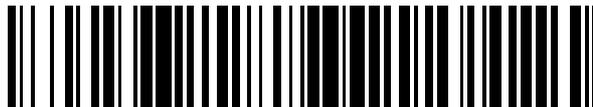


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 996**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2014 PCT/US2014/052326**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15027173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2014 E 14838450 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3035952**

54 Título: **Formulaciones estables de péptido glucagón**

30 Prioridad:

22.08.2013 US 201361868969 P

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

12.04.2019

73 Titular/es:

**ZP OPCO, INC. (100.0%)
34790 Ardentech Court
Fremont, CA 94555, US**

72 Inventor/es:

**AMERI, MAHMOUD;
DADDONA, PETER, E. y
AO, YI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 708 996 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 estables de péptido glucagón

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a la administración de fármacos y más particularmente a formulaciones de glucagón para administrar a través de la piel.

Técnica anterior

El glucagón se produce en los seres humanos a través del páncreas. El glucagón se une a receptores específicos en las células del hígado e incrementa la liberación de glucosa en el torrente sanguíneo. Por lo tanto, se utiliza en el tratamiento de la diabetes como una medicación de rescate cuando el nivel de azúcar en sangre baja demasiado.

10 El glucagón es un péptido corto que tiene 29 aminoácidos y un peso molecular de 3.483 kilodalton (kDa). La secuencia de aminoácidos en el glucagón es:

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser	Arg	Arg	Ala	Gln
1				5					10					15					20
Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr (SEQ ID NO:1)																			
21				25					29										

15 El glucagón tiene una conformación altamente helicoidal en estado cristalino, pero forma una espiral aleatoria en una solución diluida con aproximadamente 15% de hélice alfa en el extremo C-terminal. En concentraciones más altas, generalmente precipita y forma fibrillas. El glucagón se disuelve fácilmente en solución acuosa a pH inferior a 3 o superior a 9, pero precipita fácilmente a pH entre 4 y 8. Las formulaciones líquidas de glucagón son altamente inestables y experimentan hidrólisis y desamidación en varias posiciones (aminoácidos en la posición 3, 9, 15, 20, 21 y 24) y por lo tanto las preparaciones farmacéuticas se proporcionan generalmente en recipientes dobles: polvos de glucagón en un lado y un diluyente líquido en el otro. Una solución de glucagón se prepara entonces justo antes del uso. Los procedimientos que se llevan a cabo en general para mitigar la inestabilidad del glucagón en formulaciones líquidas incluyen el uso de dispersiones sólidas, disolventes apróticos, tensioactivos, procesos realizados a baja temperatura y envasado en forma seca.

20 Las formulaciones diluidas se han preparado de forma que son estables hasta durante 6 días y son útiles para el suministrar con una bomba (documento US2011/0097386). La concentración de glucagón en esas formulaciones está entre 0,8 mg/mL a 5 mg/mL y el pH está entre 4 y 7. Los agentes estabilizantes son una combinación de concentraciones bajas de un tensioactivo, tales como 1 mg/mL de LMPC y concentraciones elevadas de sacárido tales como 45 mg/mL de glucosa.

Compendio de las realizaciones

30 La invención comprende nuevas formulaciones de glucagón adecuadas para la administración transdérmica. Se describen formulaciones líquidas estables con una concentración elevada de glucagón. Estas formulaciones no forman geles o fibrillas y se pueden depositar fácilmente sobre sustratos para formar un recubrimiento uniforme. Una vez depositado sobre un sustrato y seco, el glucagón en los recubrimientos tiene una estabilidad mejorada a lo largo del tiempo. El glucagón se puede reconstituir fácilmente (como con fluidos corporales) sin formar un gel. Estas formulaciones son adecuadas por ello para uso como recubrimientos sobre sustratos tales como parches de microagujas para la administración transdérmica de glucagón para el tratamiento de la hipoglucemia.

35 En un primer aspecto de la invención, se proporciona una formulación farmacéutica líquida que comprende 15-20% (p/p) de glucagón, 7,5-10% (p/p) de un agente estabilizante seleccionado entre un tensioactivo catiónico o neutro, 3,75-5% (p/p) de un aminoácido, 3,75-5% (p/p) de un ácido orgánico y un diluyente farmacéuticamente aceptable; en donde la formulación tiene un pH entre 2 y 3. En algunas realizaciones, el tensioactivo es un fosfolípido. En algunas realizaciones, el fosfolípido es liso-miristoil fosfatidilcolina. En otras realizaciones, el tensioactivo es decanoil sacarosa. El aminoácido se selecciona a partir del grupo que consiste en glutamina y glicina. El ácido orgánico se selecciona a partir del grupo que consiste en ácido metanoico, ácido etanoico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido glicólico, ácido málico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido caproico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido propiónico y ácido sórbico. En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica tiene una viscosidad en el intervalo de 20-200 centipoise (cP).

40 En ciertas realizaciones, en la formulación farmacéutica, el tensioactivo es decanoil sacarosa, el aminoácido es glutamina y el ácido orgánico es ácido tartárico. En otras realizaciones, el tensioactivo es decanoil sacarosa, el aminoácido es glicina y el ácido orgánico es ácido tartárico. En aún otras realizaciones, el tensioactivo es liso-miristoil fosfatidilcolina, el aminoácido es glutamina y el ácido orgánico es ácido tartárico. Todavía en otras realizaciones, el tensioactivo es liso-miristoil fosfatidilcolina, el aminoácido es glicina y el ácido orgánico es ácido tartárico.

50 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una formulación farmacéutica sólida que comprende 40-50%

(p/p) de glucagón, 20-25% (p/p) de un agente estabilizante seleccionado a partir de un tensioactivo catiónico o neutro, 10-12,5% (p/p) de un aminoácido, 10-12,5% (p/p) de un ácido orgánico; en donde la formulación tiene un pH entre 2 y 3. En algunas realizaciones, el tensioactivo es un fosfolípido. En algunas realizaciones, el fosfolípido es liso-miristoil fosfatidilcolina. En otras realizaciones, el tensioactivo se selecciona a partir del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, trehalosa y dextrosa, sustituido con una cadena de alquilo C8-C12. En otras realizaciones, el tensioactivo es decanoil sacarosa. El aminoácido se selecciona a partir del grupo que consiste en glutamina y glicina. El ácido orgánico se selecciona a partir del grupo que consiste en ácido metanoico, ácido etanoico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido glicólico, ácido málico, ácido glucónico y ácido cítrico.

En aún otras realizaciones, el tensioactivo es decanoil sacarosa, el aminoácido es glutamina y el ácido orgánico es ácido tartárico. En otras realizaciones, el tensioactivo es decanoil sacarosa, el aminoácido es glicina y el ácido orgánico es ácido tartárico. En otras realizaciones, el tensioactivo es liso-miristoil fosfatidilcolina, el aminoácido es glutamina y el ácido orgánico es ácido tartárico. En otras realizaciones, el tensioactivo es liso-miristoil fosfatidilcolina, el aminoácido es glicina y el ácido orgánico es ácido tartárico.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo médico para la administración de un agente farmacéutico a través de la piel, comprendiendo el dispositivo una matriz de microagujas que tiene recubriéndolas, una composición líquida que comprende 15-20% (p/p) de glucagón, 7,5-10% (p/p) de un agente estabilizante seleccionado a partir de un tensioactivo catiónico o neutro, 3,75-5% (p/p) de un aminoácido, 3,75-5% (p/p) de un ácido orgánico y un diluyente farmacéuticamente aceptable; en donde la formulación tiene un pH entre 2 y 3. En algunas realizaciones, el dispositivo médico es portador de una dosis terapéutica de glucagón de o bien 1 mg para una dosis de adulto, o de 0,5 mg para una dosis pediátrica. En algunas realizaciones, el tensioactivo es un fosfolípido. En algunas realizaciones, el fosfolípido es liso-miristoil fosfatidilcolina. En otras realizaciones, el tensioactivo se selecciona a partir del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, trehalosa, dextrosa, sustituido con una cadena de alquilo C8-C12. En otras realizaciones, el tensioactivo es decanoil sacarosa. En algunas otras realizaciones, el aminoácido se selecciona a partir del grupo que consiste en glutamina y glicina. En algunas otras realizaciones, el ácido orgánico se selecciona a partir del grupo que consiste en ácido metanoico, ácido etanoico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido glicólico, ácido málico, ácido glucónico y ácido cítrico.

En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo médico para la administración de un agente farmacéutico a través de la piel, comprendiendo el dispositivo una matriz de microagujas que tiene recubriéndolas, una composición sólida que comprende 40-50% (p/p) de glucagón, 20-25% (p/p) de un agente estabilizante seleccionado a partir de un tensioactivo catiónico o neutro, 10-12,5% (p/p) de un aminoácido, 10-12,5% (p/p) de un ácido orgánico; en donde la formulación tiene un pH entre 2 y 3. En algunas realizaciones, el dispositivo médico es portador de una dosis terapéutica de glucagón de o bien 1 mg para una dosis de adulto, o de 0,5 mg para una dosis pediátrica. En algunas realizaciones, el tensioactivo es un fosfolípido. En algunas realizaciones, el fosfolípido es liso-miristoil fosfatidilcolina. En otras realizaciones, el tensioactivo se selecciona a partir del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, trehalosa, dextrosa, sustituido con una cadena de alquilo C8-C12. En otras realizaciones, el tensioactivo es decanoil sacarosa. En algunas otras realizaciones, el aminoácido se selecciona a partir del grupo que consiste en glutamina y glicina. En algunas otras realizaciones, el ácido orgánico se selecciona a partir del grupo que consiste en ácido metanoico, ácido etanoico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido glicólico, ácido málico, ácido glucónico y ácido cítrico.

En alguna realización, la formulación sólida es de tal modo que una vez aplicada sobre la piel de un paciente, el recubrimiento es disuelto por los fluidos corporales del paciente en menos de 30 minutos. En otras realizaciones, el recubrimiento es disuelto por los fluidos corporales del paciente en menos de 20 minutos. En otras realizaciones, el recubrimiento es disuelto por los fluidos corporales del paciente en menos de 10 minutos.

En un quinto aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para recubrir un dispositivo médico que comprende el recubrimiento con una composición farmacéutica líquida de acuerdo con la invención descrita en el presente documento, sobre un dispositivo médico y el secado de la composición farmacéutica.

En un sexto aspecto de la invención, se proporcionan métodos de tratamiento de un paciente que tiene un nivel bajo de azúcar que comprende aplicar el dispositivo médico que tiene una formulación sólida aplicada sobre el mismo de acuerdo con la invención descrita en la presente memoria, sobre la piel del paciente. En algunas realizaciones, una $C_{m\acute{a}x}$ en suero sanguíneo de glucagón se alcanza en menos de 30 minutos. En otras realizaciones, una $C_{m\acute{a}x}$ en suero sanguíneo de glucagón se alcanza en aproximadamente 10 min. En aún otras realizaciones, una $C_{m\acute{a}x}$ en suero sanguíneo de glucagón asciende al menos a 5 ng/mL. En otras realizaciones, una $C_{m\acute{a}x}$ en suero sanguíneo de glucagón asciende al menos a 10 ng/mL. En todavía otras realizaciones, una $C_{m\acute{a}x}$ en suero sanguíneo de glucagón asciende a aproximadamente 20 ng/mL.

En otras realizaciones, una $C_{m\acute{a}x}$ en suero sanguíneo de glucagón de al menos 5 ng/mL se alcanza en menos de 20 minutos después de la aplicación del dispositivo sobre la piel del paciente. En aún otras realizaciones, una $C_{m\acute{a}x}$ en suero sanguíneo de glucagón de al menos 5 ng/mL se alcanza en aproximadamente 10 minutos después de la aplicación del dispositivo sobre la piel del paciente. En aún otras realizaciones, una $C_{m\acute{a}x}$ en suero sanguíneo de glucagón de aproximadamente 10 ng/mL se alcanza en aproximadamente 10 minutos después de la aplicación del dispositivo sobre la piel del paciente. En todavía otras realizaciones, una concentración en suero sanguíneo de glucagón

es inferior a 10 ng/mL aproximadamente 60 minutos después de la aplicación del dispositivo sobre la piel del paciente.

5 En todavía otras realizaciones, una $C_{\text{máx}}$ en suero sanguíneo de glucagón de al menos 5 ng/mL se alcanza en menos de 20 minutos y la concentración en suero sanguíneo de glucagón es inferior a 10 ng/mL aproximadamente 40 minutos después de la aplicación del dispositivo sobre la piel del paciente. En todavía otras realizaciones, una $C_{\text{máx}}$ en suero sanguíneo de glucagón de al menos 10 ng/mL se alcanza en menos de 20 minutos y la concentración en suero sanguíneo de glucagón es inferior a 10 ng/mL aproximadamente 30 minutos después de la aplicación del dispositivo sobre la piel del paciente.

Breve descripción de los dibujos

10 Las características anteriores de las realizaciones se entenderán más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada, tomada como referencia para los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es una vista en perspectiva de una porción de un ejemplo de un parche de microagujas, de acuerdo con la invención.

15 La Figura 2 es una vista en perspectiva del parche de microagujas que se muestra en la Figura 1 que tiene un recubrimiento depositado sobre las microagujas, de acuerdo con la invención.

La Figura 3 es una vista en sección lateral de un parche de microagujas que tiene un soporte adhesivo, de acuerdo con la invención.

La Figura 4 es una vista en sección lateral de un anillo de retención que tiene un parche de microagujas dispuesto en el mismo, de acuerdo con la invención.

20 La Figura 5 es una vista en perspectiva del retén mostrado en la Figura 4.

La Figura 6 es una vista detallada en perspectiva de un aplicador y un retén, de acuerdo con la invención.

La Figura 7 es una fotografía SEM de un parche de microagujas recubiertas con glucagón de acuerdo con las realizaciones de la invención.

25 Las Figuras 8A y 8B son representaciones esquemáticas del procedimiento de recubrir con formulaciones de glucagón parches de microagujas de acuerdo con una realización de la invención.

La Figura 9 es una gráfica del tiempo frente a la viscosidad que compara el tiempo de gelificación de las formulaciones de glucagón utilizando diversos agentes estabilizantes preparados según el Ejemplo 1.

30 La Figura 10 es una gráfica del tiempo frente a la viscosidad que compara el tiempo de gelificación de las formulaciones de glucagón utilizando diversas concentraciones de los agentes estabilizantes de liso-miristoil fosfatidilcolina (LMPC) preparados según el Ejemplo 2.

La Figura 11 es una gráfica del tiempo frente a la viscosidad que compara el tiempo de gelificación de las formulaciones de glucagón con y sin glutamina, preparadas según el Ejemplo 3.

La Figura 12 es una gráfica del tiempo frente a la viscosidad que compara el tiempo de gelificación de las formulaciones de glucagón con ácido metanoico o tartárico, preparadas según el Ejemplo 4.

35 La Figura 13 es una gráfica del tiempo frente a la pureza que compara la estabilidad de las formulaciones de glucagón con glutamina, LMPC y ácido metanoico o tartárico, preparadas según el Ejemplo 5 a 25°C y 40°C.

La Figura 14 es una gráfica del tiempo frente a la pureza que compara la estabilidad de las formulaciones de glucagón con glutamina, decanoil sacarosa y ácido metanoico o tartárico, preparadas según el Ejemplo 6 a 25°C y 40°C.

40 La Figura 15 es una gráfica que compara la farmacocinética de las formulaciones de glucagón sobre el parche de microagujas, preparadas de acuerdo con una realización de la invención, frente a la inyección subcutánea en el conejillo de indias sin pelo, que se detalla en el Ejemplo 7.

45 La Figura 16 es una gráfica que compara la pureza frente al tiempo para la Formulación 1. La gráfica muestra la estabilidad de los sistemas de glucagón, en donde la matriz de titanio se había recubierto con la Formulación 1 con 0,5 mg de glucagón, ensamblada con un anillo de retención de policarbonato con un agente desecante comoldeado y un parche adhesivo de 5 cm² y sellada térmicamente en una bolsa de papel de aluminio purgada con nitrógeno.

La Figura 17 es una gráfica que compara la pureza frente al tiempo para la Formulación 2. La gráfica muestra la estabilidad de los sistemas de glucagón, en donde la matriz de titanio se había recubierto con la Formulación 1 con 0,5 mg de glucagón, ensamblada con un anillo de retención de policarbonato con un agente desecante comoldeado y un parche adhesivo de 5 cm² y sellada térmicamente en una bolsa de papel de aluminio purgada con nitrógeno.

La Figura 18 muestra los espectros de UV lejano (FUV) y dicroísmo circular (CD) para glucagón extraído del Parche C y del Parche D. Los parches de glucagón ZP se evaluaron para analizar la fibrilación del glucagón mediante CD después de la disolución de glucagón. Estos espectros de CD son compatibles con un péptido de tipo de glucagón en una conformación predominantemente α -helicoidal como un trímero soluble o un monómero helicoidal soluble, a diferencia de la estructura rica en lámina β en las fibrillas de glucagón. Como todavía hay una cantidad significativa de estructura de espiral aleatoria, esto también es compatible con el glucagón monomérico.

Descripción detallada de realizaciones específicas

Definiciones. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta descripción y las reivindicaciones adjuntas, tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.

Un alquil sacárido de acuerdo con la invención significa un compuesto que comprende un resto carbohidrato del tipo $R-C_xH_{2y+z}O_y$, en donde x e y son números enteros que varían de 3-12, z es un número que varía de -1 a 1, R puede ser un hidrógeno o un alquilo lineal o ramificado C1-C22 o grupos alquilo saturados o parcialmente insaturados, incluyendo metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octil-, nonil-, decil-, undecil-, dodecil-, tridecil-, tetradecil-, pentadecil-, hexadecil-, heptadecil-, octadecil-, nonadecil-, eicosanil-, heneicosanil-, docosanil-, etoil-, propoil-, butoil-, pentoil-, hexoil-, heptoil-, capriolil-, caproil-, lauroil-, miristoil-, palmitoil-, estearoil-, araquidolil-, behenolil-, miristoleoil-, palmitoleoil-, oleoil-, linoleoil-, linolenoil- y araquidoneoil-; y el carbohidrato puede ser un resto de glucosa, dextrosa, maltosa, galactosa, lactosa, sacarosa, fructosa o ribosa. Un alquil sacárido preferido es decanoil sacarosa.

Un tensioactivo catiónico de acuerdo con la invención significa un compuesto seleccionado a partir de una fosfatidilcolina y liso fosfatidilcolina, incluyendo liso-miristoil fosfocolina (LMPC).

Un ácido orgánico significa ácidos presentes en la naturaleza, incluyendo los ácidos metanoico (fórmico), acético, caproico, tartárico, cítrico, benzoico, láctico, propiónico, sórbico, malónico, málico, glicólico y glucónico.

Un diluyente farmacéuticamente aceptable significa agua con o sin tampones, sales y similares.

El término "transdérmico" significa la administración de un agente en y/o a través de la piel para una terapia local o sistémica.

La expresión "flujo transdérmico" significa la tasa de administración transdérmica.

El término "coadministración", tal y como se usa en esta memoria, significa que uno o unos agentes complementarios se administran por vía transdérmica, ya sea antes de que se administre el agente, antes y durante el flujo transdérmico del agente, durante el flujo transdérmico del agente, durante y después del flujo transdérmico del agente, y/o después del flujo transdérmico del agente. Además, se pueden recubrir los microsatientes con dos o más agentes dando lugar a una coadministración de los agentes.

La expresión "agente biológicamente activo" o "agente activo" tal y como se usa en esta memoria, se refiere a un compuesto de materia o una mezcla que contiene un fármaco que es farmacológicamente eficaz cuando se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión "cantidad biológicamente eficaz" o "tasa biológicamente eficaz" se utiliza cuando el agente biológicamente activo es un agente farmacéuticamente activo y se refiere a la cantidad o a la tasa del agente farmacológicamente activo necesaria para efectuar el efecto terapéutico deseado, con frecuencia beneficioso. La cantidad de agente empleada en los recubrimientos será la cantidad necesaria para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente para conseguir el resultado terapéutico deseado. En la práctica, esto variará ampliamente dependiendo del agente farmacológicamente activo particular que está siendo administrado, el sitio de administración, la gravedad de la afección a tratar, el efecto terapéutico deseado y la disolución y la cinética de liberación para la administración del agente desde el recubrimiento en los tejidos de la piel. No resulta útil definir un intervalo preciso para la cantidad terapéuticamente eficaz del agente farmacológicamente activo incorporado en las microagujas y administrado por vía transdérmica, de acuerdo con los métodos descritos en este documento.

El término "estabilidad" se refiere a la propiedad de una formulación para conservar su nivel de pureza (% (p/p)), dentro de un 3% de su nivel de pureza de partida después de un período de tiempo, preferiblemente 0-24 meses, 0-12 meses o 0-6 meses; a una temperatura de 0-50°C, preferentemente 4-42°C, más preferiblemente 25-40°C; y a una humedad relativa (HR) de 0-100%, preferiblemente 25-85%, más preferiblemente 60-75%. El término "microagujas" se refiere a elementos de perforación que están adaptados para perforar o cortar a través del estrato córneo hasta la capa epidérmica subyacente, o capas de la epidermis y dermis, de la piel de un animal vivo, particularmente un ser humano. Normalmente los elementos de perforación tienen una longitud de hoja de menos de 500 μ m y preferiblemente menos de 400 μ m. Los microsatientes tienen normalmente una anchura de aproximadamente 50 a 200 μ m y un espesor de aproximadamente 5 a 50 μ m. Los microsatientes pueden tener diversas formas, tales como agujas, agujas huecas, cuchillas, pivotes, punzones y combinaciones de las mismas.

La expresión "matriz de microagujas" o "parche de microagujas" tal y como se usa en esta memoria, se refiere a un

5 sustrato que es portador de una pluralidad de microagujas dispuestas en una matriz para perforar el estrato córneo. El parche de microagujas se puede formar mediante el grabado o punzonado de una pluralidad de microagujas desde una lámina delgada y el plegado o doblado de las microagujas fuera del plano de la lámina para formar una configuración tal como la mostrada en la Figura 1. El parche de microagujas también se puede formar de otras maneras conocidas, tales como mediante la formación de una o varias tiras que tienen microagujas a lo largo de un borde de cada una de la o las tiras, como se describe en el documento patente de EE.UU. n° 6.050.988 de ALZA Corporation. El parche de microagujas también puede incluir agujas huecas que retienen un agente farmacológicamente activo seco.

10 Las formulaciones líquidas y sólidas secas de acuerdo con la invención para aplicar a los parches de microagujas se preparan según los procedimientos generales de la publicación Pharm. Res. 27, 303-313 (2010). Una formulación de glucagón líquido que contiene un tensioactivo, un aminoácido y un ácido orgánico se prepara de acuerdo con el siguiente procedimiento a modo de ejemplo. Se añaden trescientos mg de glucagón a 1,5 mL de solución madre que contiene 50 mg/mL de ácido tartárico, 50 mg/mL de glutamina y 100 mg/mL de agente tensioactivo. La suspensión resultante se mezcla a continuación durante 2-3 horas o hasta que se obtenga una solución transparente de la formulación líquida.

15 Una formulación farmacéutica líquida de acuerdo con la invención puede contener 15-20% (p/p) de glucagón, 7,5-10% (p/p) de un agente estabilizante seleccionado a partir del grupo que consiste en un tensioactivo catiónico o alquil sacárido, 3,75-5% (p/p) de un aminoácido; 3,75-5% (p/p) de un ácido orgánico y un diluyente farmacéuticamente aceptable. El pH de la formulación se ajusta a un valor entre 2 y 3.

20 La formulación farmacéutica seca sobre los parches recubiertos, listos para envasar, de acuerdo con la invención, puede contener 40-50% (p/p) de glucagón, 20-25% (p/p) de un agente estabilizante seleccionado a partir de o bien un tensioactivo catiónico o un alquil sacárido, 10-12,5% (p/p) de un aminoácido, 10-12,5% (p/p) de un ácido orgánico. El pH de la formulación es de 2 a 3.

25 El tensioactivo puede ser un fosfolípido catiónico tal como liso-miristoil fosfatidilcolina. El alquil sacárido puede ser sacarosa con una cadena de alquilo C8-C12 tal como decanoil sacarosa. El aminoácido puede ser glutamina o glicina. El ácido orgánico puede ser ácido metanoico o ácido tartárico.

30 Las realizaciones de la presente invención proporcionan una formulación que contiene un agente biológicamente activo, glucagón, que cuando ha recubierto y se ha secado sobre una o varias microagujas de un parche de microagujas, tal y como se muestra en la Figura 1, forma un recubrimiento estable con una mayor solubilización del fármaco después de la inserción en la piel para una liberación veloz en el torrente sanguíneo del paciente y un comienzo rápido del tratamiento. Haciendo referencia a la Figura 1, las realizaciones de la presente invención incluyen un dispositivo **22** que tiene una pluralidad de microagujas **24** que perforan el estrato córneo que se extiende bajo las mismas. Las microagujas están adaptadas para perforar a través del estrato córneo hasta la capa epidérmica subyacente, o las capas de la epidermis y la dermis, pero no penetran tan profundamente como para alcanzar los lechos capilares y causar una hemorragia significativa. Haciendo referencia a la Figura 2, las microagujas son portadoras de un recubrimiento **26** de la formulación seca del agente biológicamente activo, glucagón. Al perforar la capa del estrato córneo de la piel, el recubrimiento es disuelto por los fluidos corporales (fluidos intracelulares y fluidos extracelulares tales como el fluido intersticial) liberando de este modo el agente biológicamente activo, glucagón, en la piel para una absorción en la corriente sanguínea.

35 El recubrimiento sólido se obtiene mediante el secado de una formulación líquida sobre las microagujas, tal y como se describe en el documento patente de EE.UU. n° 7.537.795 de ALZA Corporation. La formulación líquida es generalmente una formulación acuosa. En un recubrimiento sólido sobre un parche de microagujas, el fármaco está presente normalmente en una cantidad de 1-2 mg por dosis unitaria. Con la adición de los agentes de formulación, la masa total del recubrimiento sólido es menor de 4 mg por dosis unitaria. La matriz de microagujas **22** normalmente está presente sobre un adhesivo **30** con un soporte **40** como se muestra en la Figura 3, que está fijado a un anillo de retención polimérico desechable **50** como se muestra en las Figuras 4 y 5. Este conjunto se envasa individualmente en una bolsa o una cubierta polimérica. El parche de microagujas **22** se aplica sobre la piel de un paciente con el uso de un dispositivo de despliegue **60**, que se muestra en la Figura 6, sobre el que está montado el anillo de retención **50** con el parche de microagujas **22**. El dispositivo de despliegue se presiona, desprendiéndose el parche **22** desde el anillo de retención y empujando las microagujas **24** dentro de la piel del paciente. Alternativamente, el parche se puede montar en un aplicador de un solo uso, listo para que lo aplique el paciente, como se describe en el documento de solicitud de patente de EE.UU., 61/864.857 presentado el 12 de agosto de 2013.

40 Los parches de microagujas recubiertos para la administración de glucagón se pueden preparar del modo siguiente. Los recubrimientos sobre las microagujas se pueden realizar por una variedad de métodos conocidos tales como recubrimiento por inmersión o pulverización. El recubrimiento por inmersión consiste en sumergir parcial o totalmente las microagujas en una formulación preparada de acuerdo con la invención. Alternativamente, se puede sumergir el dispositivo entero en la formulación. En muchos casos, puede ser preferible recubrir solo las puntas de las microagujas. Los aparatos y métodos para el recubrimiento de la punta de microagujas se describen en el documento patente de EE.UU. n° 6.855.372 de ALZA Corporation.

Un esquema del procedimiento se muestra en la Figura 8A. El aparato para el recubrimiento solo aplica recubrimientos a las propias microagujas y no sobre el sustrato que proyecta las microagujas. Una formulación líquida **10** preparada de acuerdo con la invención se coloca en un depósito **12**. Un tambor giratorio **14** está sumergido parcialmente en el líquido y se hace girar. El líquido **10** forma una película delgada sobre el tambor de recubrimiento **16**. Una cuchilla **18** controla el espesor de la película para que coincida con la longitud de las microagujas o ajusta la dosificación sobre los parches. Un deslizador **20** que es portador del sustrato **22** con las microagujas **24** se coloca en el tambor **14** de manera que las microagujas **24** se bañan o se sumergen en la película **16** (que se muestra en la sección en la Figura 8B). A medida que el tambor **14** gira, el sustrato **22** se mueve de un lado a otro como para recubrir las microagujas de forma secuencial. El proceso se puede realizar de una manera continua, introduciendo una serie de sustratos en el aparato. El proceso se puede repetir para aumentar el espesor de los recubrimientos y de este modo variar la dosificación de los parches. Esta técnica de recubrimiento tiene la ventaja de formar un recubrimiento liso que no se desplaza fácilmente de las microagujas durante la perforación de la piel. Otras técnicas de recubrimiento tales como técnicas de pulverización o impresión de microfluidos se pueden utilizar para depositar con precisión un recubrimiento sobre las microagujas **24**.

La dosificación del glucagón sobre los parches de microagujas se puede controlar mediante la variación de una serie de características, tales como el tamaño del parche, el tamaño de las microagujas, el espesor del recubrimiento sobre las microagujas y el área superficial de los recubrimientos sobre las microagujas. Los parches se pueden preparar por lo tanto para la administración transdérmica de glucagón en los intervalos de dosis y dosis siguientes: 0,25-2,0 mg/parche, preferiblemente 0,5-1,0 mg/parche; el tamaño del parche puede ser de 5 cm² a 10 cm² con una matriz de microagujas de 2,5 cm² a 8 cm². El tratamiento de niveles bajos de azúcar en sangre en un paciente puede requerir la aplicación de un parche por incidente. También se puede requerir la aplicación de varios parches de forma simultánea o secuencial hasta que el nivel de azúcar en sangre ha alcanzado el intervalo normal de concentración en suero de glucosa.

Las técnicas para la aplicación de los parches sobre la piel se han descrito en el documento de patente de EE.UU. n° 6.855.131. Para aplicar un parche de microagujas de acuerdo con la presente invención, un envoltorio de papel de aluminio estéril que contiene el parche cargado con glucagón en un aplicador para un único uso, listo para el empleo. El extremo proximal del sistema de parche/aplicador se presiona contra la piel para activar la liberación del parche sobre la piel. Al cabo de 1-30 minutos, el glucagón se libera completamente desde el parche. A continuación, el parche se puede retirar y desechar.

La estabilización física, especialmente minimizando la exposición de las formulaciones de agentes biológicamente activos a lo largo del tiempo a la oxidación y la hidrólisis, es una etapa importante para asegurar la eficacia de los agentes terapéuticos, en particular cuando el modo de administración del agente terapéutico es mediante un dispositivo de administración transdérmica que tiene una pluralidad de microagujas recubiertas con un agente que contiene un recubrimiento biocompatible.

Por lo tanto, la preparación y/o el envasado de las formulaciones en una atmósfera inerte seca o un vacío parcial, sustancialmente exento de oxígeno y agua, reduce sustancialmente o elimina un deterioro indeseable del agente biológicamente activo.

Las formulaciones de la presente invención muestran una estabilidad superior y han demostrado conservar una pureza sustancial después de un almacenamiento de hasta seis meses, cuando se almacenan bajo diversas condiciones de temperatura y humedad relativa. Además, las formulaciones de la presente invención han demostrado que permanecen en una conformación predominantemente α -helicoidal como un trímero soluble o un monómero soluble o soluble helicoidal, en contraposición a las estructuras ricas en lámina β que se encuentran en las fibrillas de glucagón. La estabilidad superior y la limitada formación de fibrillas de las formulaciones presentadas en este documento, ofrecen una mejora significativa sobre la terapéutica con glucagón actualmente disponible.

En una realización, las composiciones, y los métodos para la formulación y la administración, de agentes biológicamente activos son particularmente adecuados para la administración transdérmica usando un dispositivo de administración con microagujas, en el que los agentes biológicamente activos se incluyen en un recubrimiento biocompatible, que se prepara y/o envasa en una atmósfera inerte seca, preferiblemente de nitrógeno o argón.

En una realización, las composiciones, y los métodos para la formulación y la administración, de agentes biológicamente activos son particularmente adecuados para la administración transdérmica usando un dispositivo de administración con microagujas, en el que los agentes biológicamente activos se incluyen en un recubrimiento biocompatible que recubre al menos una microaguja que perfora el estrato córneo, preferiblemente una pluralidad de microagujas que perforan el estrato córneo, de un dispositivo de administración de microagujas, y se prepara y/o envasa en una atmósfera inerte seca, preferiblemente de nitrógeno o argón.

En una realización, las composiciones, y los métodos para la formulación y la administración, de agentes biológicamente activos son particularmente adecuados para la administración transdérmica usando un dispositivo de administración con microagujas, en el que los agentes biológicamente activos se incluyen en un recubrimiento biocompatible, que se prepara y/o envasa en una atmósfera inerte seca, preferiblemente de nitrógeno o argón, y en presencia de un agente desecante.

5 En una realización, las composiciones, y los métodos para la formulación y la administración, de agentes biológicamente activos son particularmente adecuados para la administración transdérmica usando un dispositivo de administración con microagujas, en el que los agentes biológicamente activos se incluyen en un recubrimiento biocompatible, que se prepara y/o envasa en una cámara revestida con papel de aluminio en una atmósfera inerte seca, preferiblemente de nitrógeno y un agente desecante.

En una realización, las composiciones, y los métodos para la formulación y la administración, de agentes biológicamente activos son particularmente adecuados para la administración transdérmica usando un dispositivo de administración con microagujas, en el que los agentes biológicamente activos se incluyen en un recubrimiento biocompatible, que se prepara y/o envasa en un vacío parcial.

10 En una realización, las composiciones, y los métodos para la formulación y la administración, de agentes biológicamente activos son particularmente adecuados para la administración transdérmica usando un dispositivo de administración con microagujas, en el que los agentes biológicamente activos se incluyen en un recubrimiento biocompatible, que se prepara y/o envasa en una atmósfera inerte seca, preferiblemente de nitrógeno o en un vacío parcial.

15 En una realización, las composiciones, y los métodos para la formulación y la administración, de agentes biológicamente activos son particularmente adecuados para la administración transdérmica usando un dispositivo de administración con microagujas, en el que los agentes biológicamente activos se incluyen en un recubrimiento biocompatible, que se prepara y/o envasa en una cámara revestida con papel de aluminio que tiene una atmósfera inerte seca, preferiblemente de nitrógeno y un agente desecante.

Ejemplos

20 Materiales y Procedimientos Generales

25 El glucagón fue adquirido en BACHEM y fue producido por síntesis química con una pureza del 98,8% (p/p). Las formulaciones de glucagón se prepararon siguiendo los procedimientos de la publicación Pharm. Res. 27, 303-313 (2010). Se preparó una formulación líquida que contenía un tensioactivo, un aminoácido y un ácido orgánico. Se añadieron trescientos mg de glucagón a 1,5 mL de solución madre que contenía 50 mg/mL de ácido tartárico, 50 mg/mL de glutamina y 100 mg/mL de tensioactivo. A continuación se mezcló la suspensión resultante durante 2-3 horas o hasta que se obtuvo una solución transparente de la formulación líquida.

30 Las pruebas de estabilidad física de las formulaciones líquidas de glucagón se llevaron a cabo utilizando un reómetro (modelo CVOR150, Bohlin Instrument, Cranbury, NJ) configurado con una geometría de cono y placa (un ángulo de cono de 1° y un radio de 10 mm). Setenta μL de la formulación líquida de glucagón se utilizaron para cada experimento. Para determinar el punto de gelificación de una formulación líquida de glucagón particular, la muestra se sometió a cizallamiento a 2667 s^{-1} y las viscosidades se registraron cada 30 segundos. El punto de gelificación se observó en la inflexión de la curva de la viscosidad frente al tiempo, es decir, en el punto en que se observó un rápido aumento de la viscosidad.

35 Ejemplo 1: Estudio del efecto de los tensioactivos sobre la estabilidad física de las formulaciones líquidas de glucagón.

Un resumen de las diversas formulaciones se muestra a continuación en la Tabla 1. Una comparación de los perfiles de gelificación entre las formulaciones se muestra en la Figura 9 y los resultados de punto de gelificación se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1:

Formulación/Tensioactivo	Glucagón (mg/mL)	Tensioactivo (mg/mL)	Glutamina (mg/mL)	Ácido orgánico (mg/mL)	Punto(s) de gelificación
Decanoil sacarosa	200	100	N/A	50	1800
LMPC	200	100	N/A	50	1800
Polisorbato 20	200	2	N/A	50	1300

40 En un líquido sometido a una tasa de cizallamiento fija, su viscosidad debe ser constante en el tiempo al principio y luego aumentar rápidamente, lo que indica el punto de gelificación. Cuanto más tiempo se tarda en gelificar, menor es la tendencia a la gelificación de una formulación. Los perfiles de viscosidad para las tres formulaciones que incorporan decanoil sacarosa, LMPC o polisorbato 20 como tensioactivo se presentan en la Figura 9. Las tres formulaciones se sometieron a cizallamiento con una tasa de cizallamiento de 2667 s^{-1} a 8°C . El punto de inflexión (en donde la viscosidad empieza a aumentar) es de 1800 segundos, tanto para las formulaciones de decanoil sacarosa como de LMPC y 1300 segundos para la formulación de polisorbato 20. Se sugiere que las formulaciones de decanoil

sacarosa y LMPC son menos propensas a la gelificación.

Ejemplo 2: Estudio del efecto de la concentración del tensioactivo sobre la estabilidad física de las formulaciones líquidas de glucagón.

5 Un resumen de las diversas formulaciones se muestra en la Tabla 2 a continuación. Una comparación de los perfiles de gelificación entre las formulaciones se muestra en la Figura 10 y los resultados de punto de gelificación se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2:

Formulación Glucagón:LMPC	Glucagón (mg/mL)	Tensioactivo (mg/mL)	Glutamina (mg/mL)	Ácido orgánico (mg/mL)	Punto(s) de gelificación
1:1	200	200	50	50	2200
1:0,5	200	100	50	50	2200
1:0,25	200	50	50	50	1200

10 Resultados: Los perfiles de viscosidad para las tres formulaciones que incorporan concentraciones de LMPC a 50 mg/mL, 100 mg/mL y 200 mg/mL se presentan en la Figura 10. Las tres formulaciones se sometieron a cizallamiento con una tasa de cizallamiento de 2667 s^{-1} a 8°C . El punto de inflexión (en donde la viscosidad empieza a aumentar) es de 2200 segundos para las formulaciones que contienen concentraciones de LMPC de 100 mg/mL y 200 mg/mL (a una concentración constante de glucagón de 200 mg/mL) y de 1200 segundos para la formulación que contiene LMPC a una concentración de 50 mg/mL. Esto sugiere que se requiere una concentración mínima de LMPC de 100 mg/mL (a una concentración de glucagón de 200 mg/mL) para una formulación que es menos susceptible a la gelificación.

Ejemplo 3: Estudio del efecto de la glutamina sobre la estabilidad física de las formulaciones líquidas de glucagón.

20 Un resumen de las diversas formulaciones se muestra en la Tabla 3 a continuación. Una comparación de los perfiles de gelificación entre las formulaciones se muestra en la Figura 11 y los resultados de punto de gelificación se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3:

Formulación/Aminoácido	Glucagón (mg/mL)	Tensioactivo (mg/mL)	Glutamina (mg/mL)	Ácido orgánico (mg/mL)	Punto(s) de gelificación
Sin	200	100	N/A	50	1400
Con glutamina	200	100	50	50	2200

25 Resultados: Los perfiles de viscosidad para las dos formulaciones que evalúan el efecto de la glutamina se presentan en la Figura 11. Las dos formulaciones se sometieron a cizallamiento con una tasa de cizallamiento de 2667 s^{-1} a 8°C . El punto de inflexión (en donde la viscosidad empieza a aumentar) es de 2200 segundos para la formulación que contiene glutamina y 1400 segundos para la formulación que no contiene glutamina. Este resultado indica que se requiere glutamina para una formulación que es menos susceptible a la gelificación.

Ejemplo 4: Estudio del efecto del ácido orgánico sobre la estabilidad física de las formulaciones líquidas de glucagón.

30 Una comparación de los perfiles de gelificación entre las formulaciones se muestra en la Figura 12 y los resultados de punto de gelificación se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4:

Formulación	Glucagón (mg/mL)	LMPC (mg/mL)	Glutamina (mg/mL)	Ácido orgánico (mg/mL)	Punto(s) de gelificación
-------------	---------------------	-----------------	----------------------	---------------------------	--------------------------

Formulación	Glucagón (mg/mL)	LMPC (mg/mL)	Glutamina (mg/mL)	Ácido orgánico (mg/mL)	Punto(s) de gelificación
Ácido metanoico	200	100	50	50	2200
Ácido tartárico	200	100	50	50	2200

5 Los perfiles de viscosidad para las dos formulaciones que evalúan el efecto del ácido tartárico y el ácido metanoico, se presentan en la Figura 12. Las dos formulaciones se sometieron a cizallamiento con una tasa de cizallamiento de 2667 s^{-1} a 8°C . El punto de inflexión (en donde la viscosidad empieza a aumentar) es de 2200 segundos para ambas formulaciones. Este resultado indica que el ácido metanoico y el ácido tartárico no afectan negativamente a la estabilidad física de las formulaciones de glucagón.

Ejemplo 5: Estabilidad de los recubrimientos de glucagón en parches de microagujas, efecto del ácido orgánico con LMPC.

Un resumen de las diversas formulaciones se muestra en la Tabla 5 a continuación.

10 La pureza del recubrimiento de glucagón se midió a dos temperaturas: 25°C y 40°C . La comparación entre las formulaciones se muestra en la Figura 13 y los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7 a continuación. Estos resultados demuestran que la formulación que contiene ácido tartárico muestra una mayor estabilidad después de tres meses que la formulación con ácido metanoico, tanto a temperaturas de 25°C como de 40°C .

Tabla 5:

Formulación	Glucagón (mg/mL)	LMPC (mg/mL)	Glutamina (mg/mL)	Ácido orgánico %
A (Ácido metanoico)	200	100	50	5
C (Ácido tartárico)	200	100	50	5

15

Tabla 6: Formulación A

Tiempo (meses)	% (p/p) de pureza	
	25°C	40°C
0	$99,1\% \pm 0,3$	$99,1 \pm 0,3$
1	$98,4 \pm 0,5$	$95,7 \pm 1,5$
3	$97,5 \pm 0,1$	$94,5 \pm 0,6$

Tabla 7: Formulación C

Tiempo (meses)	% (p/p) de pureza	
	25°C	40°C
0	$99,6\% \pm 0,13$	$99,6 \pm 0,13$
1	$99,6 \pm 0,13$	$99,4 \pm 0,02$
3	$99,6 \pm 0,03$	$99,4 \pm 0,06$

20 Ejemplo 6: Estabilidad de los recubrimientos de glucagón sobre parches de microagujas, efecto del ácido orgánico con decanoil sacarosa.

Un resumen de las diversas formulaciones se muestra en la Tabla 8 a continuación.

La pureza del recubrimiento de glucagón se midió a dos temperaturas: 25°C y 40°C. La comparación entre las formulaciones se muestra en la Figura 14 y los resultados se muestran en las Tablas 9 y 10 a continuación. Estos resultados demuestran que la formulación que contiene ácido tartárico muestra una mayor estabilidad después de un mes que la formulación con ácido metanoico a ambas temperaturas.

5

Tabla 8:

Formulación	Glucagón (mg/mL)	Decanoil sacarosa (mg/mL)	Glutamina (mg/mL)	Ácido orgánico %
B (Ácido metanoico)	200	100	50	5
D (Ácido tartárico)	200	100	50	5

Tabla 9: Formulación B

Tiempo (meses)	% (p/p) de pureza	
	25°C	40°C
0	99,5% ± 0,19	99,5 ± 0,19
1	98,2 ± 0,06	92,9 ± 0,31
3	92,9 ± 0,31	92,4 ± 0,17

10

Tabla 10: Formulación D

Tiempo (meses)	% (p/p) de pureza	
	25°C	40°C
0	99,7% ± 0,0	99,7 ± 0,0
1	99,6 ± 0,02	99,5 ± 0,05
3	99,4 ± 0,07	99,2 ± 0,06

Ejemplo 7: Estudio farmacocinético de parches de microagujas recubiertas con glucagón en comparación con una inyección subcutánea.

15

La administración *in vivo* de glucagón se realizó en un modelo de cobaya sin pelo siguiendo los protocolos para animales aprobados por el comité "Institutional Animal Care and Use Committee" (IACUC). Las formulaciones C y D se recubrieron sobre los parches con microagujas a 0,5 mg/3 cm². Los parches se aplicaron sobre la piel y se retiraron después de 1 hora. Una inyección subcutánea (SC) de glucagón se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Lilly - Glucagon Rescue Kit®). Tanto el parche como la inyección se administraron a una dosis de 1 mg/kg.

20

Como se muestra en la Figura 15, los recubrimientos con la formulación C y D proporcionan una liberación rápida y elevada de glucagón tal y como se mide en los niveles séricos. La Tabla 11 muestra que la biodisponibilidad de la administración de glucagón con el parche de microagujas recubiertas con la formulación C o D, es un 83% y 86%, respectivamente, de la observada con la inyección SC. Esto indica que las formulaciones de glucagón se pueden volver a solubilizar eficazmente en la piel y el glucagón administrado es comparable a la inyección de glucagón disponible comercialmente.

25

Tabla 11:

Tratamiento	Dosis (µg)/Animal	Dosis por kg de peso corporal (µg/kg)	Eficacia de la administración (%)	T _{máx} media (minutos)	C _{máx} media (ng/mL)	AUC _t media (ng · h/ml)
Inyección SC	424	1000	N/A	9	95	91
Parque de Glucagón ZP, C 0,5 mg/3 cm ²	497	956	69	13	135	76
Parque de Glucagón ZP, D 0,5 mg/3 cm ²	536	957	65	10	202	79

Las realizaciones de la invención descritas anteriormente se entiende que son meramente ejemplares; numerosas variaciones y modificaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Todas esas variaciones y modificaciones se entiende que están dentro del alcance de la presente invención, tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 8: Estabilidad de los recubrimientos de glucagón sobre un parche de microagujas

Se prepararon dos formulaciones líquidas de glucagón. La Formulación 1 comprende 200 mg/mL de glucagón, 100 mg/mL de LMPC (1-miristoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina), 50 mg/mL de glutamina y 50 mg/mL de ácido tartárico; la Formulación 2 comprende 200 mg/mL de glucagón, 100 mg/mL de decanoil sacarosa (DS), 50 mg/mL de glutamina y 50 mg/mL de ácido tartárico.

Se recubrió una matriz de microagujas con cada formulación líquida de glucagón usando un método de recubrimiento por inmersión. Después de recubrir con glucagón, se prepararon los sistemas para estudios de estabilidad, usando componentes de parche que implicaban un anillo de retención de policarbonato con un agente desecante comolidado y un parche adhesivo de 5 cm². El parche recubierto se termoselló en una bolsa de papel de aluminio purgada con nitrógeno. Los sistemas finales se almacenaron bajo dos condiciones, 25°C/60% de humedad relativa (HR) y 40°C/75% de HR. Los parches recubiertos se evaluaron en tanto a la pureza en momentos determinados, inicial, 1 mes, 3 meses y 6 meses.

Se empleó una RP-HPLC para cuantificar la pureza del glucagón. Las impurezas relacionadas con el glucagón se separaron del glucagón natural usando una columna C18 ACE (3,0 mm ID x 150 mm, 3 µm) mantenida a 45°C. El glucagón eluido se detectó mediante UV a 214 nm. La fase móvil implicaba una elución en gradiente. La fase móvil A comprendía un 80% de tampón fosfato 0,15 M a pH = 2,7, un 20% de acetonitrilo; la fase móvil B comprendía un 60% de agua y un 40% de acetonitrilo. La cromatografía se realizó con un sistema de HPLC (Waters 2695 Alliance, Milford MA) provisto de una bomba binaria, un cargador de muestras automático termostatzado, un compartimento de columna termostatzado y un PAD 996. Los datos fueron recogidos y analizados empleando Empower.

Los datos de estabilidad se muestran en las Figuras 16 y 17 para las Formulaciones 1 y 2 respectivamente. La Tabla 12 resume los datos de pureza de las dos formulaciones en las dos condiciones de almacenamiento. En las condiciones aceleradas de 40°C/75% de HR y cuando se almacenaban a 25°C/60% de HR, el glucagón conservaba una excelente estabilidad dentro del periodo de estudio.

Tabla 12: Resumen de los datos de estabilidad de los sistemas recubiertos con glucagón

Formulación	Composición de la Formulación (cantidades respectivas (mg/mL))	Temperatura (°C)	Pureza del glucagón (% (p/p))			
			Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
1	Ácido tartárico + Glutamina + LMPC (50 mg/mL + 50 mg/mL + 100 mg/mL)	25	99,6 ± 0,1	99,6 ± 0,1	99,6 ± 0,0	99,4 ± 0,14
		40	99,6 ± 0,1	99,4 ± 0,0	99,4 ± 0,1	99,0 ± 0,08
2	Ácido tartárico + Glutamina + DS (50 mg/mL + 50 mg/mL + 100 mg/mL)	25	99,7 ± 0,0	99,6 ± 0,0	99,4 ± 0,1	99,4 ± 0,02
		40	99,7 ± 0,0	99,5 ± 0,1	99,2 ± 0,1	98,8 ± 0,02

Ejemplo 9: Espectros de dicroísmo circular UV lejano de parches recubiertos con glucagón

5 El Parche C recubierto con la Formulación 1 y el Parche D recubierto con la Formulación 2, fueron colocados cada uno en un recipiente de extracción por separado y se añadió 1,0 mL de solución de la disolución a cada recipiente. A continuación, cada solución se agitó durante 2 minutos y se tomó una muestra para la espectroscopía de dicroísmo circular (CD). Cada muestra se analizó también para la DO280 (densidad óptica a una longitud de onda de 280 nm) en una cubeta de cuarzo de 1 mm.

Concentración de proteína NKTT120 mediante mediciones de la DO280

10 La concentración de proteína en solución se determinó mediante la medición de la DO280. Un coeficiente de extinción se calculó basándose en el peso molecular y las contribuciones de los aminoácidos aromáticos. Todas las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 100 UV/Vis. El coeficiente de extinción molar calculado de $8480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ se utilizó para determinar un coeficiente de extinción específico estimado de E2 así, $\text{tcm} = 2,43$ (basándose en un peso molecular de 3482,8 kDa). Se realizó una corrección de la dispersión de la luz restando la absorbancia a 320 nm.

Espectroscopía del dicroísmo circular

15 Un Modelo Aviv 202 con una celda controlada con temperatura controlada por peltier se utilizó para recoger todos los espectros de CD. Todos los espectros se recogieron a 25°C en cubetas de cuarzo. Las cubetas de cuarzo se analizaron usando ácido canforsulfónico (CSA) para medir longitudes de trayectoria precisa de todas las celdas utilizadas. La celda de 0,1 mm se midió a 0,089 mm y la celda de 0,01 mm se midió a 0,0165 mm. Todos los espectros de CD se indican en unidades de elipticidad residual media (θ) usando un peso molecular de 3482,8 kDa y 29
20 residuos.

25 Los espectros de dicroísmo circular (CD) de UV lejano (FUV) para glucagón extraído a partir de dos parches (Parche C y Parche D), mostrados en la Figura 18, son compatibles con un péptido de glucagón en una conformación predominantemente α -helicoidal en forma de un trímero soluble o un monómero helicoidal soluble, a diferencia de la estructura rica en lámina β en las fibrillas de glucagón. Los espectros también son compatibles con un péptido en un trímero soluble o un monómero helicoidal soluble. Como todavía hay una cantidad significativa de estructura de espiral aleatoria, esto también es compatible con el glucagón monomérico.

Listado de secuencias

<110> Zosano Pharma, Inc. Ameri, Mahmoud Daddona, Peter E. Ao, Yi

<120> Formulaciones estables de péptido glucagón

<130> 3910/1202WO

5

<150>61/868,969

<151> 2013-08-22

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

10

<210>1

<211>29

<212>PRT

<213> Homo sapiens

<400>1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

15

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica líquida que comprende

- a. 15-20% (p/p) de glucagón;
- b. 7,5-10% (p/p) de un agente estabilizante seleccionado a partir de un tensioactivo catiónico o neutro;
- 5 c. 3,75-5% (p/p) de un aminoácido seleccionado a partir del grupo que consiste en glutamina y glicina;
- d. 3,75-5% (p/p) de un ácido orgánico seleccionado a partir del grupo que consiste en ácido metanoico, ácido etanoico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido glicólico, ácido málico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido caproico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido propiónico y ácido sórbico; y
- e. un diluyente farmacéuticamente aceptable; y

10 en donde la formulación tiene un pH entre 2 y 3.

2. La formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en donde la formulación tiene una viscosidad en el intervalo de 20-200 cP.

3. Una formulación farmacéutica sólida que comprende

- a. 40-50% (p/p) de glucagón;
- 15 b. 20-25% (p/p) de un agente estabilizante seleccionado a partir de un tensioactivo catiónico o neutro;
- c. 10-12,5% (p/p) de un aminoácido seleccionado a partir del grupo que consiste en glutamina y glicina;
- d. 10-12,5% (p/p) de un ácido orgánico seleccionado a partir del grupo que consiste en ácido metanoico, ácido etanoico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido glicólico, ácido málico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido caproico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido propiónico y ácido sórbico; y

20 en donde la formulación tiene un pH entre 2 y 3.

4. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que tiene uno o varios de los siguientes casos:

- (i) en donde el tensioactivo es un fosfolípido, en donde el fosfolípido es preferiblemente liso-miristoil fosfatidilcolina,
- 25 (ii) en donde el tensioactivo es decanoil sacarosa,
- (iii) en donde el aminoácido es glutamina,
- (iv) en donde el ácido orgánico se selecciona a partir del grupo que consiste en ácido metanoico y ácido tartárico,
- 30 (v) en donde el tensioactivo es decanoil sacarosa, el aminoácido es glutamina y el ácido orgánico es ácido tartárico,
- (vi) en donde el tensioactivo es decanoil sacarosa, el aminoácido es glutamina y el ácido orgánico es ácido metanoico,
- (vii) en donde el tensioactivo es liso-miristoil fosfatidilcolina, el aminoácido es glutamina y el ácido orgánico es ácido tartárico, o
- 35 (viii) en donde el tensioactivo es liso-miristoil fosfatidilcolina, el aminoácido es glutamina y el ácido orgánico es ácido metanoico.

5. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde se aplica uno o varios de los siguientes casos:

- 40 (i) en donde el tensioactivo es un fosfolípido, en donde el fosfolípido es preferiblemente liso-miristoil fosfatidilcolina,
- (ii) en donde el tensioactivo se selecciona a partir del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, trehalosa y dextrosa, en donde dicho tensioactivo está sustituido con una cadena de alquilo C8-C12,
- (iii) en donde el aminoácido es glicina,

- (iv) en donde el ácido orgánico se selecciona a partir del grupo que consiste en ácido metanoico, ácido etanoico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido glicólico, ácido málico, ácido glucónico y ácido cítrico,
- (v) en donde el tensioactivo es decanoil sacarosa, el aminoácido es glicina y el ácido orgánico es ácido metanoico,
- 5 (vi) en donde el tensioactivo es decanoil sacarosa, el aminoácido es glicina y el ácido orgánico es ácido tartárico,
- (vii) en donde el tensioactivo es liso-miristoil fosfatidilcolina, el aminoácido es glicina y el ácido orgánico es ácido metanoico, y
- 10 (viii) en donde el tensioactivo es liso-miristoil fosfatidilcolina, el aminoácido es glicina y el ácido orgánico es ácido tartárico.
6. Un dispositivo médico para la administración de un agente farmacéutico a través de la piel, comprendiendo el dispositivo una matriz de microagujas que está recubierta con una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, siendo portador de una dosis terapéutica de glucagón de 0,25 - 2,0 mg, preferiblemente 0,5 - 1 mg.
- 15 7. El dispositivo médico según la reivindicación 6, en el que la matriz de microagujas tiene un tamaño de 2,5 cm² a 8 cm².
8. El dispositivo médico según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, que comprende además un dispositivo de despliegue y un anillo de retención, en donde cuando se presiona el dispositivo de despliegue, la matriz de microagujas se desprende del anillo de retención.
- 20 9. El dispositivo médico según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, preparado por medio de:
- a. un recubrimiento con una formulación farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 sobre la matriz de microagujas; y
 - b. un secado de la composición farmacéutica.
10. El dispositivo médico según la reivindicación 9, en donde el recubrimiento se selecciona a partir de:
- 25 a: un recubrimiento por inmersión
- b: una pulverización.
11. La formulación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o el dispositivo médico según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en donde la estabilidad de dicha formulación farmacéutica se conserva después de un almacenamiento a una temperatura seleccionada a partir de un intervalo que consiste en (i) de 0-50°C, (ii) 4-42°C y (iii) 25-40°C y una humedad relativa seleccionada a partir de un intervalo que consiste en (i) de 0-100%, (ii) 25-85% y (iii) 60-75%.
- 30

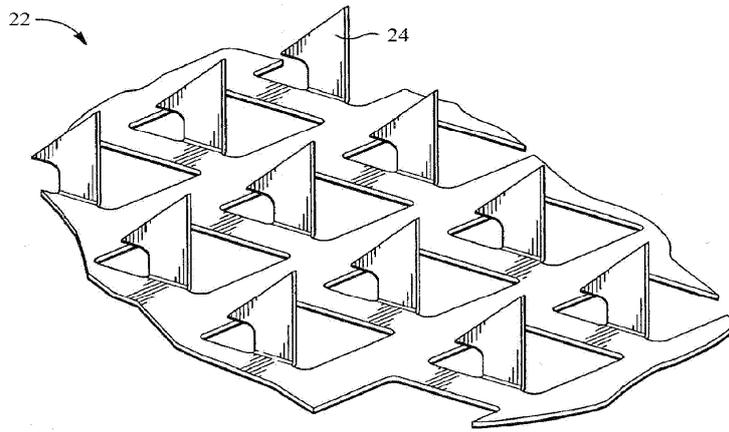


Fig. 1

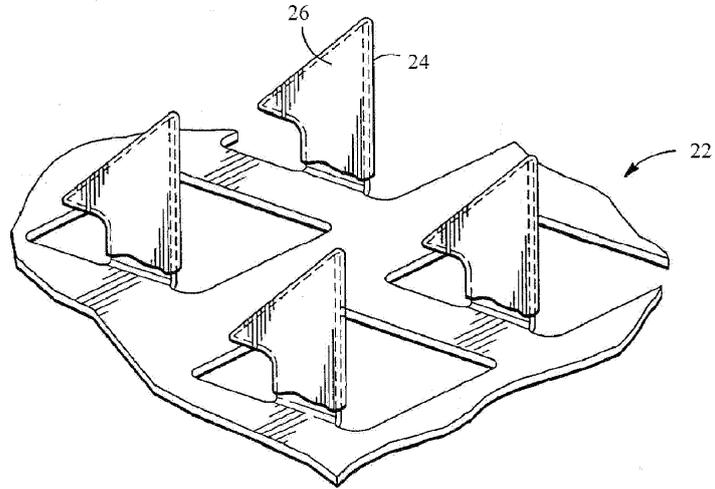


Fig. 2

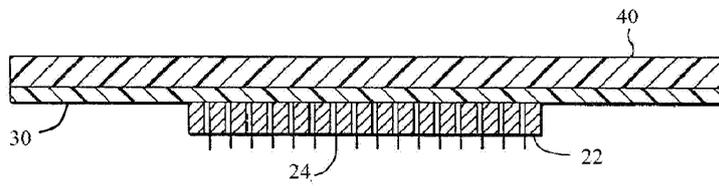


Fig. 3

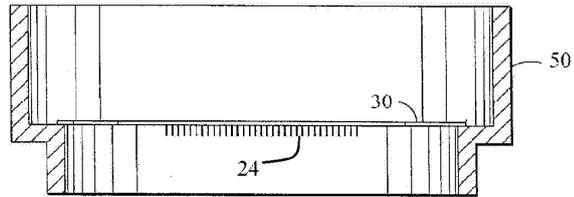


Fig. 4

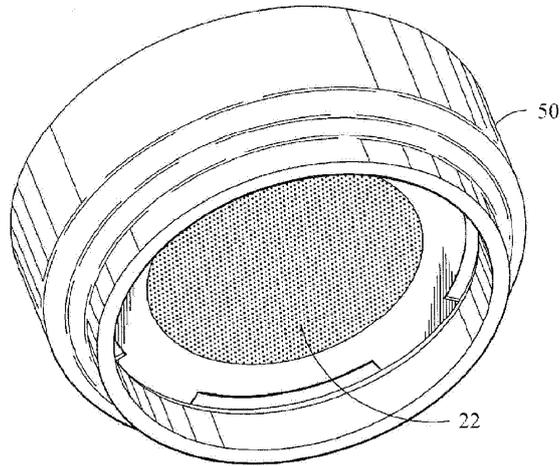


Fig. 5

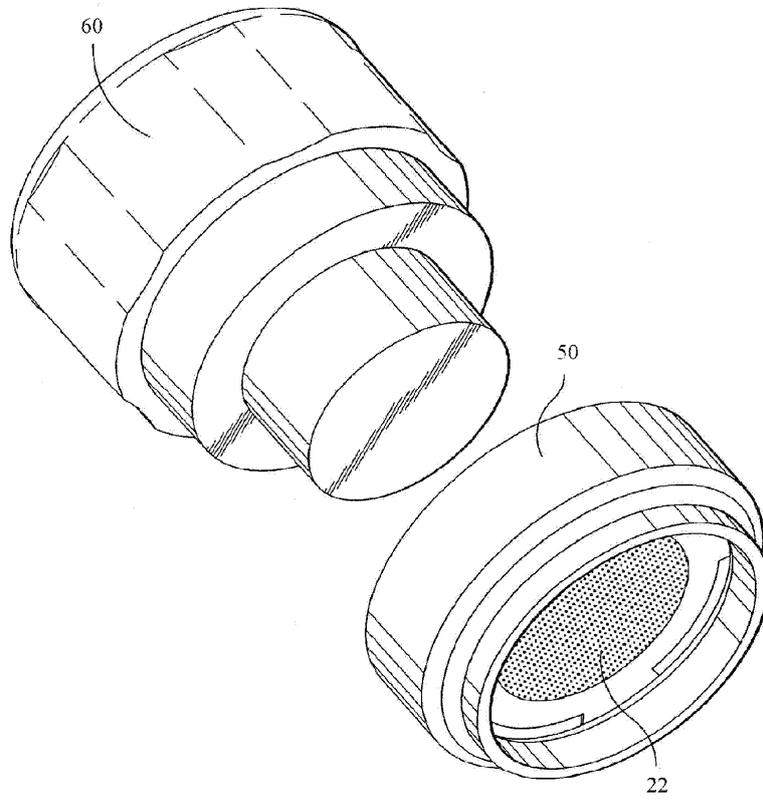


Fig. 6

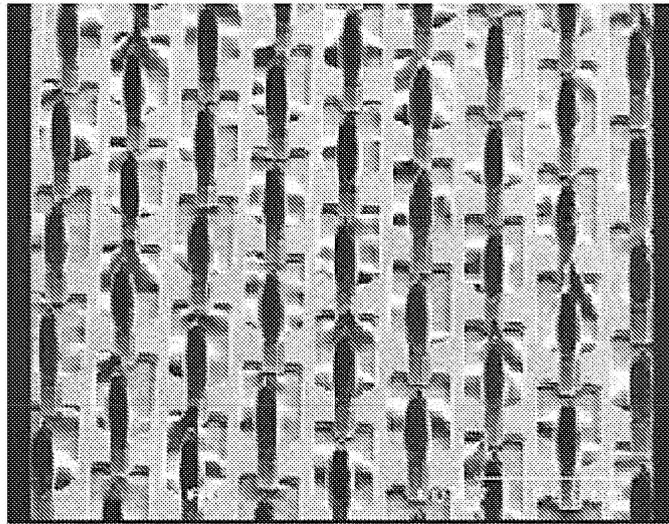


Fig. 7

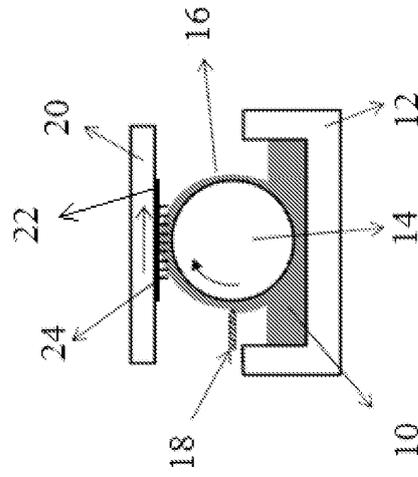


Fig. 8A

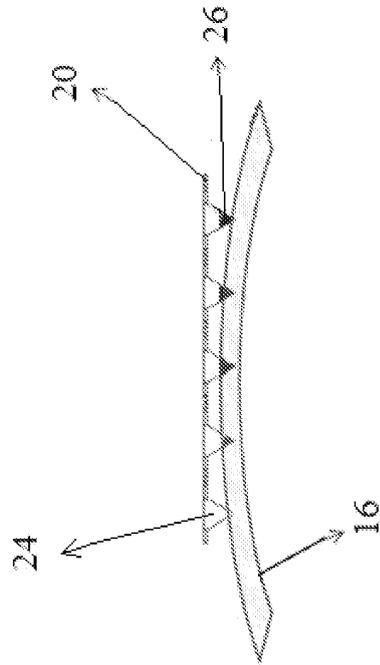


Fig. 8B

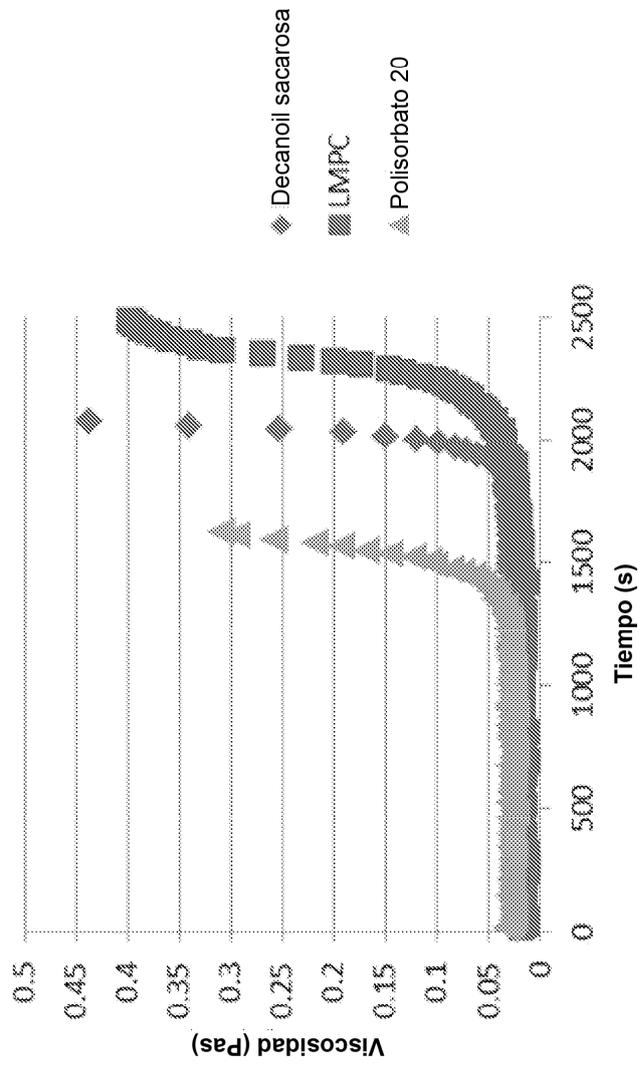


Fig. 9

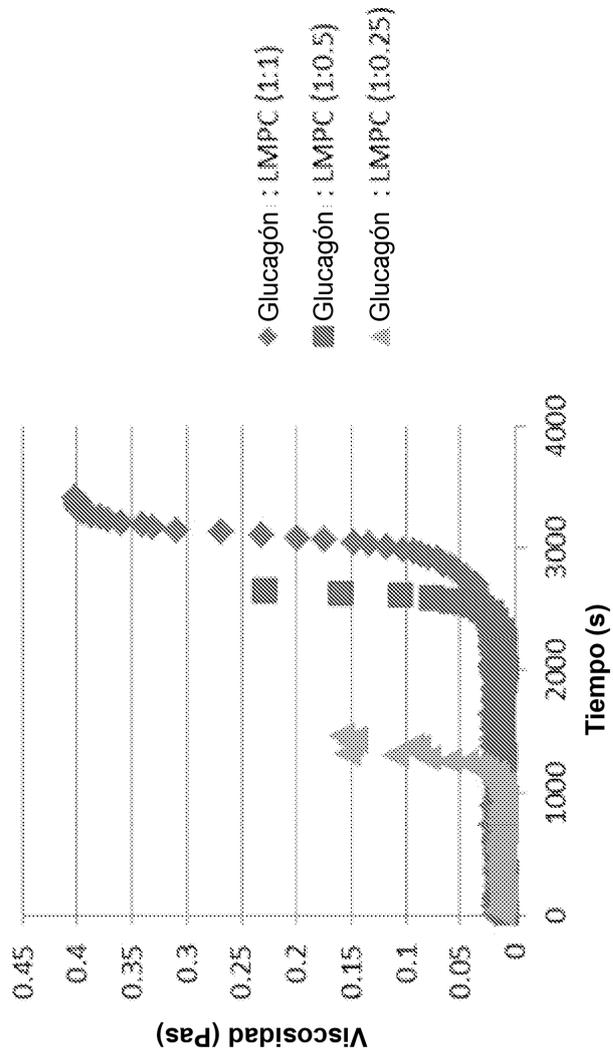


Fig. 10

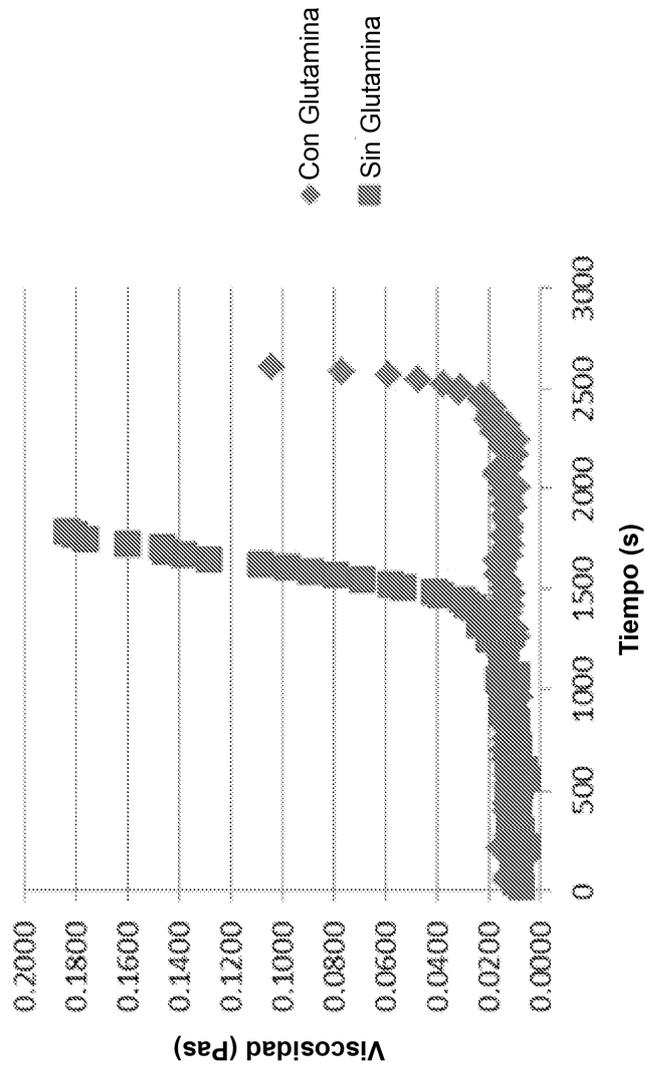


Fig. 11

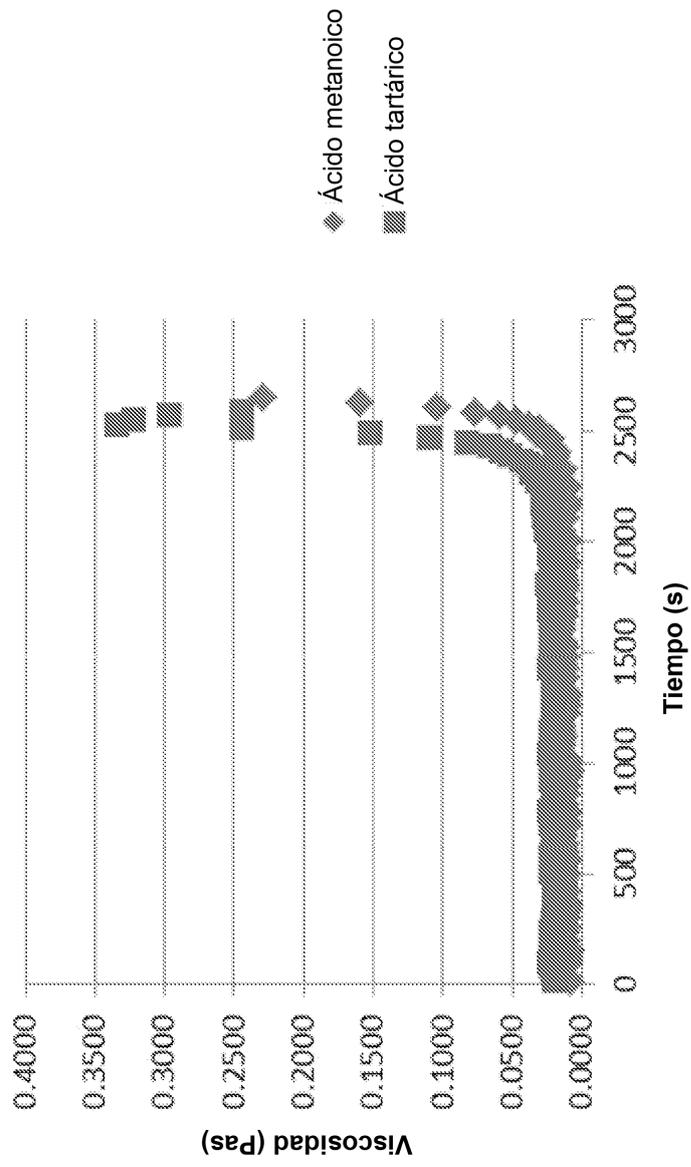


Fig. 12

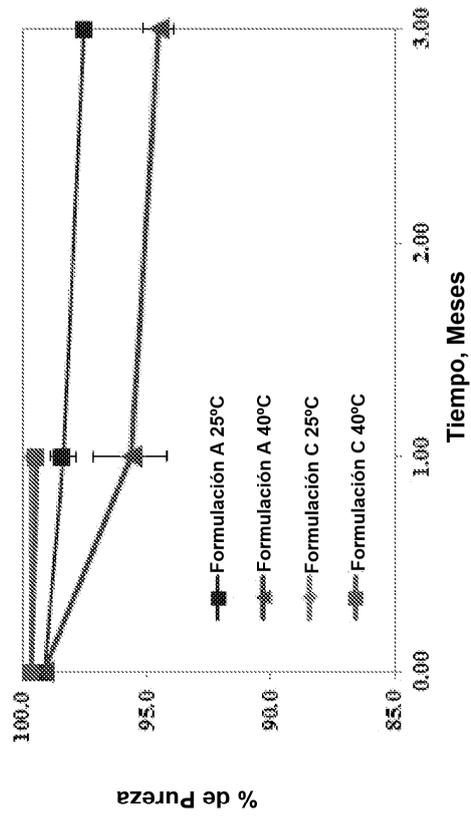


Fig. 13

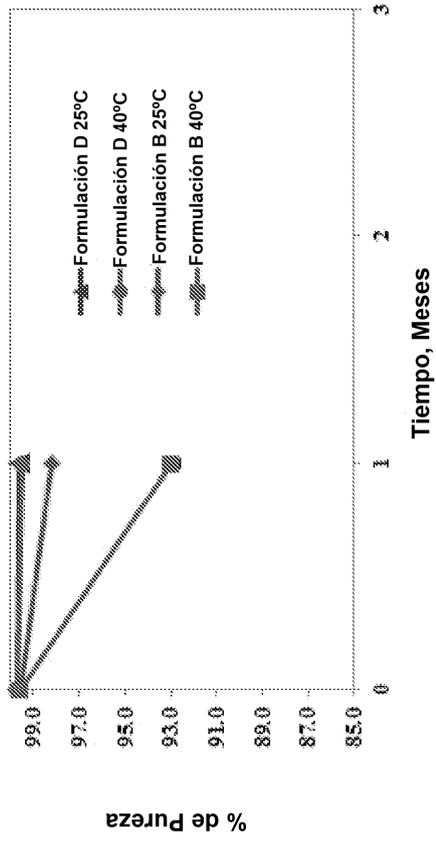


Fig. 14

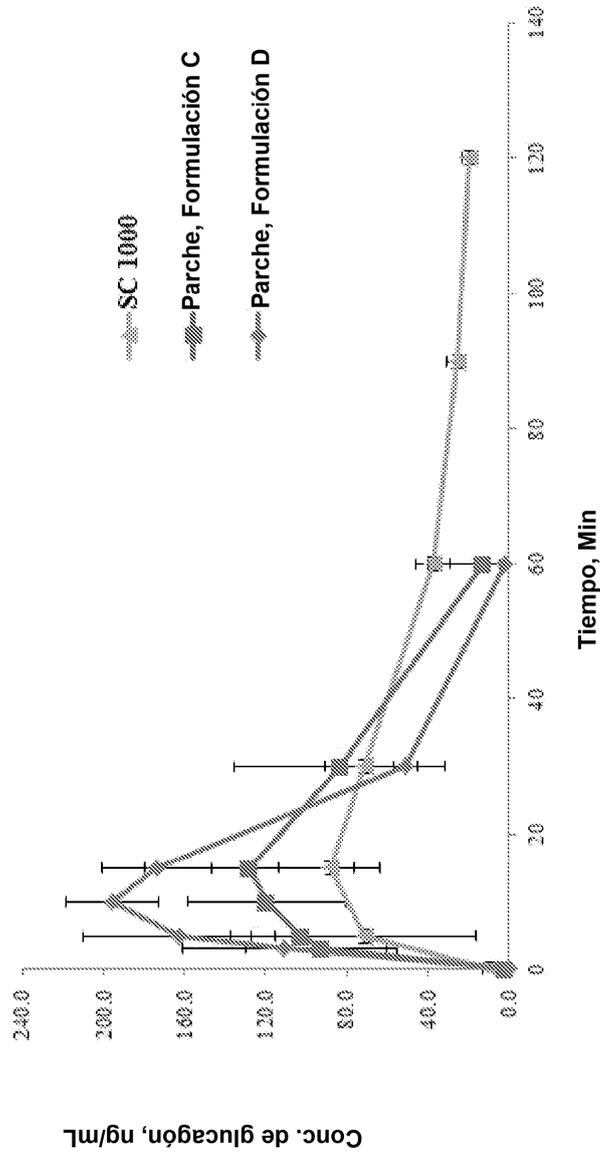


Fig. 15

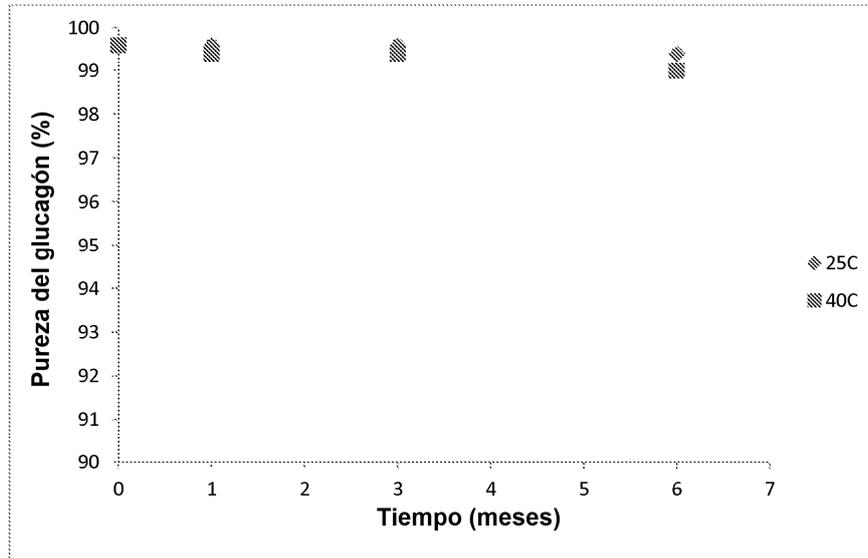


Fig. 16

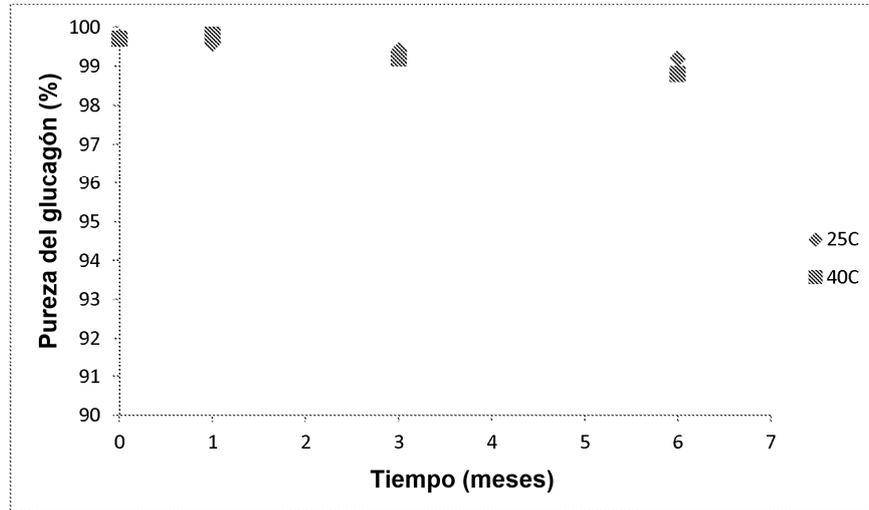


Fig. 17

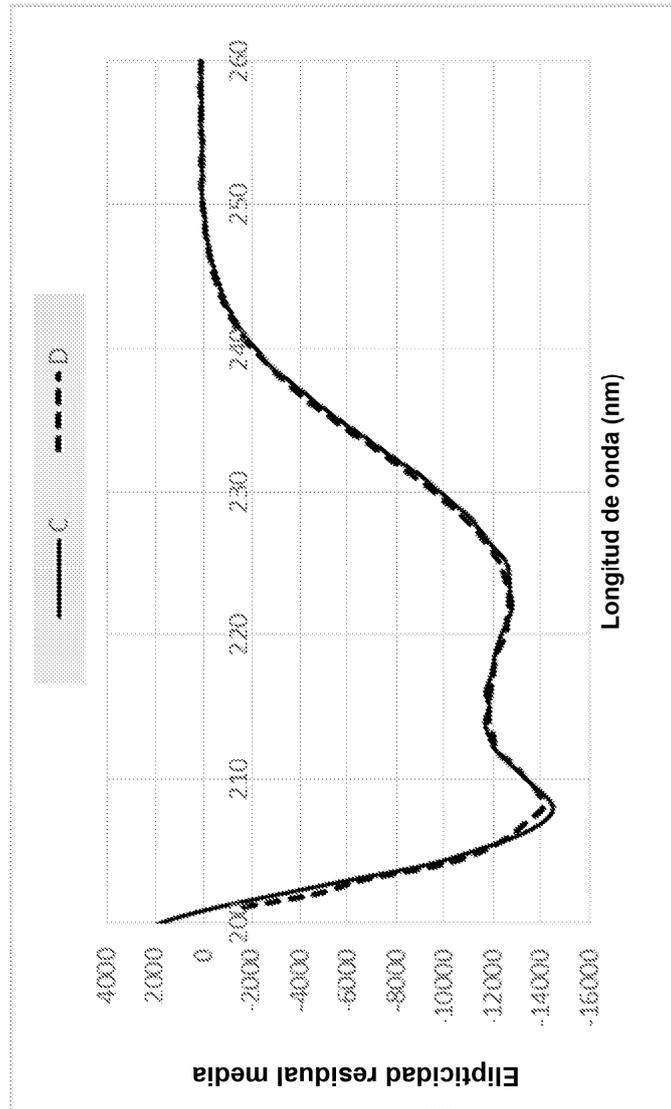


Fig. 18