiperazina y una sustancia no disolvente para el péptido. Como alternativa, la impureza puede eliminarse usando agentes complejantes para que formen complejos de manera selectiva con y desplacen a las impurezas, por ejemplo, mediante diálisis.

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

La presente invención proporciona una composición para su uso en una administración pulmonar de un péptido a un paciente, que comprende un péptido complejado a una dicetopiperazina, en la que el péptido se recubre sobre micropartículas de la dicetopiperazina. En una realización preferida, la insulina se administra mediante dispensación pulmonar de micropartículas que comprenden dicetopiperazina de fumarilo e insulina en su forma biológicamente activa. La carga sobre la molécula de insulina se enmascara mediante el hidrógeno uniéndola a la dicetopiperazina, permitiendo así a la insulina pasar a través de la membrana diana. Este método de dispensar insulina da como resultado un rápido aumento de la concentración de insulina en sangre que es comparable con el incremento resultante de administración intravenosa.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a es un gráfico de valores medios de glucosa en sangre con el tiempo (minutos).
La Figura 1b es un gráfico de concentraciones medias de péptido C durante experimentos que comparan niveles de péptido C (ng/ml) con el tiempo (minutos) cuando se administró insulina por vía intravenosa, subcutánea, y por inhalación.
La Figura 2a es un gráfico de velocidad de infusión de glucosa (mg/kg/min) con el tiempo (minutos) que compara insulina administrada por vía intravenosa, subcutánea y por inhalación.
La Figura 2b es un gráfico de concentraciones medias de insulina (μU/ml) con el tiempo (minutos) que compara la insulina administrada por vía intravenosa, subcutánea y por inhalación.

Descripción Detallada de la Invención

Tal como se describe en el presente documento, la encapsulación o atrapamiento de polímeros grandes, tales como proteínas y péptidos, en dicetopiperazinas puede usarse para eliminar impurezas o contaminantes tales como iones metálicos u otras moléculas pequeñas. La presente invención se basa en la formación de un complejo entre un péptido y la dicetopiperazina, formando de este modo un recubrimiento del péptido en las micropartículas de dicetopiperazina. Las dicetopiperazinas también sirven tanto para estabilizar como para mejorar la dispensación del péptido complejado. También se han desarrollado formulaciones para el transporte mejorado de agentes activos de péptidos a través de membranas biológicas. Estas formulaciones incluyen micropartículas formadas de una dicetopiperazina y un péptido recubierto sobre ellas, cuyo péptido puede ser cargado o neutro. La dicetopiperazina puede enmascarar la carga del péptido y/o puede formar enlaces de hidrógeno con la membrana. Las formulaciones pueden proporcionar aumentos rápidos de la concentración del péptido en sangre tras la administración de las formulaciones.

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

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

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

administración pulmonar.

I. Materiales

A. Agente a administrar

De acuerdo con la divulgación de la presente solicitud, el agente a administrar se cita en el presente documento como el agente activo, o molécula a encapsular o atrapar. Para los fines de la invención reivindicada en el presente documento, es un péptido, que se atrapa recubriendo el péptido sobre micropartículas de dicetopiperazina. El péptido por lo tanto está complejado a la dicetopiperazina. El péptido o proteína puede ser o no una especie cargada. Los ejemplos de clases de péptidos adecuados para el uso en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento incluyen péptidos terapéuticos, profilácticos y diagnósticos, así como suplementos dietéticos.

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

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

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

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

Las impurezas que pueden eliminarse de los péptidos incluyen iones de metal, tales como cinc, y otros iones di- o multivalentes, y moléculas pequeñas inorgánicas y restos de disolventes.

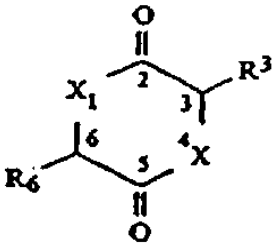
B. Dicetopiperazinas

Se describen dicetopiperazinas y métodos útiles en las presentes composiciones, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nº 6.071.497.

(i): Fórmula general

Las dicetopiperazinas son anillos rígidos planos con al menos seis átomos de anillo conteniendo heteroátomos y pares de electrones sin enlazar. También se divulgan dicetomorfolino y dicetodioxano, respectivamente. Aunque es posible sustituir un nitrógeno con un átomo de azufre, esto no produce una estructura estable.

La fórmula general para dicetopiperazina y sus análogos se muestra a continuación.



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

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

Los ejemplos de cadenas laterales básicas incluyen, pero no están limitadas a, -anilina, -fenil-C(NH)NH_2, -fenil-C(NH)NH (alquilo), -fenil-C(NH)N(alquilo)$_2$ y -$(CH_2)_4$NHC(O)CH(NH_2)CH(NH_2)CO_2H.

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

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

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

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

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

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

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

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

Dicetopiperazina de fumarilo es la más preferida para aplicaciones pulmonares.

<u>(ii). Síntesis</u>

Las dicetopiperazinas pueden formarse por ciclodimerización de derivados de éster de aminoácido, como se describe por Katchalski, et al., J. Amer. Chem. Soc. 68:879-80 (1946), por ciclación de derivados de éster dipéptido, o por deshidratación térmica de derivados de aminoácidos en disolventes de elevado punto de ebullición, como se describe por Kopple, et al., J. Org. Chem. 33(2):862-64 (1968). La 2,5-diceto-3,6-di(aminobutil)piperazina (Katchalski et al. se refieren a esto como anhídrido de lisina) se preparó por ciclodimerización de N-épsilon-P-L-lisina en fenol líquido, similar al método de Kopple en J. Org. Chem., seguido de la eliminación de los grupos bloqueantes (P) con HBr 4,3 M en ácido acético. Se prefiere esta ruta porque usa un material de partida comercialmente disponible, implica condiciones de reacción que se informa que conservan la estereoquímica de los materiales de partida en el producto y todas las etapas pueden escalarse fácilmente para la fabricación.

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

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

(a) Síntesis de Derivados

Simétricos de Dicetopiperazina

Los derivados de dicetopiperazina son simétricos cuando ambas cadenas laterales son idénticas. Las cadenas laterales pueden contener grupos acídicos, grupos básicos, o combinaciones de los mismos.

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

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

(b) Síntesis de Derivados

Asimétricos de Dicetopiperazina

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

Los Derivados de dicetopiperazina con cadenas laterales acídicas protegidas, tales como ciclo-Lys(P)Lys(P), en los que P es un grupo benciloxicarbonilo, u otro grupo protector conocido por los expertos en la técnica, pueden desprotegerse selectivamente. Los grupos protectores pueden escindirse selectivamente utilizando reactivos limitadores, tales como HBr en el caso del grupo benciloxicarbonilo, o iones fluoruro en el caso de grupos protectores de silicio, y utilizando intervalos de tiempo controlados. De este modo, pueden obtenerse mezclas de reacción que contienen derivados desprotegidos, monoprotegidos y diprotegidos de dicetopiperazina. Estos compuestos tienen diferentes solubilidades en diversos disolventes e intervalos de pH, y pueden separarse por precipitación y extracción selectiva. Un disolvente apropiado, por ejemplo, éter, puede añadirse a dichas mezclas de reacción para precipitar todas estas sustancias juntas. Esto puede detener la reacción de desprotección antes de que se complete por eliminación de las dicetopiperazinas de los reactantes utilizados para desproteger los grupos protectores. Al agitar el precipitado mezclado con agua, las especies reaccionadas parcialmente y completamente pueden disolverse como sales en el medio acuoso. Puede eliminarse la sustancia inicial no reaccionada por centrifugación o filtración. Ajustando el pH de la solución acuosa a una condición débilmente alcalina, el producto monoprotegido asimétrico que contiene un grupo protector único precipita de la solución, dejando en solución la sustancia completamente desprotegida.

En el caso de derivados de dicetopiperazina con cadenas laterales básicas, también pueden desprotegerse de manera selectiva los grupos básicos Como se describe anteriormente, puede detenerse la etapa de desprotección antes de que se complete, por ejemplo, añadiendo un disolvente adecuado a la reacción. Ajustando cuidadosamente el pH de la solución, puede eliminarse el derivado desprotegido por filtración, dejando en solución los derivados parcial y totalmente desprotegidos. Ajustando el pH de la solución a una condición ligeramente acídica, el derivado monoprotegido se precipita fuera de la solución y puede aislarse.

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

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

Se hace reaccionar la dicetopiperazina monoprotegida para producir una dicetopiperazina con una cadena lateral y grupo protector. La eliminación de grupos protectores y el acoplamiento con otras cadenas laterales da dicetopiperazinas asimétricamente sustituidas con una mezcla de cadenas laterales acídicas, básicas y zwitteriónicas.

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

C. Potenciadores del Transporte

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

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

Un potenciador del transporte preferido es dicetopiperazina de fumarilo. Anteriormente se describen otras dicetopiperazinas que pueden ser útiles como potenciadoras de transporte.

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

II. Métodos

A. Encapsulación

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

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

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

Las micropartículas pueden almacenarse en estado seco y suspenderse para su administración a un paciente. En la opción (a) las micropartículas reconstituidas mantienen su estabilidad en un medio acídico y se disocian a medida que el medio se aproxima al pH fisiológico en el intervalo entre 6 y 14. En la opción de realización (b) las micropartículas suspendidas mantienen su estabilidad en un medio básico y se disocian a un pH entre 0 y 6. En la opción (c), las micropartículas reconstituidas mantienen su estabilidad en un medio acídico o básico y se disocian a medida que el medio se aproxima al pH fisiológico en el intervalo entre 6 y 8.

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

B. Atrapamiento /Complejación

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

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

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

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

C Administración

Las composiciones de péptido recubierto sobre micropartículas de dicetopiperazina preformadas como se describe en el presente documento son para usar en administración pulmonar a pacientes. Las composiciones se administran preferiblemente en forma de micropartículas, que pueden estar en forma de un polvo seco para administración pulmonar o suspendidas en un vehículo farmacéutico apropiado, tal como solución salina.

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

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

En una realización preferida, la insulina hexamérica se atrapa en dicetopiperazina de fumarilo para formar un precipitado sólido de insulina monomérica en la dicetopiperazina, que se lava entonces con solución acuosa para eliminar el cinc libre. Esta formulación demuestra absorción en sangre tras la administración pulmonar a una velocidad de 2,5 veces la velocidad de absorción de insulina tras inyección subcutánea, con niveles máximos en sangre que ocurren entre 7,5 y 10 minutos tras la administración.

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

El intervalo preferido es de 0,1 % a 50 % de carga en peso de fármaco. Puede determinarse la dosificación apropiada, por ejemplo, por la cantidad del péptido complejada/atrapada, la velocidad de su liberación de las micropartículas, y, en una realización preferida, el nivel de glucosa en sangre del paciente.

Una aplicación preferida está en el tratamiento de la hiperinsulinemia. En una realización preferida, el péptido es glucagón. El glucagón es un péptido extremadamente inestable, pero puede estabilizarse en complejación a partículas de dicetopiperazina, por ejemplo. Las composiciones y métodos descritos en el presente documento se describen adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

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

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

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

Ejemplo 2: Biodisponibilidad de insulina en la formulación pulmonar de dicetopiperazina

Sujetos y Métodos

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

Se realizó el estudio con 5 voluntarios masculinos sanos. Los criterios de inclusión eran buena salud, como se juzgó por examen físico, edad: 18 a 40 años, índice de masa corporal: 18 a 26 kg/m^2, capacidad de alcanzar máximo flujo

respiratorio de 4 l/seg medido por espirometría asistidita por ordenador y un PEV_1 igual o mayor a 80% del normal previsto (FEV_1 = volumen espiratorio forzado en un segundo). Los criterios de exclusión fueron Diabetes Mellitus tipo 1 o 2, prevalencia de anticuerpos de insulina humana, historial de hipersensibilidad a la medicación de estudio o a fármacos con estructuras químicas similares, historial de alergias graves o múltiples, tratamiento con cualquier otro fármaco de investigación en los últimos 3 meses antes de la entrada del estudio, enfermedad fatal progresiva, historial de abuso de fármacos o alcohol, terapia actual con otros fármacos, historial significativo de enfermedad cardiovascular, respiratoria, gastrointestinal, hepática, renal, neurológica, psiquiátrica y/o hematológica, infección en curso del tracto respiratorio o sujetos definidos como fumadores con evidencia o historial de uso de tabaco o nicotina.

Realización del Estudio

En la mañana de los días de estudio, los sujetos venían al hospital (en ayunas, excepto por agua, desde la medianoche en adelante) a las 7:30. Se les restringían a los sujetos excesivas actividades físicas y una ingesta de alcohol durante 24 horas antes de cada día de tratamiento. Se les asignaba al azar una de las tres ramas del tratamiento. Los sujetos recibieron una infusión regular constante intravenosa de insulina humana, la cual se mantenía en 0,15 mU min^{-1} kg^{-1} de modo que se establecieron concentraciones de insulina en suero en 10-15 U/ml durante un periodo de 2 horas antes del momento 0. Se continuaba esta infusión de baja dosis durante el ensayo para suprimir la secreción endógena de insulina. Se mantuvo constante la glucosa en sangre a un nivel de 90 mg/dl en el pinza de glucosa por un sistema de infusión controlada de glucosa (BIOSTATOR™). El algoritmo de pinza de glucosa se basaba en la concentración real medida de glucosa en sangre y el grado de variabilidad en los minutos antes de calcular las velocidades de infusión de glucosa para mantener la concentración constante de glucosa en sangre. La aplicación de insulina (5 U i.v. o 10 U s.c. inyección o tres inhalaciones respiratorias profundas por cápsula (2 capsulas con 50 U cada una) aplicada con un dispositivo comercial de inhalación (Boehringer Ingelheim)) tenía que ser finalizada inmediatamente antes del momento 0. La duración del experimento de pinza fue de 6 horas a partir del momento 0. Se midieron las velocidades de infusión de glucosa, glucosa en sangre, insulina de suero y péptido-C.

Bioeficacia y Biodisponibilidad

Para determinar la bioeficacia, se calcularon las áreas bajo la curva de los índices de infusión de glucosa durante las primeras 3 horas (ABC_{0-180}) tras la administración y durante el periodo total de observación de seis horas tras la administración (ABC_{0-360}) y se correlacionaron con la cantidad de insulina aplicada. Para determinar la biodisponibilidad, se calcularon las áreas bajo la curva de concentraciones de insulina durante las primeras 3 horas (ABC_{0-180}) tras la administración y durante el periodo total de observación de seis horas tras la administración (ABC_{0-360}) y se correlacionaron con la cantidad de insulina aplicada.

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

Resultados

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

Resultados de Eficacia

La inhalación de 100 U of TECHNOSPHERE™/Insulina (inhalación de 100 U) reveló un pico de concentración de insulina después de 13 min (intravenoso (i.v.) (5U): 5 min, subcutáneo (s.c.) (10 U): 121 min) y un regreso de los niveles de insulina a los iniciales después de 180 min (i.v.: 60 min, s.c. 360 min). La acción biológica medida por velocidad de infusión de glucosa se maximizó tras 39 min (i.v. 14 min, s.c.: 163 min) y se mantuvo durante más de 360 min (i.v.: 240 min, s.c.: > 360 min). La biodisponibilidad absoluta (comparación con la aplicación i.v.) fue 14,6±5,1% durante las primeras 3 horas y 15,5±5,6% durante las primeras 6 horas. La biodisponibilidad relativa (comparación con la aplicación s.c.) era de 25,8±11.7% durante las primeras 3 horas y 16,4±7,9% durante las primera 6 horas.

Tabla 1: Parámetros Farmacocinéticos

Parámetros Calculados sobre Velocidad de Infusión de Glucosa	Administración Intravenosa	Inhalado	Administración Subcutánea
T50%*	9 min	13 min	60 min

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

Resultados de Seguridad

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

Conclusiones

Se toleró bien la inhalación de 100 U de TECHNOSPHERE™/Insulina y se demostró que tenía un efecto sustancial de reducción de la glucosa en sangre con una biodisponibilidad relativa de 25,8% durante las primeras 3 horas como se calculó a partir de las concentraciones alcanzadas de insulina en suero.

Resumen

En este estudio, se demostró que la inhalación de TECHNOSPHERE™/Insulina (la formulación del ejemplo 1) en sujetos humanos sanos tenía un perfil de acción en el tiempo con un máximo rápido de concentración de insulina (Tmax: 13 min) y rápido comienzo de la acción (Tmax: 39 min) y una acción sostenida durante más de 6 horas. El efecto metabólico total medido tras la inhalación de 100 U de TECHNOSPHERE™/Insulina era mayor que tras la inyección subcutánea de 10 U de insulina. Se calculó que la bioeficacia relativa de ™/Insulina era 19,0%, mientras la biodisponibilidad relativa se determinó que era del 25,8% en las primeras tres horas.

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

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

Ejemplo 3: Eliminación de Impurezas del Péptido Registrado

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

Ejemplo 4: Formulaciones Estabilizadas de Glucagón

Formulación

Se formuló glucagón en condiciones estériles, en un complejo estabilizado por precipitación en solución acídica con dicetopiperazina de fumarilo (3,6-bis[N-fumarilo-N-(n-butil)amino]-2,5-dicetopiperazina). Se lavó y liofilizó el complejo dando una formulación en polvo seco estéril de dicetopiperazina/glucagón (referida en adelante como "TG") que contiene entre un 1,2 a un 8,2 % de glucagón en peso, dependiendo de los parámetros deseados de formulación (permitiendo a los médicos incrementar la dosis manteniendo sin embargo el volumen constante. Se suspendió el polvo TG en un medio apropiado adecuado para la administración subcutánea en una bomba de infusión MiniMed 507C.

Protocolo de Estabilidad

Se suspendieron glucagón y TG en medio de infusión y se incubaron a 40 ºC en un baño de agua para duraciones variables de tiempo hasta 150 horas.

Análisis HPLC de Glucagón

Se empleó una adaptación del método USP para análisis del glucagón. Se utilizaron una columna Waters Symmetry Shield RP8 (5 µm, 3,9 x 150 mm) y precolumna RP8 (5 µm, 3,9 x 20 mm) con un caudal de 1 ml/min. y una longitud de onda de detección de 214 nm. El método gradiente consistió en fase móvil A: 9,8 g NaH_2PO_4 (0,0816 M) y 170 mg de L-cisteína (1,4 mM) por litro de agua grado HPLC, pH ajustado a 2,6 con ácido fosfórico; y B: acetonitrilo. Se diluyeron soluciones de glucagón según era necesario con agua y se inyectaron. Se prepararon muestras de TG añadiendo 1/10 de volumen de Tris 1 M pH 10,0 a la muestra para solubilizar la dicetopiperazina de fumarilo.

Protocolo de Estudio en Ratas

Se pusieron en ayunas ratas Sprague Dawley de 200-250 g durante la noche y se les administraron inyecciones subcutáneas de glucagón o TG (0,75 mg/kg en un medio apropiado que se había mantenido a 25 ºC durante 0, 24, o 48 horas. Se tomaron muestras de sangre a -10, -5, 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, y 60 minutos tras la dosis y se analizaron para glucosa en sangre (HemCue B-analizador de glucosa, Hemocue AB, Angelholm Suecia). Se determinó el valor inicial medio (mediciones pre-dosis) y se restó de los datos posteriores y se trazó respecto al tiempo. Esto se hizo para asegurar que la formulación TG, la cual pareció no degradarse significativamente, mostraba actividad farmacológicamente apropiada.

Resultados

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

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

Conclusión

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en administración pulmonar de un péptido a un paciente, que comprende un péptido complejado a una dicetopiperazina, en donde el péptido se recubre sobre micropartículas de la dicetopiperazina.

2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la dicetopiperazina es 2,5-diceto-3,6-di(4-X-aminobutil)piperazina, en donde X representa un grupo succinilo, glutarilo, maleilo o fumarilo.

3. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que la dicetopiperazina es 2,5-diceto-3,6-di(4-fumaril-aminobutil)piperazina.

4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el péptido es insulina, glucagón, calcitonina de salmón, hormona paratiroidea 1-34, octreotida, leuprolida o péptido RSV.

5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el péptido es insulina monomérica.

6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el péptido es insulina y la insulina está predominantemente en los estados dimérico y monomérico, en oposición al estado hexamérico.

7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el péptido es insulina humana.

8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende insulina y administra la insulina liberando insulina monomérica o dimérica tras la administración.

9. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición comprende insulina y la composición es para el tratamiento de la diabetes.

10. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición comprende insulina y la composición es para el tratamiento de la diabetes tipo II.

11. Uso de un péptido complejado a una dicetopiperazina en la fabricación de un medicamento para la administración pulmonar del péptido a un paciente, en donde el péptido se recubre sobre micropartículas de la dicetopiperazina.

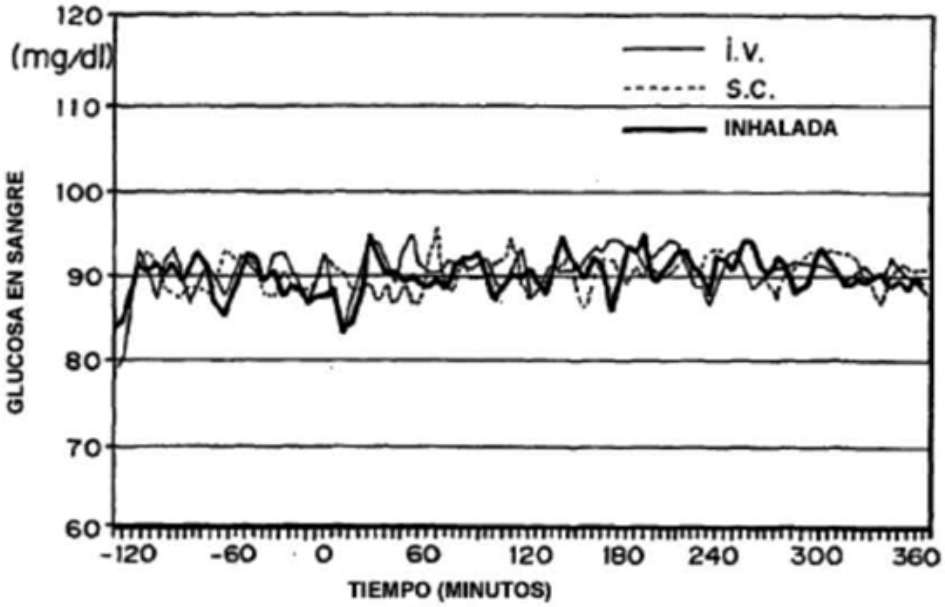

120
(mg/dl)
110
100
90
80
70
60
GLUCOSA EN SANGRE
i.v.
S.C.
INHALADA
-120
-60
0
60
120
180
240
300
360
TIEMPO (MINUTOS)

FIG. 1A

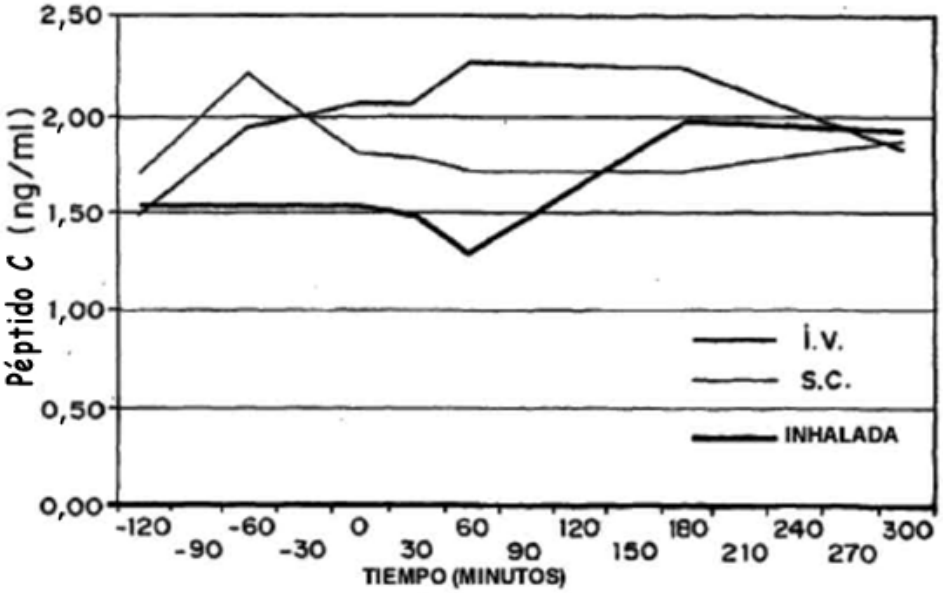

2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
Péptido C (ng/ml)
i.v.
S.C.
INHALADA
-120
-90
-60
-30
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
TIEMPO (MINUTOS)

FIG. 1B

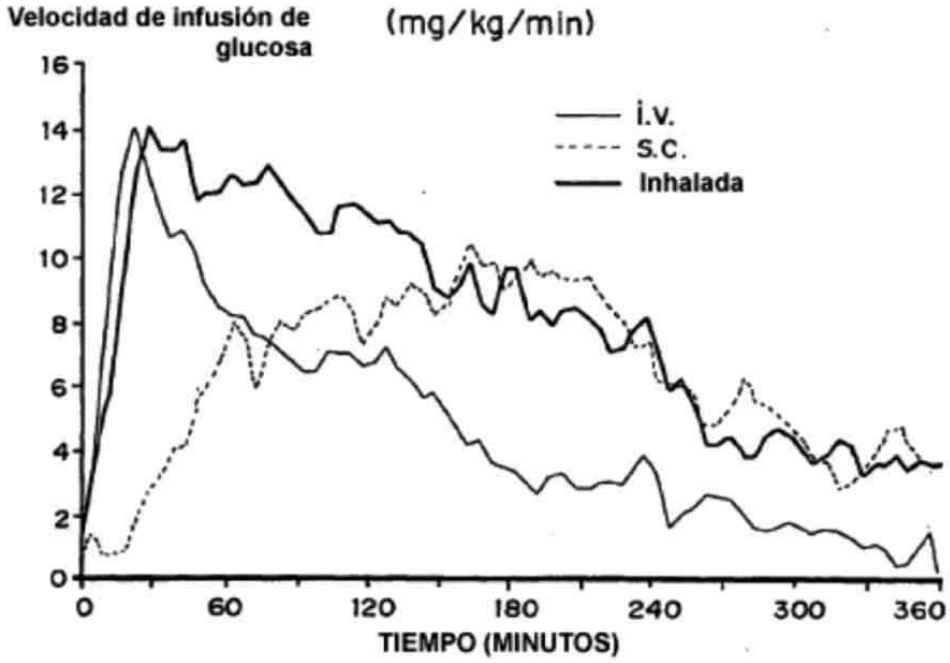

Velocidad de infusión de glucosa
(mg/kg/min)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
i.v.
S.C.
Inhalada
0
60
120
180
240
300
360
TIEMPO (MINUTOS)

FIG. 2A

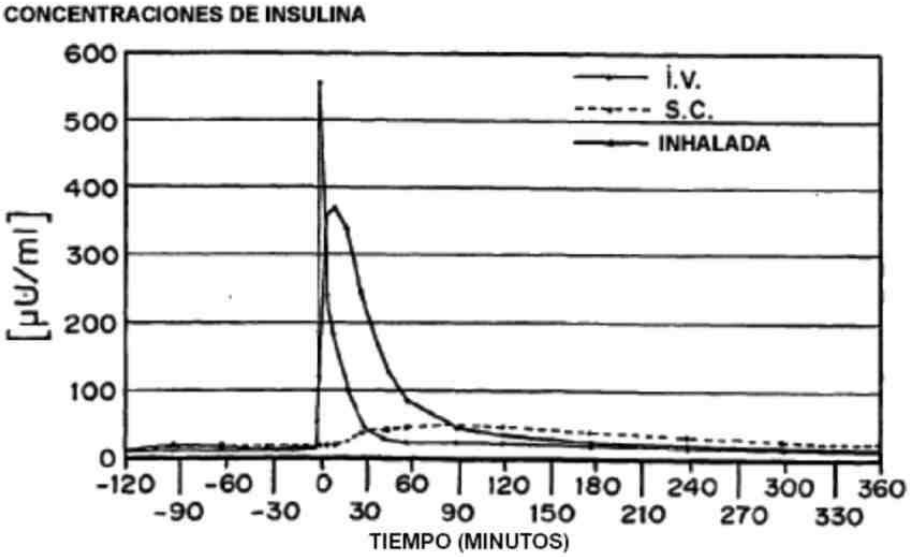

CONCENTRACIONES DE INSULINA
600
500
400
300
200
100
0
[µU/ml]
i.v.
S.C.
INHALADA
-120
-90
-60
-30
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
330
360
TIEMPO (MINUTOS)

FIG. 2B