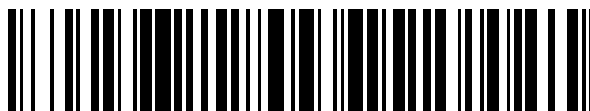


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 980**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/50</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/16</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/20</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/48</b>	(2006.01)
<b>A61J 3/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2009 PCT/US2009/004675**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2010 WO10019266**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2009 E 09789142 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 2328601**

54 Título: **Formulaciones que contienen linaclotida para administración oral**

30 Prioridad:

**15.08.2008 US 89422 P**  
**03.08.2009 US 273332 P**  
**06.08.2009 US 231725 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.10.2020**

73 Titular/es:

**IRONWOOD PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**301 Binney Street**  
**Cambridge, Massachusetts A 02142, US**

72 Inventor/es:

**FRETZEN, ANGELIKA;**  
**WITOWSKI, STEVEN;**  
**GROSSI, ALFREDO;**  
**ZHAO, HONG;**  
**DEDHIYA, MAHENDRA y**  
**MO, YUN**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 785 980 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 que contienen linaclotida para administración oral

## 5 CAMPO

**[0001]** Esta divulgación se refiere a formulaciones sólidas de un polipéptido agonista de receptor de guanilato ciclasa C adecuado para la administración oral y procedimientos para preparar dichas formulaciones.

## 10 ANTECEDENTES

**[0002]** Muchos polipéptidos terapéuticos se formulan en solución acuosa porque son más activos en esta forma. Andersen et al. *Gastroenterology* 133, 3. 2007. 761-768, Andresen-V. et al. 33, 7. 2008. 570-576 y Forest Microbia. *Communication of Microbia*. 2008. 1-4 describen diversas formas de administración de linaclotida. Sin embargo, la mayoría de polipéptidos no son particularmente estables en solución acuosa, de modo que las formulaciones a menudo tienen una vida media corta y requieren refrigeración. Aunque las soluciones acuosas de polipéptidos pueden secarse por liofilización, secado por pulverización u otros procedimientos, tales formulaciones secas también pueden ser inestables y tener una actividad reducida con respecto a una solución acuosa del polipéptido. Los mecanismos de descomposición típicos que tienen lugar en solución acuosa y en formulaciones secas incluyen agregación y degradación oxidativa o hidrolítica. Por lo tanto, la mayoría de los polipéptidos terapéuticos, ya sea en solución acuosa o secos, se almacenan en condiciones refrigeradas debido a su estabilidad limitada.

**[0003]** La linaclotida es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr que activa el receptor de guanilato ciclasa-C (GC-C). La linaclotida, que puede administrarse por vía oral, es útil para el tratamiento de trastornos y afecciones gastrointestinales, incluido el síndrome del intestino irritable (IBS) y el estreñimiento crónico (CC). Las formulaciones que comprenden linaclotida han tenido que refrigerarse para evitar la degradación con el tiempo. Sin embargo, la refrigeración es inconveniente tanto para la distribución comercial del medicamento como para el almacenamiento por parte de los pacientes. Por lo tanto, existe la necesidad de tener una formulación sólida de linaclotida que sea estable a temperatura ambiente durante al menos 12 meses.

## CARACTERÍSTICAS

**[0004]** La presente invención se dirige a composiciones farmacéuticas y materia relacionada, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.

**[0005]** De manera más general, la presente divulgación proporciona formulaciones sólidas, estables, de linaclotida adecuada para la administración oral, así como procedimientos para preparar tales formulaciones. Las formulaciones descritas en este documento contienen un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr ("linaclotida") o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma según la reivindicación 1.

**[0006]** Las formulaciones de linaclotida descritas en este documento son estables y tienen una vida útil suficiente para la fabricación, almacenamiento y distribución del fármaco. Por ejemplo, se espera que las formulaciones descritas en este documento tengan una vida útil de al menos 12 meses en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente (por ejemplo, 25 °C/60% de humedad relativa (HR)). En realizaciones adicionales, se espera que las formulaciones descritas en el presente documento tengan una vida útil de al menos 18 meses o al menos 24 meses en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente (por ejemplo, 25°C/60% de HR).

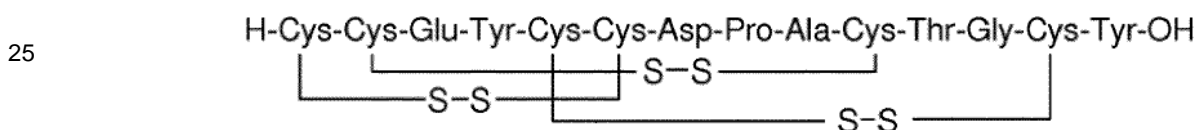
**[0007]** En algunas realizaciones, se describen formulaciones en las que  $\geq 95\%$  de la cantidad original de la linaclotida en la composición permanece después de tres meses cuando las muestras envasadas se almacenan en condiciones aceleradas (40 °C/75% de HR) cuando se evaluaron en un ensayo en una base de peso/peso determinada mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) contra un patrón de referencia de linaclotida. En realizaciones adicionales,  $\geq 90\%$  de la cantidad original de linaclotida en la composición permanece después de al menos 6 meses cuando las muestras envasadas se almacenan en condiciones aceleradas (40 °C/75% de HR). En otras realizaciones, se describen formulaciones en las que la pureza cromatográfica de la linaclotida, determinada como porcentaje de área mediante HPLC, permanece en  $\geq 95\%$  en el transcurso de al menos tres meses cuando las muestras envasadas se almacenan en condiciones aceleradas (40 °C/75% de HR). En realizaciones adicionales, la pureza cromatográfica de la linaclotida determinada mediante el porcentaje de área mediante HPLC permanece en  $\geq 90\%$  en el transcurso de al menos 6 meses cuando las muestras envasadas se almacenan en condiciones aceleradas (40 °C/75% de HR). Así, por ejemplo, no más de aproximadamente el 10% de la linaclotida sufre degradación a otros productos, tal como un producto de oxidación de linaclotida, un producto de hidrólisis de linaclotida o un producto de imina mediada por formaldehído de linaclotida ("producto de formaldehído imina").

65

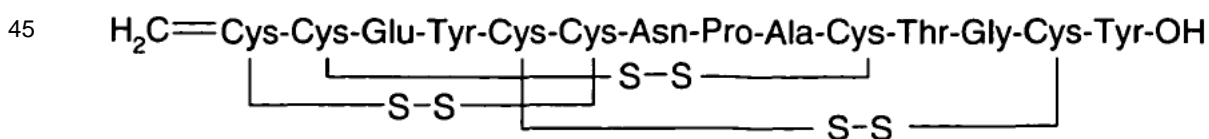


realización adicional, el valor del ensayo para linaclotida determinado en una base de peso/peso disminuye en menos del 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% después de 3 meses o 6 meses de almacenamiento de la forma de dosificación unitaria a 40 °C al 75% de humedad relativa en un recipiente sellado que contiene un desecante.

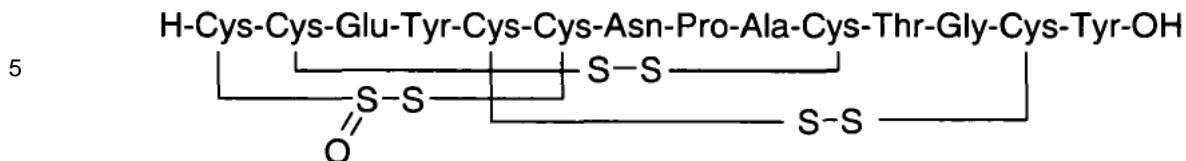
- 5 **[0013]** En una realización, la divulgación comprende un recipiente sellado que comprende una pluralidad de formas de dosificación unitarias de una composición farmacéutica que comprende linaclotida, en el que el valor de ensayo para la linaclotida determinado en una base de peso/peso disminuye en menos de 10% después de 18 meses o 24 meses de almacenamiento del recipiente sellado a 25 °C al 60% de humedad relativa en un recipiente sellado que contiene un desecante. En una realización adicional, el valor del ensayo para la linaclotida determinado en una base de peso/peso disminuye en menos del 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% después de 18 meses o 24 meses de almacenamiento del recipiente sellado que contiene un desecante a 25 °C y 60% de humedad relativa. En otra realización, la divulgación comprende un recipiente sellado que comprende una pluralidad de formas de dosificación unitarias de una composición farmacéutica que comprende linaclotida, en el que el valor de ensayo para linaclotida determinado en una base de peso/peso disminuye en menos del 10% después de 3 meses o 6 meses de almacenamiento del recipiente sellado que contiene un desecante a 40 °C al 75% de humedad relativa. En una realización adicional, el valor del ensayo para linaclotida determinado en una base de peso/peso disminuye en menos del 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% después de 3 meses o 6 meses de almacenamiento del recipiente sellado que contiene un desecante a 40 °C al 75% de humedad relativa.
- 20 **[0014]** En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende linaclotida y un producto de hidrólisis que comprende:



- 30 **[0015]** En algunas realizaciones, el producto de hidrólisis comprende menos de aproximadamente 15% en peso de la composición, menos de aproximadamente 10% en peso de la composición, menos de aproximadamente 7% en peso de la composición o menos de aproximadamente 5% en peso de la composición. En otras realizaciones, el producto de hidrólisis comprende de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 15% en peso de la composición, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 10% en peso de la composición, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 7% en peso de la composición o de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 5% en peso de la composición. En realizaciones adicionales, se proporciona un procedimiento para tratar un trastorno gastrointestinal en un paciente que lo necesite que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende linaclotida y un producto de hidrólisis.
- 40 **[0016]** En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende linaclotida y un producto de formaldehído imina que comprende:



- 50 **[0017]** En algunas realizaciones, el producto de formaldehído imina comprende menos de aproximadamente 15% en peso de la composición, menos de aproximadamente 10% en peso de la composición, menos de aproximadamente 7% en peso de la composición o menos de aproximadamente 5% en peso de la composición. En otras realizaciones de ejemplo, el producto de formaldehído imina comprende de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 15% en peso de la composición, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 10% en peso de la composición, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 7% en peso de la composición o de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 5% en peso de la composición. En realizaciones adicionales, se proporciona un procedimiento para tratar un trastorno gastrointestinal en un paciente que lo necesite que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende linaclotida y un producto de formaldehído imina.
- 60 **[0018]** En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende linaclotida y un producto de oxidación de linaclotida. En una realización, el producto de oxidación de linaclotida tiene un peso molecular de 1542,8, que probablemente se forma como la adición de un solo átomo de oxígeno a uno de los seis azufres de cisteinilo en linaclotida. A continuación se muestra una estructura potencial del producto, aunque un experto en la materia reconocerá que el átomo de oxígeno puede estar unido a cualquiera de los otros cinco azufres:
- 65



**[0019]** En otra realización, puede haber una adición de más de un átomo de oxígeno a linaclozida, lo que aumentaría su peso molecular en 16 UA por átomo de oxígeno añadido.

**[0020]** En algunas realizaciones, el producto de oxidación de linaclozida comprende menos de aproximadamente 15% en peso de la composición, menos de aproximadamente 10% en peso de la composición, menos de aproximadamente 7% en peso de la composición o menos de aproximadamente 5% en peso de la composición. En otras realizaciones de ejemplo, el producto de oxidación de linaclozida comprende de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 15% en peso de la composición, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 10% en peso de la composición, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 7% en peso de la composición o de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 5% en peso de la composición. En realizaciones adicionales, se proporciona un procedimiento para tratar un trastorno gastrointestinal en un paciente que lo necesite que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende linaclozida y un producto de oxidación de linaclozida.

**[0021]** El valor de ensayo sobre una base de peso/peso ("ensayo de peso/peso") se puede determinar mediante la comparación, por ejemplo, mediante HPLC, de la cantidad de linaclozida en una muestra, con un patrón de referencia de linaclozida. Tal como se usa en el presente documento, el peso de linaclozida en una composición después del almacenamiento a temperatura ambiente o condiciones aceleradas en un punto de tiempo especificado (por ejemplo, tres o seis meses de almacenamiento en condiciones aceleradas [40 °C/75% de HR] o 12, 18 o 24 meses de almacenamiento en condiciones de temperatura ambiente [25 °C/60% de HR]) se compara con el peso de linaclozida en una composición en un momento inicial (por ejemplo, el momento en que se libera la composición farmacéutica para uso clínico o del paciente ("la fecha de liberación")) para proporcionar el valor de ensayo de peso/peso. Por ejemplo, el peso de linaclozida en una composición se mide después del almacenamiento durante un tiempo especificado en condiciones aceleradas (40 °C/75% de HR) y se compara con el peso de linaclozida que estaba presente en la muestra en la fecha de liberación. En otro ejemplo, el peso de linaclozida en una composición se mide después del almacenamiento durante un tiempo específico en condiciones de temperatura ambiente (25 °C/60% de HR) y se compara con el peso de linaclozida que estaba presente en la muestra en la fecha de liberación. Por lo tanto, la frase "≥ 90% de la cantidad original de linaclozida en la composición permanece después de al menos 6 meses cuando las muestras envasadas se almacenan en condiciones aceleradas (40 °C/75% de HR)" significa el peso de linaclozida en la composición medido en un ensayo en una base de peso/peso según lo determinado mediante HPLC después de al menos 6 meses de almacenamiento en condiciones aceleradas es ≥ 90% de la cantidad de linaclozida en la composición presente en el momento inicial (por ejemplo, la fecha de liberación de la composición de linaclozida).

**[0022]** La pureza cromatográfica de linaclozida se puede evaluar realizando HPLC en las condiciones descritas en este documento. El área debajo del pico de linaclozida se mide y se compara con el área total debajo de todos los picos, excluyendo el pico de disolvente y cualquier pico no relacionado con el polipéptido (es decir, picos asociados con excipientes que pueden observarse en un placebo). Tal como se usa en este documento, la pureza cromatográfica de linaclozida en una composición después del almacenamiento a temperatura ambiente o condiciones aceleradas en un punto de tiempo especificado (por ejemplo, tres o seis meses de almacenamiento en condiciones aceleradas [40 °C/75% de HR] o 12, 18 o 24 meses de almacenamiento en condiciones de temperatura ambiente [25 °C/60% de HR]) se compara con la pureza cromatográfica de linaclozida en una composición en un momento inicial (por ejemplo, el momento en que la composición farmacéutica se libera para uso clínico o del paciente ("la fecha de liberación")) para proporcionar el valor de pureza cromatográfica. Por ejemplo, la pureza cromatográfica de linaclozida en una composición se mide después del almacenamiento durante un tiempo especificado en condiciones aceleradas (40 °C/75% de HR) y se compara con la pureza cromatográfica de linaclozida en la composición en la fecha de liberación. En otro ejemplo, la pureza cromatográfica de linaclozida en una composición se mide después del almacenamiento durante un tiempo especificado en condiciones de temperatura ambiente (25 °C/60% de HR) y se compara con la pureza cromatográfica de linaclozida en la composición en la fecha de liberación.

**[0023]** Esta divulgación presenta un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende linaclozida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar una solución, por ejemplo, una solución acuosa ("la solución de recubrimiento"), que comprende: (i) linaclozida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) un catión seleccionado de Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> o Al<sup>3+</sup> y/o una amina primaria impedida estéricamente (por ejemplo, leucina) y, opcionalmente, (iii) un aglutinante farmacéuticamente aceptable; y (b) aplicar la solución de recubrimiento a una carga farmacéuticamente aceptable para generar una carga recubierta de polipéptido (por ejemplo, pulverizando, mezclando o recubriendo la carga

farmacéuticamente aceptable con la solución de recubrimiento). El procedimiento puede incluir opcionalmente uno o más de: (i) mezclar la carga recubierta de polipéptido con un deslizante farmacéuticamente aceptable, un lubricante farmacéuticamente aceptable o un aditivo farmacéuticamente aceptable que actúa como deslizante y como lubricante; (ii) mezclar la carga recubierta de polipéptido con una carga que no está recubierta de polipéptido, (iii) 5 mezclar la carga recubierta de polipéptido con otros aditivos; (iii) aplicar un aditivo de recubrimiento farmacéuticamente aceptable a la carga recubierta de polipéptido. La composición farmacéutica final puede colocarse en cápsulas (por ejemplo, cápsula de gelatina) o usarse para formar comprimidos.

**[0024]** Se ha encontrado que un catión seleccionado de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  o  $Al^{3+}$  es útil para suprimir la 10 formación de un producto de oxidación de linaclotida durante almacenamiento. También se ha encontrado que una amina primaria impedida estéricamente, por ejemplo, leucina, es útil para suprimir la formación de un aducto de formaldehído imina de linaclotida ("producto de formaldehído imina") durante el almacenamiento. Por lo tanto, una formulación de linaclotida que comprende un catión seleccionado de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  o  $Al^{3+}$  (por 15 ejemplo, un catión divalente seleccionado de  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ ) y/o una amina primaria impedida estéricamente, tal como un aminoácido, tiene una vida útil suficiente (medida por la pureza cromatográfica y/o mediante un ensayo de peso/peso) para fabricar, almacenar y distribuir el medicamento. Además, aunque la presencia de una amina impedida estéricamente solo puede aumentar la formación de un producto de hidrólisis de linaclotida durante el almacenamiento, la combinación de una amina primaria impedida estéricamente y un catión, por ejemplo, la combinación de leucina y  $Ca^{2+}$ , suprime la formación del producto de hidrólisis de linaclotida, así como el producto 20 de oxidación de linaclotida durante el almacenamiento, lo que conduce a una estabilidad general aún mayor según lo determinado mediante el ensayo de peso/peso y/o por pureza cromatográfica.

**[0025]** En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable, linaclotida y uno o más agentes seleccionados de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  o 25  $Al^{3+}$  y una amina primaria impedida estéricamente, en la que el agente mejora al menos un atributo de la composición en relación con una composición farmacéutica sin dicho agente. En realizaciones adicionales, el agente es  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  o  $Zn^{2+}$ . En una realización adicional, el agente es  $Ca^{2+}$ . En algunas realizaciones, el catión se proporciona como, sin limitación, acetato de magnesio, cloruro de magnesio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, acetato de calcio, cloruro de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, acetato de zinc, cloruro de zinc, 30 fosfato de zinc, sulfato de zinc, acetato de manganeso, cloruro de manganeso, fosfato de manganeso, sulfato de manganeso, acetato de potasio, cloruro de potasio, fosfato de potasio, sulfato de potasio, acetato de sodio, cloruro de sodio, fosfato de sodio, sulfato de sodio, acetato de aluminio, cloruro de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio. En realizaciones adicionales, el catión se proporciona como cloruro de magnesio, cloruro de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, acetato de zinc, cloruro de manganeso, cloruro de potasio, cloruro de sodio o cloruro de 35 aluminio. En otras realizaciones, el catión se proporciona como cloruro de calcio, cloruro de magnesio o acetato de zinc.

**[0026]** En otra realización, el agente es una amina primaria impedida estéricamente. En una realización adicional, la amina primaria impedida estéricamente es un aminoácido. En otra realización, el aminoácido es un aminoácido 40 natural. En otra realización adicional, el aminoácido natural se selecciona del grupo que consiste en: histidina, fenilalanina, alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, leucina, metionina, asparagina, tirosina, treonina, isoleucina, triptófano, metionina y valina; aún más, el aminoácido natural es leucina, isoleucina, alanina o metionina; en otra realización, el aminoácido natural es leucina o metionina; aún más, el aminoácido natural es la leucina. En otra realización, la amina primaria impedida estéricamente es un aminoácido o derivado de aminoácido 45 no natural (por ejemplo, ácido 1-aminociclohexano carboxílico, lantionina o teanina). En una realización adicional, la amina primaria impedida estéricamente es ciclohexilamina, 2-metilbutilamina o quitosano.

**[0027]** En otras realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable, linaclotida, un catión seleccionado de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  o  $Al^{3+}$  (por 50 ejemplo, un catión divalente seleccionado entre  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ ) y una amina primaria impedida estéricamente. En una realización, el catión es  $Ca^{2+}$ . En otra realización, el catión es una mezcla de dos o tres de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  o  $Al^{3+}$  (por ejemplo, una mezcla de dos o tres de  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ ). En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende además un aglutinante farmacéuticamente aceptable y/o un deslizante farmacéuticamente aceptable, lubricante o aditivo que actúa como deslizante y como lubricante y/o antioxidante. En 55 una realización adicional, la amina primaria impedida estéricamente es un aminoácido. En otra realización, el aminoácido es un aminoácido natural. En otra realización adicional, el aminoácido natural se selecciona del grupo que consiste en: histidina, fenilalanina, alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, leucina, metionina, asparagina, tirosina, treonina, isoleucina, triptófano, metionina y valina; aún más, el aminoácido natural es leucina, isoleucina, alanina o metionina; en otra realización, el aminoácido natural es leucina o metionina; aún más, el 60 aminoácido natural es la leucina. En otra realización, la amina primaria impedida estéricamente puede ser una mezcla de más de una amina primaria impedida estéricamente. Por ejemplo, la amina primaria impedida estéricamente puede ser una mezcla de dos o más aminas primarias impedidas estéricamente, por ejemplo, una mezcla de dos o más aminoácidos.

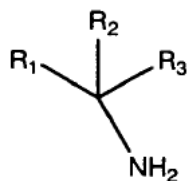
65 **[0028]** En algunos casos la relación molar de catión:amina primaria impedida estéricamente:linaclotida (por ejemplo,  $Ca^{2+}$ :leucina:linaclotida) en la solución acuosa aplicada al portador es 5-100:5-50:1. Puede ser deseable que la

relación molar de catión:amina primaria impedida estéricamente (por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ :leucina) sea igual o mayor que 2:1 (por ejemplo, entre 5:1 y 2:1). Por lo tanto, en algunos casos, la relación molar de catión:amina primaria impedida estéricamente:linaclotida (por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ :leucina:linaclotida) aplicada al portador es 100:50:1, 100:30:1, 80:40:1, 80:30:1, 80:20:1, 60:30:1, 60:20:1, 50:30:1, 50:20:1, 40:20:1, 20:20:1, 10:10:1, 10:5:1 o 5:10:1. Cuando el aglutinante, por ejemplo, metilcelulosa, está presente en la solución de linaclotida aplicada al portador, puede estar presente en 0,5% - 2,5% en peso (por ejemplo, 0,7% - 1,7% o 0,7% - 1% o 1,5% o 0,7%).

**[0029]** El peso de la linaclotida aplicada a un peso dado de carga (por ejemplo, celulosa microcristalina) puede variar de aproximadamente 0,02:100 a aproximadamente 2,67:100. Por lo tanto, se pueden aplicar de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 6,0 mg de linaclotida a 225 mg de carga. En una realización adicional, el peso de linaclotida aplicada a un peso dado de carga es de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 2,0 mg de linaclotida (por ejemplo, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 mg de péptido para 225 mg de carga).

**[0030]** En diversas realizaciones, la amina primaria impedida estéricamente es un aminoácido (por ejemplo, un aminoácido natural o un aminoácido natural seleccionado de histidina, fenilalanina, alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, metionina, asparagina, tirosina, treonina, leucina, isoleucina, triptófano o valina). En otros casos, la amina primaria impedida estéricamente es un aminoácido o derivado de aminoácido no natural (por ejemplo, lantionina, teanina o 1-amino ciclohexano). En otros casos, la amina primaria impedida estéricamente es un amino azúcar (por ejemplo, quitosano o glucosamina).

**[0031]** En algunos casos, la amina primaria impedida estéricamente tiene la fórmula:



en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan independientemente de: H; -C(O)OH; alquilo C1-C6, opcionalmente sustituido por -CO<sub>2</sub>H, -CONH<sub>2</sub>, o un arilo o heteroarilo de 5-10 miembros; alcoxilquilo C1-C6; o tioalcoxilquilo C1-C6, en el que cualquiera de los grupos alquilo o arilo anteriores puede estar sustituido individual o de manera múltiple con halógeno o -NH<sub>2</sub>, y siempre que no más de dos de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> sean H. En una realización adicional, no más de uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> es H.

**[0032]** El término "alquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada saturada. A menos que se especifique lo contrario, un grupo alquilo contiene 1-20 átomos de carbono (por ejemplo, 1-20 átomos de carbono, 1-10 átomos de carbono, 1-8 átomos de carbono, 1-6 átomos de carbono, 1-4 átomos de carbono o 1-3 carbonos átomos). Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, s-butilo, t-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo y similares.

**[0033]** Los términos "alcoxilquilo" C<sub>n-m</sub> y "tioalcoxilquilo" C<sub>n-m</sub> significa alquilo, sustituido con uno o más grupos alcoxi o tioalcoxi, según sea el caso, en el que el número total combinado de átomos de carbono de los grupos alquilo y alcoxi, o los grupos alquilo y tioalcoxi, combinados, según sea el caso, se encuentra entre los valores de n y m. Por ejemplo, un alcoxilquilo C<sub>4-6</sub> tiene un total de 4-6 carbonos divididos entre la porción alquilo y alcoxi; por ejemplo, puede ser -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>.

**[0034]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arilo" (como en "anillo arilo" o "grupo arilo"), utilizado solo o como parte de un resto mayor, se refiere a un sistema de anillo carbocíclico en el que al menos un anillo en el sistema es aromático y tiene un único punto de unión al resto de la molécula. A menos que se especifique lo contrario, un grupo arilo puede ser monocíclico, bicíclico o tricíclico y contiene 6-18 miembros del anillo. Los ejemplos de anillos de arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo, indanilo, indenilo, tetralina, fluorenilo y antraceniilo.

**[0035]** El término "heteroarilo" (o grupo "heteroaromático" o "heteroarilo" o "heterociclo aromático") utilizado solo o como parte de un resto mayor como en "heteroaralquilo" o "heteroarilalcoxi" se refiere a un sistema de anillo en el que al menos un anillo en el sistema es aromático y contiene uno o más heteroátomos, en el que cada anillo en el sistema contiene de 3 a 7 miembros del anillo y que tiene un único punto de unión al resto de la molécula. A menos que se especifique lo contrario, un sistema de anillo heteroarilo puede ser monocíclico, bicíclico o tricíclico y tiene un total de cinco a catorce miembros del anillo. En una realización, todos los anillos en un sistema heteroarilo son aromáticos. También se incluyen en esta definición los radicales heteroarilo donde el anillo heteroarilo está fusionado con uno o más anillos carbocíclicos o heterocíclicos aromáticos o no aromáticos, o combinaciones de los mismos, siempre que el radical o punto de unión esté en el anillo heteroarilo. El sistema heteroaromático bicíclico

6.5, tal como se usa en el presente documento, por ejemplo, es un anillo heteroaromático de seis miembros fusionado a un segundo anillo de cinco miembros en el que el radical o punto de unión está en el anillo de seis miembros.

- 5 **[0036]** Los anillos de heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, los siguientes monociclos: 2-furanilo, 3-furanilo, N-imidazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 5-imidazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo, N-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, piridazinilo (por ejemplo, 3-piridazinilo), 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, tetrazolilo (por ejemplo, 5-tetrazolilo), triazolilo (por ejemplo, 2-triazolilo y 5-triazolilo), 2-tienilo, 3-tienilo, pirazolilo (por ejemplo, 2-pirazolilo), isotiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, pirazinilo, 1,3,5-triazinilo y los siguientes biciclos: bencimidazolilo, benzofurilo, benzotiofenilo, benzopirazinilo, benzopiranonilo, indolilo (por ejemplo, 2-indolilo), purinilo, quinolinilo (por ejemplo, 2-quinolinilo, 3-quinolinilo, 4-quinolinilo) e isoquinolinilo (por ejemplo, 1-isoquinolinilo, 3-isoquinolinilo o 4-isoquinolinilo).
- 15 **[0037]** En varios casos: el antioxidante se selecciona entre BHA (hidroxianisol butilado), BHT (hidroxitolueno butilado), vitamina E, galato de propilo, ácido ascórbico y sales o ésteres del mismo, tocoferol y ésteres del mismo, ácido alfa-lipoico, beta-caroteno; el aglutinante farmacéuticamente aceptable es alcohol polivinílico o polivinilpirrolidona; el aglutinante farmacéuticamente aceptable se selecciona de: un almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata pregelatinizado, almidón de arroz, almidón de trigo y glicolato de almidón de sodio), maltodextrina o un éter de celulosa (por ejemplo, metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa); la carga farmacéuticamente aceptable es celulosa (por ejemplo, celulosa microfina o celulosa microcristalina, tal como Celphere CP-305 o Avicel); la carga farmacéuticamente aceptable es un azúcar o un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol, isomalt, sorbitol, dextrosa, xilitol, sacarosa y lactosa); la carga comprende partículas que tienen un diámetro promedio entre 50  $\mu\text{m}$  y 1000  $\mu\text{m}$ ; el lubricante y/o deslizante se selecciona de: talco, leucina, estearato de magnesio, ácido esteárico y alcohol polivinílico; y el lubricante y/o deslizante se selecciona de: estearato de calcio, aceite mineral, aceite vegetal, polietilenglicol (PEG; por ejemplo, PEG que es líquido o sólido a temperatura ambiente), benzoato de sodio y laurilsulfato de sodio.
- 30 **[0038]** En algunos casos, la solución de linaclotida utilizada en un procedimiento para preparar la formulación tiene un pH por debajo de 7 (por ejemplo, un pH entre 1 y 3 o un pH entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,5). El pH se puede ajustar con, por ejemplo, ácido fosfórico. En algunos casos, la solución está tamponada. Se pueden usar varios tampones farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, tampón fosfato).
- 35 **[0039]** En algunos casos, la solución de linaclotida utilizada en un procedimiento para preparar la formulación comprende tanto un catión (por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ) como una amina primaria impedida estéricamente (por ejemplo, leucina).
- [0040]** En algunos casos, la solución de linaclotida comprende  $\text{CaCl}_2$  y leucina; el aglutinante es metilcelulosa; la carga es celulosa microcristalina; el deslizante y/o lubricante comprende talco o leucina.
- [0041]** También se proporciona una composición farmacéutica preparada mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.
- 45 **[0042]** La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable, linaclotida y uno o más agentes seleccionados de (i) un catión seleccionado de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  o  $\text{Al}^{3+}$ , o (ii) una amina primaria impedida estéricamente. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos un catión y al menos una amina primaria impedida estéricamente.
- 50 **[0043]** También se describen procedimientos de uso de las composiciones farmacéuticas para tratar una variedad de trastornos gastrointestinales.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA

- 55 **[0044]** La figura 1 muestra un ejemplo de un análisis de linaclotida mediante HPLC, en el que "oxidación" se refiere al producto de oxidación de linaclotida, "formaldehído imina" se refiere al producto de formaldehído imina de linaclotida e "hidrólisis" se refiere al producto de hidrólisis de linaclotida.

**[0045]** Esta figura se proporciona a modo de ejemplo y no pretende limitar el alcance de la presente invención.

60

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

- [0046]** Las composiciones orales que contienen linaclotida se pueden utilizar para tratar una variedad de trastornos gastrointestinales. En diversas realizaciones, el paciente sufre un trastorno gastrointestinal; el paciente sufre un trastorno seleccionado del grupo que consiste en: trastornos de la motilidad gastrointestinal, pseudoobstrucción intestinal crónica, pseudoobstrucción colónica, enfermedad de Crohn, reflujo duodenogástrico, dispepsia, dispepsia
- 65



funcional, dispepsia no ulcerosa, un trastorno gastrointestinal funcional, acidez estomacal funcional, enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD), gastroparesia, síndrome del intestino irritable, íleo después de cirugía, colitis ulcerosa, estreñimiento crónico, estreñimiento, dolor asociado con el estreñimiento y trastornos y afecciones asociadas con el estreñimiento (por ejemplo, estreñimiento asociado con el uso de analgésicos opiáceos, estreñimiento después de cirugía y estreñimiento asociado con trastornos neuropáticos, así como otras afecciones y trastornos descritos en el presente documento); el paciente sufre un trastorno de la motilidad gastrointestinal, pseudoobstrucción intestinal crónica, pseudoobstrucción colónica, enfermedad de Crohn, reflujo duodenogástrico, dispepsia, dispepsia funcional, dispepsia no ulcerosa, un trastorno gastrointestinal funcional, acidez estomacal funcional, enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD), gastroparesia, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable (por ejemplo, síndrome del intestino irritable con predominio de diarrea (d-IBS), síndrome del intestino irritable con predominio del estreñimiento (c-IBS) y/o síndrome del intestino irritable alternante (a-IBS)), íleo después de cirugía, colitis ulcerosa, estreñimiento crónico, estreñimiento, dolor asociado con el estreñimiento y trastornos y afecciones asociadas con el estreñimiento (por ejemplo, estreñimiento asociado con el uso de analgésicos opiáceos, estreñimiento después de cirugía y estreñimiento asociado con trastornos neuropáticos, así como otras afecciones y trastornos descritos en este documento); el paciente ha sido diagnosticado con un trastorno gastrointestinal funcional según los Criterios de Roma (por ejemplo, Roma II), el paciente ha sido diagnosticado con síndrome del intestino irritable (por ejemplo (por ejemplo, diarrea con IBS con predominio de diarrea, IBS con predominio de estreñimiento y/o IBS alternante)), según los Criterios de Roma (por ejemplo, Roma II).

**[0047]** El intervalo de dosis de linaclotida para los seres humanos adultos es generalmente de 25 µg a 6 mg por día por vía oral. En una realización adicional, el intervalo de dosis es de 25 µg a 2 mg por día por vía oral. En algunas realizaciones, el intervalo de dosis para humanos adultos es de 50 µg a 1 mg por día por vía oral (por ejemplo, 50 µg, 67,5 µg, 100 µg, 133 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 266 µg, 300 µg, 350 µg, 400 µg, 450 µg, 500 µg, 550 µg, 600 µg, 650 µg, 700 µg, 750 µg, 800 µg, 850 µg, 900 µg, 950 µg o 1 mg). En realizaciones adicionales, el intervalo de dosis es de 100 µg a 600 µg por día por vía oral. En otras realizaciones, la dosis es de 50 µg, 67,5 µg, 100 µg, 133 µg, 150 µg, 200 µg, 266 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg o 600 µg de linaclotida por día por vía oral. En una realización, la composición de linaclotida se proporciona en una unidad discreta, una forma de dosificación unitaria (por ejemplo, un comprimido, una cápsula, una bolsita) que es eficaz en dicha dosificación o como un múltiplo de la misma. En ciertas realizaciones, la forma de dosificación unitaria y la dosis diaria son equivalentes. En diversas realizaciones, la forma de dosificación unitaria se administra con alimentos en cualquier momento del día, sin alimentos en cualquier momento del día, con alimentos después de un ayuno nocturno (por ejemplo, con desayuno). En diversas realizaciones, la forma de dosificación unitaria se administra una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. La forma de dosificación unitaria puede comprender opcionalmente otros aditivos. En algunas realizaciones, las formas de dosificación de una, dos o tres unidades contendrán la dosis oral diaria de linaclotida. La cantidad precisa de compuesto administrado a un paciente será responsabilidad del médico encargado. Sin embargo, la dosis empleada dependerá de una serie de factores, que incluyen la edad y el sexo del paciente, el trastorno exacto que se está tratando y su gravedad.

**[0048]** En una realización, se proporciona un procedimiento para tratar el síndrome del intestino irritable con estreñimiento (IBS-c) en un paciente adulto en necesidad del mismo, que comprende administrar al paciente una vez al día una cantidad eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende 133 µg o 266 µg de linaclotida por dosis unitaria por día. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra durante un período de al menos un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas o más. En algunas realizaciones, el tratamiento con la composición de linaclotida mejora al menos un síntoma seleccionado de dolor abdominal reducido, un aumento en el número de movimientos espontáneos completos del intestino (CSBM) en una semana, un aumento en el número de movimientos espontáneos del intestino (SBM) en una semana, mejor consistencia de las heces, menor esfuerzo, menor molestia abdominal, menor hinchazón o menor gravedad de los síntomas del IBS-c.

**[0049]** En una realización, se proporciona un procedimiento para tratar el estreñimiento crónico en un paciente adulto en necesidad del mismo, que comprende administrar al paciente una vez al día una cantidad eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica comprende 133 µg o 266 µg de linaclotida por dosis unitaria por día. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra durante un período de al menos un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas o más. En algunas realizaciones, el tratamiento con la composición de linaclotida mejora al menos un síntoma seleccionado de un aumento en el número de movimientos espontáneos completos del intestino (CSBM) en una semana, un aumento en el número de movimientos espontáneos del intestino (SBM) en una semana, mejor consistencia de las heces, menor esfuerzo, menor molestia abdominal, menor hinchazón o menor gravedad del estreñimiento.

**[0050]** La consistencia de las heces de cada BM puede controlarse mediante la Escala de forma de heces de Bristol (BSFS) de 7 puntos (1 = grumos duros, 2 = salchicha grumosa, 3 = salchicha agrietada, 4 = salchicha lisa, 5 = grumos blandos, 6 = blando, 7 = acuoso). El esfuerzo se puede controlar mediante la escala de facilidad de paso de 7 puntos (1 = desimpactación manual/enema necesario, 2 = esfuerzo severo, 3 = esfuerzo moderado, 4 = esfuerzo

leve, 5 = sin esfuerzo, 6 = urgencia, 7 = incontinencia). Los CSBM pueden medirse por la sensación de vaciado completo después de un SBM (sí/no). El malestar abdominal, la hinchazón y la severidad del estreñimiento se pueden medir usando, por ejemplo, una escala ordinal de 5 puntos (1 = ninguno, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = severo, 5 = muy severo).

5

**[0051]** Un catión de la invención se puede proporcionar como una sal farmacéuticamente aceptable, es decir, un catión con un contraión adecuado. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la invención incluyen, sin limitación, acetato de magnesio, cloruro de magnesio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, acetato de calcio, cloruro de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, acetato de zinc, cloruro de zinc, fosfato de zinc, sulfato de zinc, acetato de manganeso, cloruro de manganeso, fosfato de manganeso, sulfato de manganeso, acetato de potasio, cloruro de potasio, fosfato de potasio, sulfato de potasio, acetato de sodio, cloruro de sodio, fosfato de sodio, sulfato de sodio, acetato de aluminio, cloruro de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio. En algunas realizaciones, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen cloruro de calcio, carbonato de calcio, acetato de calcio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio, acetato de zinc y cloruro de zinc. En realizaciones adicionales, una sal farmacéuticamente aceptable que puede usarse es cloruro de calcio, cloruro de magnesio y acetato de zinc.

**[0052]** Tal como se usa en este documento, el término "aglutinante" se refiere a cualquier aglutinante farmacéuticamente aceptable que pueda ser utilizado en la práctica de la invención. Los ejemplos de aglutinantes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, un almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata y almidón pregelatinizado (por ejemplo, STARCH 1500® y STARCH 1500 LM®, comercializado por Colorcon, Ltd.) y otros almidones), maltodextrina, gelatina, gomas naturales y sintéticas, tales como acacia, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa (hipromelosa), etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio, carboximetilcelulosa, celulosa microcristalina (por ejemplo, AVICEL™, tal como AVICEL-PH-101™, -103™ y -105™, comercializado por FMC Corporation, Marcus Hook, PA, EE. UU.), alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona (por ejemplo, polivinilpirrolidona K30) y mezclas de los mismos.

**[0053]** Tal como se usa en este documento, el término "carga" se refiere a cualquier carga farmacéuticamente aceptable que pueda ser utilizada en la práctica de la invención. Los ejemplos de cargas farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, talco, carbonato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), fosfato de calcio dibásico, fosfato de calcio tribásico, sulfato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), celulosa microcristalina (por ejemplo, Avicel PH101 o Celphere CP-305), celulosa en polvo, dextranos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón (por ejemplo, Starch 1500), almidón pregelatinizado, lactosa, glucosa, fructosa, galactosa, trehalosa, sacarosa, maltosa, isomalt, rafinosa, maltitol, melezitosa, estaquiosa, lactitol, palatinita, xilitol, mioinositol y mezclas de los mismos.

**[0054]** Los ejemplos de cargas farmacéuticamente aceptables que pueden usarse particularmente para recubrir con linaclotida incluyen, sin limitación, talco, celulosa microcristalina (por ejemplo, Avicel PH101 o Celphere CP-305), celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, lactosa, glucosa, fructosa, galactosa, trehalosa, sacarosa, maltosa, isomalt, fosfato de calcio dibásico, rafinosa, maltitol, melezitosa, estaquiosa, lactitol, palatinita, xilitol, manitol, mioinositol y mezclas de los mismos.

**[0055]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aditivos" se refiere a cualquier aditivo farmacéuticamente aceptable. Los aditivos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, disgregantes, aditivos dispersantes, lubricantes, deslizantes, antioxidantes, aditivos de recubrimiento, diluyentes, tensioactivos, aditivos aromatizantes, humectantes, aditivos que promueven la absorción, aditivos de liberación controlada, aditivos antiaglomerantes, agentes antimicrobianos (por ejemplo, conservantes), colorantes, desecantes, plastificantes y colorantes.

50

**[0056]** Tal como se usa en este documento, un "excipiente" es cualquier aditivo, carga, aglutinante o agente farmacéuticamente aceptable.

**[0057]** Tal como se usa en este documento, "linaclotida purificada" es linaclotida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma que es mayor que o igual a 90 por ciento pura o mayor que o igual a 95 por ciento pura. En algunas realizaciones, la linaclotida como se usa en los procedimientos y composiciones descritas en el presente documento está purificada. La pureza de linaclotida puede medirse, por ejemplo, mediante la pureza cromatográfica de linaclotida usando HPLC de fase inversa como se describe en el Ejemplo 21. El ensayo de linaclotida [p/p] puede determinarse, por ejemplo, usando HPLC de fase inversa con cuantificación mediante calibración externa con un patrón de referencia como se describe en el Ejemplo 21.

**[0058]** En una realización, la composición farmacéutica puede prepararse mediante pulverización de una solución que comprende linaclotida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en una carga farmacéuticamente aceptable para generar una carga recubierta con linaclotida. En una realización, el procedimiento comprende: (a) proporcionar una solución, por ejemplo, una solución acuosa ("la solución de recubrimiento"), que comprende: (i) linaclotida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) un catión seleccionado de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,

65

K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> o Al<sup>3+</sup> y/o una amina primaria impedida estéricamente (por ejemplo, leucina) y, opcionalmente, (iii) un aglutinante farmacéuticamente aceptable; y (b) aplicar la solución de recubrimiento a una carga farmacéuticamente aceptable para generar una carga recubierta de polipéptido (por ejemplo, pulverizando, mezclando o recubriendo la carga farmacéuticamente aceptable con la solución de recubrimiento). El procedimiento puede incluir opcionalmente uno o más de: (i) mezclar la carga recubierta de polipéptido con un deslizante farmacéuticamente aceptable, un lubricante farmacéuticamente aceptable o un aditivo farmacéuticamente aceptable que actúa como deslizante y como lubricante; (ii) mezclar la carga recubierta de polipéptido con una carga que no está recubierta de polipéptido, (iii) mezclar la carga recubierta de polipéptido con otros aditivos; y (iv) aplicar un aditivo de recubrimiento farmacéuticamente aceptable a la carga recubierta de polipéptido. La composición farmacéutica final puede colocarse en cápsulas (por ejemplo, cápsula de gelatina) o usarse para formar comprimidos.

**[0059]** En otra realización, la composición farmacéutica se prepara mediante secado por pulverización, que es una técnica utilizada para preparar micropartículas (por ejemplo, microcápsulas o microesferas) de medicamentos. Los péptidos secados por pulverización generalmente retienen su actividad biológica tras la disolución y pueden tener características físicas útiles, que incluyen un tamaño de partícula uniforme y una forma esférica. Además, las micropartículas preparadas mediante secado por pulverización a menudo fluyen libremente, lo que es útil para los procesos de fabricación farmacéutica, tal como la formación de comprimidos y el llenado de cápsulas. Los procesos de secado por pulverización también son útiles porque pueden escalarse fácilmente para la fabricación clínica y comercial.

**[0060]** Por lo tanto, esta divulgación presenta un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende linaclotida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, comprendiendo el procedimiento: (a) proporcionar una solución, por ejemplo, una solución acuosa u orgánica, que comprende: (i) linaclotida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) un catión seleccionado de Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> o Al<sup>3+</sup> y/o una amina primaria impedida estéricamente (por ejemplo, leucina) y (b) secar por pulverización la solución que contiene linaclotida para producir micropartículas. La solución que contiene linaclotida puede incluir opcionalmente un polímero, tal como uno o más de los aglutinantes descritos en el presente documento, un lípido o fosfolípido, y/o una carga, tal como manitol. El procedimiento puede incluir opcionalmente una o más etapas adicionales de: (i) mezclar las micropartículas de linaclotida con un deslizante farmacéuticamente aceptable, un lubricante farmacéuticamente aceptable o un aditivo farmacéuticamente aceptable que actúa como deslizante y como lubricante; (ii) mezclar las micropartículas con una carga y/o (iii) mezclar las micropartículas con otros aditivos. La composición farmacéutica final puede colocarse en cápsulas (por ejemplo, cápsula de gelatina) o usarse para formar comprimidos.

**[0061]** En otras realizaciones, la composición farmacéutica se prepara mediante liofilización por pulverización, procesamiento con fluido supercrítico o liofilización de una solución, por ejemplo, una solución acuosa u orgánica, que comprende: (i) linaclotida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) un catión seleccionado de Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> o Al<sup>3+</sup> y/o una amina primaria impedida estéricamente (por ejemplo, leucina).

**[0062]** En algunas realizaciones, la composición de linaclotida se proporciona en una forma sólida para administración oral. Los ejemplos de tales formas incluyen, sin limitación, un comprimido, una bolsita, un gránulo, una cápsula o un polvo. En algunas realizaciones, las composiciones pueden usarse para crear formas de dosificación unitarias, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, bolsitas o gránulos. Las composiciones administradas por vía oral pueden incluir, por ejemplo, aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes, aditivos lubricantes, tensioactivos o dispersantes, aditivos aromatizantes y humectantes. Las formulaciones administradas por vía oral, tales como comprimidos, pueden opcionalmente recubrirse o marcarse con una ranura y pueden formularse para proporcionar una liberación sostenida, retardada o controlada de la linaclotida en las mismas. La linaclotida puede administrarse conjuntamente o formularse conjuntamente con otros medicamentos. En una realización, la composición de linaclotida se puede administrar conjuntamente con otros medicamentos utilizados para tratar trastornos gastrointestinales. La composición de linaclotida también puede usarse para el tratamiento de trastornos fuera del tracto gastrointestinal, tales como insuficiencia cardíaca congestiva e hipertrofia prostática benigna.

**[0063]** Las composiciones pueden incluir, por ejemplo, varios disolventes, dispersantes, recubrimientos, aditivos promotores de la absorción, aditivos de liberación controlada, y uno o más aditivos adicionales (que incluyen, por ejemplo, almidones, polioles, aditivos de granulación, celulosa microcristalina, diluyentes, lubricantes, aglutinantes, aditivos disgregantes y similares), etc. Si se desea, las dosis de comprimidos de las composiciones descritas pueden recubrirse mediante técnicas acuosas o no acuosas estándar. Las composiciones también pueden incluir, por ejemplo, aditivos antiaglomerantes, conservantes, aditivos edulcorantes, colorantes, aromatizantes, desecantes, plastificantes, colorantes y similares.

**[0064]** Los disgregantes adecuados incluyen, por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, povidona, polacrilina de potasio, glicolato de almidón sódico, almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pregelatinizado, arcillas, otros alginatos, otras celulosas, gomas y sus mezclas.

**[0065]** Los lubricantes adecuados incluyen, por ejemplo, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, laurilsulfato sódico,

talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de zinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, gel de sílice siloide (AEROSIL 200, WR Grace Co., Baltimore, MD EE. UU.) , un aerosol coagulado de sílice sintética (Evonik Degussa Co., Plano, TX USA), un dióxido de silicio pirogénico (CAB-O-SIL, Cabot Co., Boston, MA USA) y mezclas de los mismos.

**[0066]** Los deslizantes adecuados incluyen, por ejemplo, leucina, dióxido de silicio coloidal, trisilicato de magnesio, celulosa en polvo, almidón, talco y fosfato cálcico tribásico.

10 **[0067]** Los aditivos antiaglomerantes adecuados incluyen, por ejemplo, silicato de calcio, silicato de magnesio, dióxido de silicio, dióxido de silicio coloidal, talco, y mezclas de los mismos.

**[0068]** Los aditivos anti-microbianos adecuados que se pueden utilizar, por ejemplo, como conservante para las composiciones de linaclotida, incluyen, por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, butilparabeno, cloruro de cetilpiridinio, cresol, clorobutanol, ácido deshidroacético, etilparabeno, metilparabeno, fenol, alcohol feniletílico, fenoxietanol, acetato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, sorbato de potasio, propilparabeno, benzoato de sodio, deshidroacetato de sodio, propionato de sodio, ácido sórbico, timersol, timo y mezclas de los mismos.

20 **[0069]** Los aditivos de recubrimiento adecuados incluyen, por ejemplo, carboximetil celulosa sódica, acetato ftalato de celulosa, etilcelulosa, gelatina, barniz farmacéutico, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetil celulosa, metilcelulosa, polietilenglicol, acetato ftalato de polivinilo, goma laca, sacarosa, dióxido de titanio, cera de carnauba, cera microcristalina y mezclas de los mismos. Los recubrimientos protectores adecuados incluyen Aquacoat (por ejemplo, dispersión acuosa en etilcelulosa de Aquacoat, 15% p/p, FMC Biopolymer, ECD-30),  
25 Eudragit (por ejemplo, Eudragit E PO PE-EL, Roehm Pharma Polymers) y Opadry (por ejemplo, dispersión de Opadry AMB, 20% p/p, Colorcon).

**[0070]** En ciertas realizaciones, los aditivos adecuados para la composición de linaclotida incluyen uno o más de sacarosa, talco, estearato de magnesio, crospovidona o BHA.

30 **[0071]** En ciertas realizaciones, el término "95%" puede ser 95,0%, el término "90%" puede ser 90,0%, el término "10%" puede ser 10,0%, el término "9%" puede ser 9,0% , el término "8%" puede ser 8,0%, el término "7%" puede ser 7,0%, el término "6%" puede ser 6,0%, el término "5%" puede ser 5,0%, el término "4%" puede ser 4,0%, el término "3%" puede ser 3,0%, el término "2%" puede ser 2,0% y el término "1%" puede ser 1,0%.

35 **[0072]** En ciertas realizaciones, la composición de linaclotida se proporciona en una forma de dosificación unitaria. En algunas realizaciones, la forma de dosificación unitaria es una cápsula, un comprimido, una bolsita, un gránulo o un polvo. En una de tales realizaciones, la forma de dosificación unitaria es una cápsula o comprimido. Dichas formas de dosificación unitaria pueden estar contenidas en un recipiente, tal como, sin  
40 limitación, una caja de papel o cartón, una botella o frasco de vidrio o plástico, una bolsa con cierre hermético (por ejemplo, para contener una "recarga" de comprimidos para colocarlos en un recipiente diferente) o un blister con dosis individuales para extraer del envase según el programa terapéutico. Es factible que se pueda usar más de un recipiente en un solo envase para proporcionar una sola forma de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos o cápsulas pueden estar contenidos en una botella que a su vez está contenida dentro de una caja. En algunas  
45 realizaciones, las formas de dosificación unitarias se proporcionan en un recipiente que además comprende un desecante. En una realización adicional, las formas de dosificación unitarias, por ejemplo, una cantidad de comprimidos o cápsulas, se proporcionan en un recipiente, por ejemplo, una botella, frasco o bolsa resellable, que contienen un desecante. En una realización adicional, el recipiente que contiene las formas de dosificación unitarias está envasado con instrucciones de administración o dosificación. En ciertas realizaciones, la composición de  
50 linaclotida se proporciona en un kit. La composición de linaclotida descrita en el presente documento y los agentes terapéuticos de combinación se pueden envasar como un kit que incluye dosis únicas o múltiples de dos o más agentes, cada uno envasado o formulado individualmente, o dosis únicas o múltiples de dos o más agentes envasados o formulados en combinación. Por lo tanto, la composición de linaclotida puede estar presente en el primer recipiente, y el kit puede incluir opcionalmente uno o más agentes en un segundo recipiente. El recipiente o  
55 recipientes se colocan dentro de un envase, y el envase puede incluir opcionalmente instrucciones de administración o dosificación.

## EJEMPLOS

60 **[0073]** Los ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas se describen con fines de referencia.

**[0074]** La linaclotida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables pueden producirse y purificarse usando técnicas estándar conocidas en el sector, por ejemplo, síntesis química o expresión recombinante seguida de  
65 purificación usando técnicas estándar.

*Esquema de formulación A*

**[0075] Preparación de la solución de recubrimiento:** Se mezclan aproximadamente de 32 g a 42 g de agua purificada con ácido clorhídrico para crear una solución con un pH entre 1,5 y 2,0. El catión, si se usa, se agrega a la solución en una cantidad para proporcionar la concentración deseada, y la solución se mezcla durante el tiempo suficiente para producir una solución transparente. La amina primaria impedida estéricamente, si se usa, se agrega a la solución en una cantidad para proporcionar la concentración deseada, y la solución se mezcla durante el tiempo suficiente para producir una solución transparente. A continuación, se agregan otros aditivos, tales como antioxidantes, si se desea. Se prueba el pH de la solución y se agrega ácido clorhídrico, si es necesario, para producir una solución que tenga un pH entre 1,5 y 2,0. A continuación, se agrega el aglutinante a la solución y la mezcla se agita durante el tiempo suficiente para lograr una solución transparente. La cantidad deseada de linaclotida se agrega a la solución y se mezcla durante 30-100 minutos para proporcionar la solución de recubrimiento.

**[0076] Preparación de las perlas activas:** Se agregan aproximadamente 30-36 g de perlas de celulosa microcristalina secas a un Mini Column Fluid Bed Coater. Las perlas de celulosa microcristalina se fluidizan y se calientan antes de la estratificación. A continuación, la solución de recubrimiento se coloca en capas sobre las perlas. La temperatura de pulverización se controla entre 24 °C y 55 °C controlando la temperatura de entrada, la velocidad de pulverización, la presión de atomización y el volumen de aire. Después de que toda la solución de recubrimiento se haya colocado en capas sobre las perlas, las perlas se secan. El producto de este proceso se denomina perlas activas.

**[0077] Preparación de perlas activas con capa protectora:** Se añaden aproximadamente 35 g de perlas activas a un Mini Column Fluid Bed Coater. Las perlas activas se fluidizan y se calientan antes de recubrirlas con Aquacoat (por ejemplo, dispersión acuosa en aetilcelulosa de Aquacoat, 15% p/p, FMC Biopolymer, ECD-30), Eudragit (por ejemplo, Eudragit E PO PE-EL, Roehm Pharma Polymers) u Opadry (por ejemplo, dispersión Opadry AMB, 20% p/p, Colorcon). A continuación, la solución de recubrimiento se coloca en capas sobre las perlas. La temperatura de pulverización se controla entre 24 °C y 55 °C controlando la temperatura de entrada, la velocidad de pulverización, la presión de atomización y el volumen de aire. Después de que toda la solución de recubrimiento se haya colocado en capas sobre las perlas, las perlas se secan.

*Esquema de formulación B*

**[0078] Preparación de la solución de recubrimiento:** Se mezclan aproximadamente 8,3 kg de agua purificada con ácido clorhídrico para crear una solución con un pH entre 1,5 y 2,0. El catión, si se usa, se agrega a la solución en una cantidad para proporcionar la concentración deseada, y la solución se mezcla durante el tiempo suficiente para producir una solución transparente. La amina primaria impedida estéricamente, si se usa, se agrega a la solución en una cantidad para proporcionar la concentración deseada, y la solución se mezcla durante el tiempo suficiente para producir una solución transparente. A continuación, se agregan otros aditivos, tales como antioxidantes, si se desea. A continuación, se agrega el aglutinante a la solución y la solución se mezcla durante el tiempo suficiente para lograr una solución transparente. Se prueba el pH de la solución y, si es necesario, se agrega ácido clorhídrico para producir una solución que tenga un pH entre 1,5 y 2,0. Esta es la Solución 1. Se mezclan aproximadamente 8,3 kg de agua purificada con ácido clorhídrico para crear una solución con un pH entre 1,5 y 2,0. Se agrega la cantidad deseada de linaclotida a la solución y se mezcla durante 10 a 30 minutos. Se prueba el pH de la solución y, si es necesario, se agrega ácido clorhídrico para producir una solución que tenga un pH entre 1,5 y 2,0. Esta es la solución 2. La solución 1 y la solución 2 se mezclan juntas. Se prueba el pH de la solución y, si es necesario, se agrega ácido clorhídrico para producir una solución que tenga un pH entre 1,5 y 2,0. Esta es la solución de recubrimiento.

**[0079] Preparación de las perlas activas:** Se agregan aproximadamente 24,19 kg de perlas de celulosa microcristalina a una columna Wurster de un lecho fluido Glatt GPCG-30. Las perlas de celulosa microcristalina se fluidizan y se calientan hasta una temperatura del producto de 45-47 °C. A continuación, la solución de recubrimiento se coloca en capas sobre las perlas. La temperatura de pulverización del producto se controla entre 37 °C y 47 °C controlando la temperatura de entrada, la velocidad de pulverización, la presión de atomización y el volumen de aire. Después de que toda la solución de recubrimiento se haya colocado en capas sobre las perlas, las perlas se secan con una temperatura de secado del producto de 37 °C a 47 °C. El producto de este proceso se denomina perlas activas.

**Ejemplos 1-15: Preparación de formulaciones de linaclotida**

**[0080]** Las formulaciones de linaclotida de los Ejemplos 1-15 fueron producidas esencialmente como se describe en el Esquema de Formulación A donde la Tabla 1 proporciona las cantidades de catión, amina primaria impedida estéricamente, aglutinante, linaclotida y perlas, mientras que la Tabla 2 proporciona las condiciones en las que las perlas fueron recubiertas:

Tabla 1

Ejemplo	Cantidad de catión [ ]*	Cantidad de amina [ ]	Cantidad de aglutinante	Cantidad de linaclotida**	Cantidad de perlas
1	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,6740 g [60]	Leucina 0,2005 g [20]	Hipromelosa 1,019 g	0,1282 g	Celphere CP-305 33,38 g
2	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,6740 g [60]	Leucina 0,3007 g [30]	Hipromelosa 0,3063 g	0,1329 g	Celphere CP-305 33,87 g
3	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,2247 g [20]	Leucina 1,002 g [100]	Hipromelosa 0,0656 g	0,1282 g	Celphere CP-305 33,86 g
4	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 1,123 g [100]	Leucina 0,2005 g [20]	Hipromelosa 1,969 g	0,1282 g	Celphere CP-305 32,36 g
5	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,4493 g [40]	Leucina 0,4009 g [40]	Hipromelosa 0,5425 g	0,1282 g	Celphere CP-305 33,78 g
6	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 0,2590 g [10]	Leucina 0,3341 g [20]	Hipromelosa 0,6636 g	0,2100 g	Celphere CP-305 33,83 g
7	ZnAc.2H <sub>2</sub> O 0,2796 g [10]	Leucina 0,3341 g [20]	Hipromelosa 0,6636 g	0,2100 g	Celphere CP-305 33,82 g
8	N/D	Leucina 0,8944 g [27]	Hipromelosa 0,6636 g	0,4387 g	Celphere CP-305 33,40 g
9	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,3745 g [10]	N/D	Hipromelosa 0,6636 g	0,4227 g	Celphere CP-305 33,83 g
10	N/D	N/D	Hipromelosa 0,6811 g	0,2114 g	Celphere CP-305 34,28 g
11	N/D	N/D	Hipromelosa 0,6636 g	0,4227 g	Celphere CP-305 34,13 g
12	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,4342 g [10]	N/D	Hipromelosa 0,6636 g	0,4227 g	Celphere CP-305 33,79 g
13	ZnAc.2H <sub>2</sub> O 0,5590 g [10]	N/D	Hipromelosa 0,6636 g	0,4227 g	Celphere CP-305 33,68 g
14	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 0,5178 g [10]	N/D	Hipromelosa 0,6636 g	0,4227 g	Celphere CP-305 33,72 g
15	N/D	Metionina 0,0380 [1]	Hipromelosa 0,6636 g	0,4387 g	Celphere CP-305 34,08 g

\* "Cation" se refiere al catión divalente contenido en la sal utilizada en el ejemplo, "Amina" se refiere a la amina primaria impedida estéricamente, [ ] se refiere a la relación molar del catión y/o la amina con respecto a la linaclotida.

\*\* La cantidad de linaclotida en este y todos los siguientes ejemplos se determina en función del contenido de péptidos y la pureza cromatográfica tal como se indica en el Certificado de análisis proporcionado para cada lote fabricado de ingrediente farmacéutico activo (API) de linaclotida.

Tabla 2

5

Ejemplo	T de pulverización del producto (°C)	T de entrada (°C)	Velocidad de pulverización (g/min)	Presión de atomización (psig)	Flujo de aire
1	34,0-37,0	55,7-57,7	0,33-0,40	20	Bajo
2	27,4-32,3	37,01-42,1	0,40	22	Bajo
3	32,6-34,7	60,0-60,1	0,33-0,40	20	Bajo
4	35,3-39,3	58,9-59,2	0,40	18	Bajo
5	27,8-27,9	58,7-59,8	0,35-0,33	20	Bajo
6	32,1-38,3	42,0-53,4	0,39-0,75	22	Bajo
7	31,7-39,3	50,0-52,5	0,27-0,57	22	Bajo
8	33,3-41,3	50,5-57,0	0,57-0,65	22	Bajo
9	33,2-40,0	49,5-58,7	0,82-1,00	20	Bajo
10	42,5	59,5	0,49	22	Bajo
11	39,7	52,0	0,66	22	Bajo
12	36,6-40,0	47,2-54,8	0,65-0,75	20-22	Bajo
13	32,4	57,4	0,65	22	Bajo
14	34,0	49,0	0,75	20	Bajo
15	24,1-39,9	48,5-55,9	0,39-0,65	22-23	Bajo

**Ejemplo 16: Preparación de la formulación de linaclotida**

**[0081]** La formulación de linaclotida del Ejemplo 16 se produjo esencialmente como se describe en el Esquema de Formulación B, donde la Tabla 3 proporciona las cantidades de catión, amina primaria impedida estéricamente, aglutinante, linaclotida y perlas, mientras que la Tabla 4 proporciona las condiciones bajo las cuales se recubrieron las perlas:

5

Tabla 3

Ejemplo	Cantidad de catión [ ]*	Cantidad de amina [ ]	Cantidad de aglutinante	Cantidad de linaclotida**	Cantidad de perlas
16	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 385,1 g [60]	Leucina 171,8 g [30]	Hipromelosa 175,0 g	73,5 g	Celulosa CP-305 24,19 kg

Tabla 4

Ejemplo	T de pulverización del producto (°C)	T de entrada (°C)	Velocidad de pulverización (g/min)	Presión de atomización (bar)	Volumen de aire del proceso (cfm)	T. de secado del producto (°C)
16	64,9-65,1	80	150	2,0	515-564	54,9-55,0

10

#### Ejemplo 17: Preparación de la formulación de linaclotida

**[0082]** La formulación de linaclotida del Ejemplo 17 se produjo esencialmente como se describe en el Esquema de Formulación A, excepto que la formulación contenía 22,96 mg de hidroxianisol butilado (BHA), en la que la Tabla 5 proporciona las cantidades de catión, amina primaria impedida estéricamente, aglutinante, linaclotida y perlas, mientras que la Tabla 6 proporciona las condiciones bajo las cuales se recubrieron las perlas.

15

Tabla 5

Ejemplo	Cantidad de catión [ ]*	Cantidad de amina [ ]	Cantidad de aglutinante	Cantidad de linaclotida**	Cantidad de perlas
17	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,3745g [20]	N/D	Hipromelosa 0,6636 g	0,2100 g	Celphere CP-305 33,99 g

20

Tabla 6

Ejemplo	T de pulverización del producto (°C)	T de entrada (°C)	Velocidad de pulverización (g/min)	Presión de atomización (psig)	Flujo de aire
17	33,5 – 34,8	47,7-48,6	0,56-0,74	26	Bajo

#### Ejemplo 18: Preparación de cápsulas que contienen formulación de linaclotida

**[0083]** El contenido de linaclotida en perlas activas se puede medir como se describe en el Ejemplo 21 o mediante otros procedimientos equivalentes.

**[0084]** Para formar cápsulas adecuadas para la administración oral, se usa una cantidad apropiada de perlas activas para llenar cápsulas de gelatina (por ejemplo, cápsulas de gelatina de tamaño 2). Una cantidad apropiada de perlas activas puede contener de 50 µg a 2 mg de linaclotida por cápsula con un intervalo de ± 5%. En algunas realizaciones, la cantidad apropiada de linaclotida en perlas activas puede ser 50 µg, 67,5 µg, 100 µg, 133 µg, 150 µg, 200 µg, 266 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg, 1 mg, 2 mg, 4 mg o 6 mg. En una realización particular, la cantidad apropiada de linaclotida en perlas activas es 67,5 µg, 100 µg, 133 µg, 150 µg, 200 µg, 266 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg. En una realización más particular, la cantidad apropiada de linaclotida en las perlas activas es 67,5 µg, 133 µg, 150 µg, 266 µg o 300 µg por cápsula.

**[0085]** En otra realización, se pone en un recipiente una cantidad apropiada de perlas activas para llenar un número deseado de cápsulas de gelatina. Se pueden agregar al recipiente, si se desea, una o más cargas farmacéuticamente aceptables u otros aditivos farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, una carga o aditivo es talco, leucina, celulosa microcristalina o manitol. El contenido del recipiente se mezcla y la mezcla se usa para llenar cápsulas de gelatina con una cantidad apropiada de perlas activas que contienen linaclotida (por ejemplo, de 50 µg a 2 mg de linaclotida por cápsula con un intervalo de + 5%).

**[0086]** En una realización alternativa, se utiliza una cantidad apropiada de perlas activas para llenar cápsulas de gelatina y se añaden a las cápsulas de gelatina una o más cargas farmacéuticamente aceptables u otros aditivos farmacéuticamente aceptables.

**Ejemplo 19: Preparación de cápsulas que contienen formulación de linaclotida**

**[0087]** Preparación de la solución de recubrimiento: En primer lugar, se mezclaron 41,98 g de agua purificada con 1,13 g de ácido clorhídrico con el fin de crear una solución con un pH entre 1,5 y 2,0. A continuación, se añadieron 7,49 g de cloruro de calcio dihidratado y 6,68 g de leucina a la solución, que, a continuación, se mezcló durante 30 minutos para producir una solución transparente. Se probó el pH y se añadieron 1,70 g de ácido clorhídrico para producir una solución que tenía un pH entre 1,5 y 2,0. A continuación, se añadieron a la solución 13,27 g de hipromelosa (hidroxipropilmetilcelulosa; Dow Chemical Company; Midland, MI) y la mezcla se agitó durante 60 minutos para lograr una solución transparente. A continuación, se añadieron 4,39 g de una linaclotida a la solución y se mezclaron durante 90 minutos. El pH de la solución fue 1,73. Esta fue la solución de recubrimiento.

**[0088]** Preparación de las perlas activas: Se añadieron 674,5 g de perlas de celulosa microcristalina (Celphere CP-305; Ashai Kasei Corporation (Tokio; Japón) a una columna Wurster de un lecho fluido Glatt GPCG-2. Las perlas de celulosa microcristalina se fluidizaron y se calentaron durante 30 minutos a una temperatura del producto de 60 °C. A continuación, la solución de recubrimiento se colocó en capas sobre las perlas. La temperatura del producto se controló entre 45 °C y 49 °C mediante una temperatura de entrada de 80 °C, velocidad de pulverización de 5,0-11 g/min, una presión de atomización de 2,0 bar y un volumen de aire de 40 a 50 m<sup>3</sup>/h. Después de que toda la solución de recubrimiento se colocara en capas sobre las perlas, las perlas se secaron durante 10 minutos con una temperatura del producto de 46,9 °C a 50,9 °C. El producto de este proceso se denominó perlas activas.

**[0089]** La cromatografía líquida de fase inversa de linaclotida extraída de una formulación preparada como se describe anteriormente demostró que la linaclotida extraída y un patrón de referencia de linaclotida exhibieron el mismo tiempo de retención y que no había ningún cambio significativo en la pureza como resultado del proceso de formulación.

**[0090]** Para formar cápsulas, se añadieron 49,50 g de perlas activas a una bolsa clara. A continuación, se añadieron a la bolsa 0,25 g de leucina, tamizada a través de una malla 60. La bolsa seató y mezcló durante 125 vueltas para mezclar todos los materiales. A continuación, se añadieron a la bolsa 0,25 g de talco, tamizado a través de una malla 60. La bolsa seató y mezcló durante 125 turnos para mezclar todos los materiales. Una vez que se mezclaron todos los materiales, la mezcla se usó para llenar cápsulas de gelatina de tamaño 2 con un peso objetivo de 227 mg/cápsula con un intervalo de  $\pm 5\%$ .

**Ejemplo 20: Preparación de cápsulas que contienen formulación de linaclotida**

**[0091]** Se prepararon perlas activas según el Ejemplo 16. Las perlas activas se ensayaron para el contenido de linaclotida. En base al ensayo de las perlas activas, se llenó una cantidad apropiada de perlas activas (96 mg - 123 mg) en cápsulas de gelatina dura de tamaño 2 usando una máquina de encapsulación MG2 Futura, para lograr una concentración de linaclotida de 300  $\mu\text{g}$ .

**[0092]** Las perlas activas se prepararon según el Ejemplo 15. Las perlas activas se ensayaron para el contenido de linaclotida. En base al ensayo de las perlas activas, se llenó una cantidad apropiada de perlas activas (48 mg - 62 mg) en cápsulas de gelatina dura de tamaño 2 usando una máquina de encapsulación MG2 Futura, para lograr una concentración de linaclotida de 150  $\mu\text{g}$ .

**Ejemplo 21: Medición del contenido y pureza de linaclotida**

**[0093]** El contenido y la pureza de linaclotida, así como la medición de sustancias relacionadas con linaclotida, pueden determinarse mediante cromatografía líquida en gradiente de fase inversa usando un sistema Agilent Series 1100 LC con software Chemstation Rev A.09.03 o equivalente. Se utiliza una columna YMC Pro<sup>TM</sup> C18 (dimensiones: 3,0 x 150 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , 120 Å; Waters Corp., Milford, MA) y se mantiene a 40 °C. La fase móvil A (MPA) consiste en agua con ácido trifluoroacético al 0,1%, mientras que la fase móvil B (MPB) consiste en 95% de acetonitrilo: 5% de agua con ácido trifluoroacético al 0,1%. La elución de linaclotida y sus sustancias relacionadas se logra con un gradiente de 0% a 47% de MPB en 28 minutos seguido de una rampa hasta 100% de MPB en 4 minutos con una retención de 5 minutos a 100% de MPB para lavar la columna. El reequilibrio de la columna se realiza volviendo a 0% de MPB en 1 minuto seguido de un mantenimiento de 10 minutos a 100% de MPA. El caudal es de 0,6 ml/min y la detección se realiza mediante UV a 220 nm.

**[0094]** Las muestras para análisis se preparan mediante la adición del contenido de las cápsulas de linaclotida a HCl 0,1 N para obtener una concentración objetivo de 20  $\mu\text{g}$  linaclotida/ml. Se inyectan 100  $\mu\text{l}$  de esta solución en la columna.

**[0095]** El contenido de linaclotida se mide determinando la concentración de linaclotida en la muestra preparada frente a un patrón de linaclotida externo preparado de manera similar.



[0096] Un ejemplo de un análisis de la linaclotida mediante HPLC se muestra en la Figura 1, en la que "oxidación" se refiere al producto de oxidación de linaclotida, "formaldehído imina" se refiere al producto de formaldehído imina de linaclotida e "hidrólisis" se refiere al producto de la hidrólisis de linaclotida .

5 **Ejemplo 22: Prueba de estabilidad de la formulación de linaclotida**

[0097] Para las formulaciones de los Ejemplos 1-15 y 17, se llenaron cápsulas de gelatina con aproximadamente 225 mg de perlas activas. Se colocaron cinco cápsulas rellenas en botellas de plástico. Las botellas contenían de 1 a 2 g de desecante y se sellaron por inducción. Las botellas se almacenaron a 40 °C/75% de HR durante seis meses.

10

[0098] El contenido y la pureza de la linaclotida, así como la cantidad de sustancias relacionadas con linaclotida, se midieron esencialmente como se describe en el Ejemplo 21 o mediante un procedimiento equivalente. Los resultados se proporcionan en la Tabla 7.

15

Tabla 7

Ejemplo	% de inicial [p/p] del ensayo	% Área mediante HPLC			
		Linaclotida (% de inicial)	Oxidación	Hidrólisis	Formaldehído Imina
1	107,56	96,88 (99,13)	0,11	0,24	0,19
3	98,87	97,36 (99,42)	0,07	0,52	0,15
4	95,67	95,61 (97,83)	0,10	0,16	0,24
5	103,41	95,87 (98,68)	0,07	0,25	0,24
6	99,46	93,64 (95,51)	0,14	0,70	0,55
7	98,64	93,44 (95,36)	0,45	1,45	0,63
8	92,81	88,20 (94,90)	0,37	1,85	0,49
9	93,53	93,81 (96,55)	0,2	0,41	1,06
10	77,12	84,85 (87,77)	0,37	0,29	4,45
11	85,73	89,09 (91,63)	1,18	0,49	1,38
12	33,60	41,98 (43,15)	ND	ND	ND
13	87,69	91,91 (94,01)	1,98	0,74	0,86
14	86,94	90,59 (92,70)	0,25	0,54	1,23
15	87,71	87,54 (93,24)	0,24	0,66	1,67
17	98,94	93,65 (95,16)	ND	0,32	0,73

[0099] Para la formulación del Ejemplo 16, se llenaron cápsulas de gelatina con aproximadamente 113 mg de perlas totales. Se colocaron 35 cápsulas rellenas en botellas de plástico. Las botellas contenían 2 g de desecante y se sellaron por inducción. Las botellas se almacenaron a 40 °C/75% de HR durante un mes.

20

[0100] El contenido y la pureza de la linaclotida, así como la cantidad de sustancias relacionadas con linaclotida, se pueden medir esencialmente como se describe en el Ejemplo 21 o mediante un procedimiento equivalente. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

25

Tabla 8

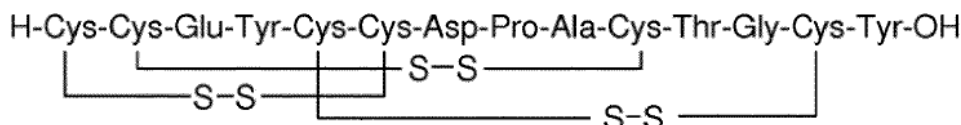
Ejemplo	% de inicial [p/p] del ensayo	% Área mediante HPLC			
		Linaclotida (% de inicial)	Oxidación	Hidrólisis	Formaldehído Imina
16	97,01	97,12 (99,79)	< 0,1	< 0,1	0,34

**Ejemplo 23: Aislamiento y preparación del producto de hidrólisis de linaclotida**

30

[0101] El producto de hidrólisis de linaclotida se produce como una transformación de Asn en la posición 7 a Asp (la numeración de la linaclotida comienza con 1 en la Cys N-terminal). Su estructura se muestra a continuación:

35



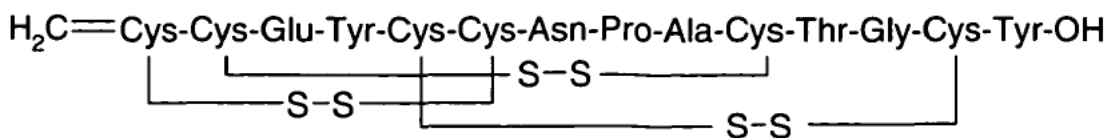
[0102] El producto de hidrólisis de linaclotida se ha sintetizado de forma independiente para la confirmación de identidad usando técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida estándar. El producto de hidrólisis de linaclotida también puede prepararse mediante otros procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante aislamiento de preparaciones de linaclotida usando técnicas cromatográficas o mediante expresión recombinante de

40

un ácido nucleico que codifica el producto de hidrólisis de linaclotida (Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asp Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr), opcionalmente seguido de oxidación de los residuos de cisteína para formar los enlaces disulfuro.

**Ejemplo 24: Aislamiento y preparación del producto de formaldehído imina de linaclotida**

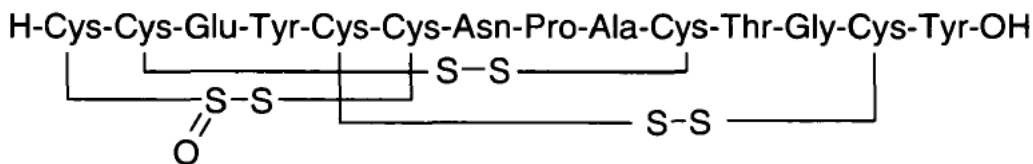
[0103] El producto de formaldehído imina se produce como la adición de una imina a la Cys N-terminal (Cys1) mediante una reacción mediada por formaldehído. A continuación, se muestra una estructura propuesta del producto:



[0104] El producto formaldehído imina de linaclotida se ha sintetizado de forma independiente para la confirmación de la identidad por reacción de linaclotida con formaldehído (relación molar 1:5) en etanol absoluto a temperatura ambiente durante 4 días. El producto de formaldehído imina también se puede preparar mediante otros procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante aislamiento de preparaciones de linaclotida usando técnicas cromatográficas o mediante síntesis química de péptidos o expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica linaclotida seguido de formilación, tal como se describe en este documento, o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica, opcionalmente seguido por oxidación de los residuos de cisteína para formar los enlaces disulfuro.

**Ejemplo 25: Aislamiento y preparación del producto de oxidación de linaclotida**

[0105] El producto de oxidación de linaclotida tiene un peso molecular de 1542,8. El producto de oxidación probablemente se forma como la adición de un solo átomo de oxígeno a uno de los seis azufres de cisteinilo en la linaclotida. A continuación, se muestra una estructura potencial del producto, aunque un experto en la materia reconocerá que el átomo de oxígeno puede estar unido a cualquiera de los otros cinco azufres:



[0106] Para respaldar esta identificación, el producto de oxidación de linaclotida se ha producido haciendo reaccionar linaclotida con peróxido de hidrógeno (3% acuoso) a temperatura ambiente o 40 °C durante hasta 24 horas. El producto resultante se enriquece en el producto de oxidación en 1-10%. El producto de oxidación de linaclotida también puede prepararse mediante otros procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante aislamiento de preparaciones de linaclotida usando técnicas cromatográficas o mediante síntesis química de péptidos o expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica linaclotida seguido de oxidación de los residuos de cisteína para formar enlaces disulfuro seguido de la reacción de linaclotida con peróxido de hidrógeno o un reactivo oxidante similar para formar el producto de oxidación de linaclotida.

**Ejemplo 26: Formación de comprimidos de linaclotida**

*Granulación en lecho fluido*

[0107] Se disolvieron linaclotida, CaCl<sub>2</sub>, leucina y polivinil pirrolidona (PVP) K30 en HCl 0,0001N para formar la solución de recubrimiento (véase la Tabla 9). Se cargó isomalt en el recipiente del lecho fluido. Con la fluidización del polvo de isomalt, la solución del fármaco se pulverizó por encima a una velocidad de ~10 g/min, con una temperatura del producto de ~-40°C para recubrir el polvo con la solución de recubrimiento. Al finalizar la pulverización, los gránulos de linaclotida se secaron durante 30 minutos y se descargó el producto.

Tabla 9

Ejemplo	Cantidad de catión [ ]	Cantidad de amina [ ]	Cantidad de aglutinante	Cantidad de linaclotida	Cantidad de carga
26A	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 15,4 g [60]	Leucina 6,9 g [30]	PVP K30 40 g	3,08 g	Isomalt 935 g

[0108] El fosfato dicálcico o Avicel también se utilizaron como carga para la granulación en lecho fluido.

*Granulación en húmedo*

5 [0109] Se pesó la linaclotida y se disolvió con agitación en 250 g de HCl 0,1 N (pH 1,7) para formar la Solución 1 (véase la Tabla 10). El CaCl<sub>2</sub> y la leucina se pesaron y se disolvieron bajo agitación en 100 g de HCl 0,1 N para formar la Solución 2. La Solución 1 y la Solución 2 se mezclaron bajo agitación para formar la solución de recubrimiento. Se añadió Avicel al recipiente de un granulador de alto cizallamiento. Mezclando a 500 rpm, la  
10 solución de recubrimiento se añadió al Avicel. Al terminar de agregar la solución, los gránulos se mezclaron y se cortaron durante 1 minuto. Los gránulos húmedos obtenidos se cargaron en el recipiente de un lecho fluido, se secaron durante 15 minutos y, a continuación, se descargaron los gránulos de linaclotida.

Tabla 10

15

Ejemplo	Cantidad de catión [ ]	Cantidad de amina [ ]	Cantidad de aglutinante	Cantidad de linaclotida	Cantidad de carga
26B	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 7,68 g [60]	Leucina 3,42 g [30]	N/D	1,54 g	Isomalt 488 g

[0110] En la fórmula de granulación en húmedo, la relación molar de CaCl<sub>2</sub> y leucina con respecto a linaclotida se ajustó en el intervalo de 60 a 100 y de 30 a 50, respectivamente. Además, se añadió sacarosa en un ejemplo. Ver  
20 tabla 11.

Tabla 11

20

Ejemplo	Fuerza (Linaclotida/carga)	Carga	CaCl <sub>2</sub> :Leu: Linaclotida	Sacarosa	HCl
26C	600 µg/225 mg	Avicel	60:30:1	No	0,1 N
26D	600 µg/225 mg	Avicel	80:40:1	No	0,1 N
26E	600 µg/225 mg	Avicel	100:50:1	No	0,1 N
26F	600 µg/225 mg	Avicel	60:30:1	5%	0,1 N

*Formulación de comprimidos*

25 [0111] Los gránulos de linaclotida se mezclaron con los siguientes excipientes (véase la Tabla 12) y se formaron comprimidos con una dureza de ~4kp.

Tabla 12

30

Ingrediente Función	Peso en 200 mg de comprimido con 150 µg de linaclotida	Peso en 400 mg de comprimido con 300 µg de linaclotida	Peso en 800 mg de comprimido con 600 µg de linaclotida	Peso en 1600 mg de comprimido con 1200 µg de linaclotida
Gránulos de linaclotida API	53,4 mg	106,8 mg	213,6 mg	427,2 mg
Comprimido de isomalt Carga	134,1 mg	268,2 mg	536,4 mg	1072,8 mg
Crospovidona Disgregante	10 mg	20 mg	40 mg	80 mg
Estarato de magnesio Lubricante	1,5 mg	3 mg	6 mg	12 mg
Talco Deslizante	1 mg	2 mg	4 mg	8 mg
Total de materia seca	200 mg	400 mg	800 mg	1600 mg

[0112] También se usaron isomalt, almidón 1500 o fosfato dicálcico como carga de comprimido en base a la fórmula anterior (véase la Tabla 13).

Tabla 13

Granulación	Carga	CaCl <sub>2</sub> :leucina:Linaclotida	Carga del comprimido
Lecho fluido	Isomalt	60:30:1	Isomalt
			almidón 1500
			fosfato dicálcico
Lecho fluido	Avicel	60:30:1	almidón 1500
Granulación en húmedo	Avicel	100:50:1	almidón 1500
Granulación en húmedo	Avicel	60:30:1 + sacarosa al 5%	almidón 1500

[0113] Después de dos semanas de almacenamiento a 40°C y 75% de humedad relativa, todos los comprimidos 5 descritos en la Tabla 13 exhibieron valores de ensayo de linaclotida superiores al 90%.

#### Ejemplos 27-53: Preparación de formulaciones de linaclotida

[0114] Las formulaciones de linaclotida de los Ejemplos 27-53 fueron producidos esencialmente como se describe 10 en el Esquema de Formulación A y los Ejemplos 1-15. La solución de recubrimiento de linaclotida contenía un 0,7% de aglutinante (p/v) y la solución de recubrimiento se pulverizó sobre perlas Celphere CP-305, tal como se describe en los Ejemplos 1-15. La Tabla 14 proporciona el tipo de catión, amina y/u otro excipiente junto con sus relaciones molares con respecto a linaclotida, así como el tipo de aglutinante utilizado, mientras que la Tabla 15 proporciona las 15 condiciones bajo las cuales se recubrieron las perlas:

Tabla 14

Ejemplo	Catión	Amina	Relación molar	Agglutinante	Aditivo
27	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	-	20:0:1	Hipromelosa	-
28	MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	-	20:0:1	Hipromelosa	-
29	KCl	-	20:0:1	Hipromelosa	-
30	AlCl <sub>3</sub> •6H <sub>2</sub> O	-	20:0:1	Hipromelosa	-
31	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	Leucina	60:30:1	Hipromelosa	-
32	Alginato de Ca	Leucina	60:30:1	Hipromelosa	-
33	CaHPO <sub>4</sub>	Leucina	60:30:1	Hipromelosa	-
34	Estearato de Ca	Leucina	60:30:1	Hipromelosa	-
35	CaSO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	Leucina	60:30:1	Hipromelosa	-
36	Zn(OAc) <sub>2</sub>	Leucina	60:30:1	Hipromelosa	-
37	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	Isoleucina	60:30:1	Hipromelosa	-
38	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	Valina	60:30:1	Hipromelosa	-
39	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	Metionina	60:30:1	Hipromelosa	-
40	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	Fenilalanina	60:30:1	Hipromelosa	-
41	-	Histidina	0:20:1	Hipromelosa	-
42	-	Triptófano	0:20:1	Hipromelosa	-
43	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	-	0:20:1:20 (vit. E)	Hipromelosa	Vitamina E
44	-	Ácido 1-aminociclohexano carboxílico	0:20:1	Hipromelosa	-
45	-	Ciclohexilamina	0:20:1	Hipromelosa	-
46	-	2-metilbutilamina	0:20:1	Hipromelosa	-
47	-	Quitosano	0:20:1	Hipromelosa	-
48	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	Leucina	60:30:1	Polivinil pirrolidona	-
49	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	Leucina	60:30:1	Metil celulosa (Methocel A15)	-
50	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	Leucina	60:30:1	Hidroxipropil celulosa	-
51	NaCl	-	20:0:1	Hipromelosa	-
52	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	Leucina	60:30:1	Gelatina	-
53	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	Glicina	60:30:1	Hipromelosa	-

\* "Catión" se refiere al catión contenido en la sal utilizada en el ejemplo, "Amina" se refiere a la amina primaria impedida estéricamente, "Relación molar" se refiere a la relación molar del catión:amina:linaclotida:aditivo (si corresponde).

Tabla 15

Ejemplo	T de	T de entrada	Velocidad de	Presión de	Flujo de aire
---------	------	--------------	--------------	------------	---------------

20

ES 2 785 980 T3

	pulverización del producto (°C)	(°C)	pulverización (g/min)	atomización (psig)	
27	25,1-35,1	37,0-50,1	0,44-0,62	20	Bajo
28	24,1-35,8	37,3-50,9	0,30-0,61	18-20	Bajo
29	28,1-34,7	37,6-47,8	0,50-0,63	18	Bajo
30	29,8-35,0	33,9-50,2	0,32-0,47	20	Bajo
31	25,5-35,1	34,6-50,4	0,40-0,61	20	Bajo
33	30,4-35,2	38,7-51,0	0,48-0,52	20	Bajo
35	29,9-34,9	37,8-50,4	0,37-0,76	20	Bajo
36	29,9-35,4	38,0-50,1	0,38-0,50	21	Bajo
37	27,3-34,9	36,2-50,1	0,45-0,54	20	Bajo
38	27,6-36,2	36,9-47,3	0,43-0,66	20	Bajo
39	30,1-35,8	40,6-47,1	0,30-0,48	20	Bajo
40	31,7-37,5	41,3-51,0	0,40-0,67	18	Bajo
41	29,4-36,2	41,7-49,5	0,48-0,53	20	Bajo
42	31,0-38,6	42,4-51,2	0,52-0,64	20	Bajo
44	31,0-37,6	39,5-48,8	0,40-0,46	18	Bajo
45	28,7-36,5	37,1-49,2	0,49-0,61	18	Bajo
46	28,6-35,2	37,1-47,2	0,39-0,53	18	Bajo
47	33,4-38,7	40,6-48,5	0,48-0,47	18-26	Bajo
48	31,6-36,1	41,6-46,7	0,36-0,72	18	Bajo
49	28,5-36,5	36,8-48,1	0,45-0,51	18	Bajo
50	27,9-36,4	37,1-48,6	0,35-0,60	18	Bajo
51	29,3-37,9	36,7-49,2	0,42-0,55	18	Bajo
52	29,8-36,3	36,1-49,1	0,44-0,54	18	Bajo
53	28,9-35,8	36,5-47,7	0,45-0,52	18	Bajo

[0115] Se experimentaron problemas de procesamiento durante la pulverización sobre las perlas para los ejemplos 32 (alginato de calcio), 34 (Estearato de calcio) y 43 (CaCl<sub>2</sub>:Vitamina E). Por lo tanto, la solución de recubrimiento se mezcló con las perlas Celphere y las perlas se secaron en una bandeja.

5

**Ejemplo 54: Prueba de estabilidad de las formulaciones de linaclotida**

[0116] Para las formulaciones de los Ejemplos 27-53, se llenaron las cápsulas de gelatina con aproximadamente 225 mg de perlas activas (600 µg de linaclotida/cápsula). Se colocaron cinco cápsulas rellenas en botellas de plástico. Las botellas contenían 1 g de desecante y se sellaron por inducción. Las botellas se almacenaron a 40 °C/75% de HR durante tres meses o seis meses.

10

[0117] El contenido de linaclotida (µg/mg) y el porcentaje de pureza cromatográfica (% CP) se midieron esencialmente como se describe en el Ejemplo 21 o mediante un procedimiento equivalente. Los resultados se proporcionan en la Tabla 16A (estabilidad de tres meses) o en la Tabla 16B (estabilidad de seis meses).

15

Tabla 16A

Ejemplo	% de inicial [ ] del ensayo*	% CP	% CP [% de inicial]
27	96,30	93,98 %	98,07
28	96,82	93,59 %	96,07
29	101,56	92,71 %	95,40
30	109,06	93,07%	95,76
31	103,59	95,98 %	99,12
32	66,53	82,66 %	85,27
33	96,81	91,94 %	93,55
34	30,75	55,47 %	56,88
35	101,37	93,07%	95,02
36	105,27	91,49 %	93,45
37	109,22	95,73 %	97,99
38	99,24	95,79 %	97,59
39	95,22	95,76 %	97,82
40	102,98	95,68 %	97,60
41	110,92	94,03 %	96,30
42	120,05	88,57 %	91,65
43	58,51	70,99 %	74,06

ES 2 785 980 T3

44	98,83	93,84 %	96,88
45	91,72	90,07 %	93,71
46	90,17	89,45 %	91,67
47	105,70	88,59 %	91,31
48	106,92	95,11 %	97,62
49	96,48	94,62 %	96,60
50	112,30	95,86 %	98,98
51	102,92	91,80 %	99,79
52	108,12	83,10 %	86,80
53	104,22	95,25 %	97,95

\* Variabilidad en los valores para el Ensayo [% p/p de inicial] refleja el control imperfecto sobre la uniformidad del contenido para estos lotes de cápsulas, que se fabricaron a pequeña escala.

[0118] Se cree que las dificultades encontradas durante el procesamiento y el procedimiento de procesamiento modificado resultante para los Ejemplos 32, 34 y 43 (ver arriba) podría explicar la menor estabilidad observada en estas muestras.

5

Tabla 16B

Ejemplo	% de inicial [p/p] del ensayo	% Área mediante HPLC			
		Linaclotida (% de inicial)	Oxidación	Hidrólisis	Formaldehído lmina
27	91,58	89,68 (93,58)	0,09	0,60	1,59
28	93,36	88,44 (90,78)	0,24	0,41	1,55
29	93,73	87,79 (90,34)	0,18	0,53	1,82
30	108,63	93,93 (96,65)	0,39	1,11	0,44
31	94,53	86,63 (89,67)	-	0,41	0,98
32	69,28	73,15 (75,46)	0,97	1,93	1,69
33	88,91	85,96 (87,46)	0,97	3,86	0,17
34	77,37	70,42 (72,21)	0,67	0,99	1,78
35	95,34	88,85 (90,71)	0,39	1,80	0,33
36	102,83	87,27 (89,14)	3,31	1,86	0,21
37	99,33	87,23 (89,29)	-	0,59	0,25
38	93,97	86,27 (87,89)	-	0,42	0,45
39	87,78	85,23 (87,07)	-	0,40	0,31
40	94,36	86,28 (88,01)	-	0,46	0,41
41	104,28	90,04 (92,22)	0,33	1,61	0,52
42	117,92	76,85 (79,52)	0,14	1,21	0,10
43	54,21	59,54 (62,12)	5,92	4,44	1,83
44	92,56	90,24 (93,17)	0,16	1,47	0,54
45	76,23	79,57 (82,78)	0,17	0,87	1,22
46	73,07	78,92 (80,88)	0,51	0,66	0,65
47	97,65	82,73 (85,27)	0,92	0,60	2,68
48	93,94	85,24 (87,49)	0,05	0,69	0,20
49	51,65	63,46 (64,79)	0,96	0,58	2,24
50	104,75	92,61 (95,62)	-	0,38	0,48
51	94,15	88,19 (92,01)	-	0,58	1,35
52	100,06	72,81 (75,62)	0,06	0,49	0,41
53	95,74	89,80 (92,35)	0,06	0,36	1,40

[0119] Los valores de pureza cromatográfica para los Ejemplos 27-53 en el punto temporal de seis meses parecen atípicamente bajos, particularmente con respecto a los puntos temporales de tres meses para estas muestras. Las tendencias relativas para los efectos estabilizadores o desestabilizadores se pueden establecer mediante la comparación con el Ejemplo 27 y el Ejemplo 31 como experimentos de referencia interna, para los cuales los valores de pureza cromatográfica son aproximadamente un 6-8% más bajos que los observados consistentemente en otros estudios que se han realizado (ver, por ejemplo, los Ejemplos 2 y 9). Los datos de tres meses proporcionados en la Tabla 16A para las mismas formulaciones muestran valores de pureza cromatográfica más típicos. Por lo tanto, los bajos valores de pureza cromatográfica a los seis meses probablemente se deban a una capacidad desecante insuficiente a los seis meses para estas condiciones particulares de almacenamiento. Esta hipótesis está respaldada por los picos de impurezas que se observan y que son indicativos de exposición a la humedad.

20 **Ejemplo 55: Prueba de estabilidad de formulaciones de linaclotida a 25 °C/60% de HR durante 24 meses**

**[0120]** Para las formulaciones de los Ejemplos 8-15 y 17, las cápsulas de gelatina se llenaron con aproximadamente 225 mg de perlas activas. Se colocaron cinco cápsulas rellenas en botellas de plástico. Las botellas contenían 1 g de desecante y se sellaron por inducción. Las botellas se almacenaron a 25 °C/60% de HR durante 24 meses.

- 5 **[0121]** El contenido y la pureza de linaclotida, así como la cantidad de sustancias relacionadas con linaclotida, se midieron esencialmente como se describe en el Ejemplo 21 o mediante un procedimiento equivalente. Los resultados se proporcionan en la Tabla 17.

Tabla 17

10

Ejemplo	% de inicial [p/p] del ensayo	% Área mediante HPLC			
		Linaclotida (% de inicial)	Oxidación	Hidrólisis	Formaldehído Imina
8	94,36	94,58 (101,7)	0,21	1,26	0,53
9	94,08	95,09 (97,86)	0,14	0,36	0,93
10	80,80	87,52 (90,84)	0,38	0,26	3,77
10a <sup>1)</sup>	89,29	91,55 (94,95)	0,50	0,39	1,60
10b <sup>2)</sup>	88,41	91,19 (95,02)	0,44	0,34	1,61
10c <sup>3)</sup>	72,35	72,36 (75,76)	0,30	0,26	19,13
11	87,50	90,25 (92,82)	1,03	0,42	1,94
12	62,82	66,77 (68,62)	2,20	1,24	2,11
13	90,59	93,79 (95,93)	1,21	0,65	0,77
14	91,41	94,88 (97,09)	0,18	0,47	0,65
15	90,91	90,31 (96,18)	0,17	0,56	1,64
17	91,45	92,92 (96,81)	0,71	0,56	0,73

<sup>1)</sup> Como en el Ejemplo 10 con recubrimiento protector adicional de Aquacoat (dispersión acuosa en etilcelulosa de Aquacoat, 15% p/p, FMC Biopolymer, ECD-30)

<sup>2)</sup> Como para el Ejemplo 10 con recubrimiento protector adicional de Opadry (dispersión Opadry AMB, 20% p/p, Colorcon).

<sup>3)</sup> Como para el ejemplo 10 con recubrimiento protector adicional de Eudragit (Eudragit E PO, Degussa, Roehm Pharma Polymers; SLS, ácido esteárico)

#### Ejemplo 56: Formulación de comprimidos de linaclotida y pruebas de estabilidad

- 15 **[0122]** Los gránulos de linaclotida activos se fabricaron mediante granulación en lecho fluido esencialmente como se describe en el Ejemplo 26 usando los reactivos descritos en la Tabla 18. Los gránulos de linaclotida se mezclaron con los excipientes descritos en la Tabla 19 y se formaron en comprimidos con una dureza de ~4kp.

**[0123]** Se envasaron 35 comprimidos en una botella de 60 cc con 5 gramos de desecante y se almacenaron a 40 °C/75% de HR durante hasta 3 meses o 30 °C/65% de HR durante hasta 3 meses.

20

**[0124]** El contenido y la pureza de la linaclotida, así como la cantidad de sustancias relacionadas con linaclotida, se midieron esencialmente como se describe en el Ejemplo 21 o mediante un procedimiento equivalente. Los resultados se proporcionan en la Tabla 20.

25

Tabla 18

Ingredientes	Función	Gránulo, 150 µg de linaclotida/53,7 mg gránulos
Linaclotida	API	0,15 mg
Manitol, USP	Carga de gránulo	50 mg
Leucina, USP	Estabilizante	0,64 mg
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	Estabilizante	0,72 mg
PVP K30, USP	Aglutinante	2,2 mg
Solución de HCl (pH 2,5)	-	-

Tabla 19

Ingredientes	Función	Comprimido (200 mg de peso total)
Gránulos de linaclotida	Activo	53,4
Isomalt, USP	Carga de comprimido	134,1
Croscarmelosa sódica, USP	Disgregante	10
Estearato de magnesio, USP	Lubricante	1,5

Talco, USP	Deslizante	1,0
------------	------------	-----

Tabla 20

Condición	Tiempo	% de cambio en el ensayo	Degradación total
40 °C/75% de HR	Inicial	100	2,27
40 °C/75% de HR	1 mes	96,2	2,09
40 °C/75% de HR	2 meses	102	2,15
40 °C/75% de HR	3 meses	99,5	1,52
30 °C/65% de HR	3 meses	100,1	1,19

5 **Ejemplo 57: Formulación de cápsulas de linaclotida**

[0125] La formulación de linaclotida del Ejemplo 57 se produjo esencialmente como se describe en el Ejemplo 16. La Tabla 21 proporciona los ingredientes de la solución de recubrimiento y sus pesos teóricos (mg/g) y (kg/lote) para la solución en capas completa de fármaco linaclotida en perlas. La Tabla 22 proporciona los ingredientes y los pesos teóricos (mg/g) y (kg/Lote) para la preparación de las perlas activas de linaclotida. La formulación de linaclotida se encapsuló en cápsulas de gelatina dura, tamaño 2 (peso 61 mg), esencialmente como se describe en el Ejemplo 20. Las cápsulas de linaclotida de 150 µg contenían 56 mg de perlas de linaclotida (600 µg de linaclotida/225 mg de cápsulas) mientras que las cápsulas de linaclotida de 300 µg contenían 113 mg de perlas de linaclotida (600 µg de linaclotida/225 mg de perlas).

15

Tabla 21

Ingredientes	Función	Peso teórico (mg/g)	Peso teórico (kg/lote)
Linaclotida	API	2,67	0,067
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O, USP, EP, BP, JP	Estabilizante	15,41	0,385
L-leucina, USP	Aglutinante	6,87	0,172
Hidroxipropilmetilcelulosa, USP (Methocel E5 Premium LV)	-	7,00	0,175
Agua purificada, USP	-	-	16,666
HCl (36,5-38,0), NF	-	-	0,114

Tabla 22

20

Ingredientes	Función	Peso teórico (mg/g)	Peso teórico (kg/lote)
Solución de capas de fármaco linaclotida en perlas	Solución de recubrimiento	31,95	0,799
Esferas de celulosa microcristalina NF (Celphere CP-305)	Perlas	968,05	24,201
Total final: perlas de linaclotida, 600 µg/225 mg	Perlas activas	1000	25,000



## REIVINDICACIONES

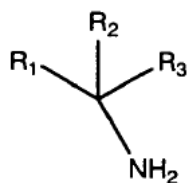
1. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable, linaclotida, un catión seleccionado de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  o  $Al^{3+}$ , y una amina primaria impedida estéricamente, en la que la composición farmacéutica es una composición sólida adecuada para administración oral.

2. Composición farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que dicho  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  o  $Al^{3+}$  se proporciona como cloruro de magnesio, cloruro de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, acetato de zinc, cloruro de manganeso, cloruro de potasio, cloruro de sodio o cloruro de aluminio.

3. Composición farmacéutica, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho catión es  $Ca^{2+}$ .

4. Composición farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que dicho catión es  $Ca^{2+}$  y se proporciona como cloruro de calcio.

5. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la amina primaria impedida estéricamente es un aminoácido, una amina polimérica o un compuesto de la fórmula:



en la que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  se seleccionan independientemente de: H;  $-C(O)OH$ ; alquilo  $C_1-C_6$ , opcionalmente sustituido por  $-CO_2H$ ,  $-CONH_2$ , o un arilo o heteroarilo de 5-10 miembros; alcoxilquilo  $C_1-C_6$ ; o tioalcoxilquilo  $C_1-C_6$ , en el que cualquiera de los grupos alquilo o arilo anteriores puede estar sustituido individual o de manera múltiple con halógeno o  $-NH_2$ , y siempre que no más de dos de  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  sean H.

6. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la amina primaria impedida estéricamente es histidina, fenilalanina, alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, leucina, metionina, asparagina, tirosina, treonina, isoleucina, triptófano o valina.

7. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la amina primaria impedida estéricamente es leucina.

8. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende además un deslizante farmacéuticamente aceptable, un lubricante farmacéuticamente aceptable o un aditivo farmacéuticamente aceptable que actúa como deslizante y como lubricante.

9. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende además uno o más de un antioxidante, un aglutinante farmacéuticamente aceptable o una carga farmacéuticamente aceptable.

10. Composición farmacéutica, según la reivindicación 9, en la que la composición comprende un aglutinante farmacéuticamente aceptable seleccionado de alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona (povidona), un almidón, maltodextrina o un éter de celulosa.

11. Composición farmacéutica, según la reivindicación 10, en la que el aglutinante farmacéuticamente aceptable es un éter de celulosa seleccionado de metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa.

12. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en la que la composición comprende una carga farmacéuticamente aceptable y la carga farmacéuticamente aceptable es celulosa, isomalt, manitol o fosfato de calcio dibásico.

13. Composición farmacéutica, según la reivindicación 12, en la que la celulosa se selecciona de celulosa microfina y celulosa microcristalina.

14. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la amina primaria impedida estéricamente es leucina y la relación molar de leucina con respecto a linaclotida es al menos 10:1.

15. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el catión es  $\text{Ca}^{2+}$ , la amina primaria impedida estéricamente es leucina y la relación molar de  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto a leucina es al menos 1:1.

5 16. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la relación molar de catión:amina primaria impedida estéricamente:linaclotida es 40-100:20-50:1.

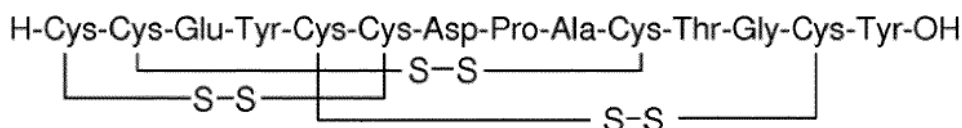
17. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el catión es  $\text{Ca}^{2+}$ , la amina primaria impedida estéricamente es leucina y la relación molar de  $\text{Ca}^{2+}$ :leucina:linaclotida es 60:30:1.

10

18. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que:

(i) un producto de hidrólisis que tiene una estructura de

15



20 comprende menos del 2% en peso en comparación con el peso de la linaclotida; o

(ii) un producto de oxidación de linaclotida que tiene un peso molecular de 1542,8 comprende menos del 2% en peso en comparación con el peso de la linaclotida.

19. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición

25 comprende:

linaclotida;

$\text{Ca}^{2+}$ ;

leucina e

hidroxipropil metilcelulosa,

30 en la que la linaclotida está presente en la composición farmacéutica en una cantidad entre 100  $\mu\text{g}$  y 600  $\mu\text{g}$  y la relación molar de  $\text{Ca}^{2+}$ :leucina:linaclotida está entre 5-100:5-50:1.

20. Composición farmacéutica, según la reivindicación 19, en la que el  $\text{Ca}^{2+}$  se proporciona como  $\text{CaCl}_2$ .

35 21. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende perlas recubiertas y las perlas están recubiertas con una solución de recubrimiento que comprende linaclotida.

22. Composición farmacéutica, según la reivindicación 21, en la que la solución de recubrimiento comprende:

40 linaclotida;

$\text{Ca}^{2+}$ ;

leucina e

hidroxipropil metilcelulosa,

en la que la linaclotida está presente en la composición farmacéutica en una cantidad entre 100  $\mu\text{g}$  y 600  $\mu\text{g}$  y la

45 relación molar de  $\text{Ca}^{2+}$ :leucina:linaclotida está entre 5-100:5-50:1.

23. Composición farmacéutica, según la reivindicación 22, en la que las perlas comprenden celulosa microcristalina.

24. Procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende linaclotida o una sal de la misma,

50 comprendiendo el procedimiento:

(a) proporcionar una solución acuosa que comprende:

(i) linaclotida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;

(ii) un catión seleccionado de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  o  $\text{Al}^{3+}$ , y una amina primaria impedida estéricamente; y

(iii) opcionalmente, un aglutinante farmacéuticamente aceptable; y

55 (b) aplicar la solución acuosa a una carga farmacéuticamente aceptable para generar una carga recubierta con linaclotida.

25. Procedimiento, según la reivindicación 24, en el que la solución acuosa se aplica a la carga mediante pulverización.

60

26. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-23, para usar en un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece motilidad intestinal alterada, síndrome del intestino irritable, estreñimiento, dispepsia, gastroparesia, pseudoobstrucción intestinal crónica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal o dolor asociado con el estreñimiento.

65

27. Composición farmacéutica para usar, según la reivindicación 26, en la que dicho síndrome del intestino irritable es el síndrome del intestino irritable con predominio del estreñimiento o el síndrome del intestino irritable alternante.
28. Composición farmacéutica para usar, según la reivindicación 27, en la que dicho síndrome del intestino irritable es el síndrome del intestino irritable con predominio del estreñimiento.
29. Composición farmacéutica para usar, según la reivindicación 26, en la que dicho estreñimiento es estreñimiento crónico, estreñimiento idiopático, íleo después de cirugía o estreñimiento causado por el uso de opiáceos.
30. Composición farmacéutica para usar, según la reivindicación 29, en la que dicho estreñimiento es estreñimiento crónico.
31. Composición farmacéutica para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 26-30, en la que la composición farmacéutica contiene de 50 µg a 1 mg de linaclotida.
32. Composición farmacéutica para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 26-30, en la que la composición farmacéutica contiene 67,5 µg, 133 µg, 150 µg, 266 µg o 300 µg de linaclotida.
33. Composición farmacéutica para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 26-30, en la que la composición farmacéutica contiene 266 µg de linaclotida.
34. Composición farmacéutica para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 26-30, en la que la composición farmacéutica contiene 133 µg de linaclotida.
35. Composición farmacéutica para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 26-34, en la que la composición farmacéutica se administra una vez al día o dos veces al día.
36. Composición farmacéutica para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 26-35, en la que la composición farmacéutica se administra una vez al día como uno o dos comprimidos o cápsulas.
37. Composición farmacéutica para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 26-36, en la que la composición farmacéutica se administra al paciente durante un período de al menos cuatro semanas.
38. Composición farmacéutica para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 26-37, en la que el tratamiento con la composición mejora al menos un síntoma seleccionado de dolor abdominal reducido, un aumento en el número de movimientos espontáneos completos del intestino (CSBM) en una semana, un aumento en el número de movimientos espontáneos del intestino (SBM) en una semana, mejor consistencia de las heces, menor esfuerzo, menor molestia abdominal, menor hinchazón o menor gravedad de los síntomas del síndrome del intestino irritable con estreñimiento (IBS-c).
39. Forma de dosificación unitaria que comprende una composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-23.
40. Recipiente sellado que comprende una pluralidad de formas de dosificación unitarias, según la reivindicación 39.
41. Uso de una composición farmacéutica, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que padece motilidad intestinal alterada, síndrome del intestino irritable, estreñimiento, dispepsia, gastroparesia, pseudoobstrucción intestinal crónica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal o dolor asociado con el estreñimiento.

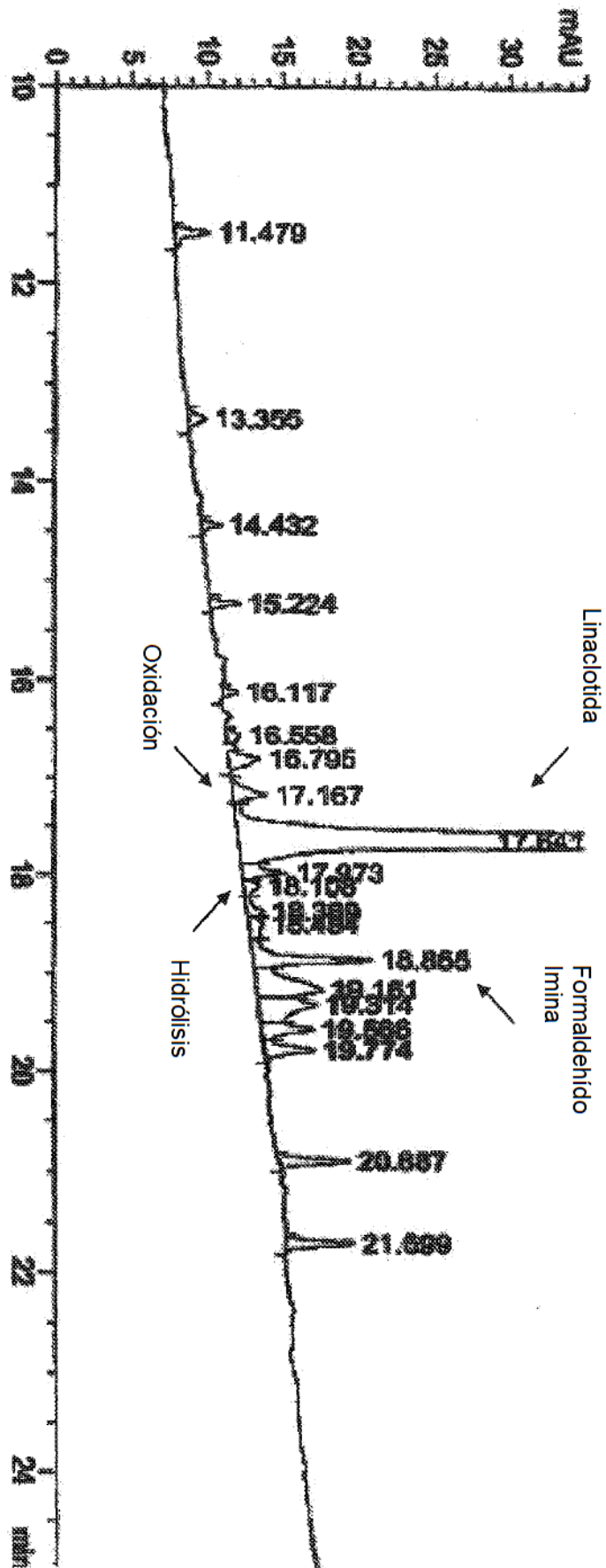


Figura 1