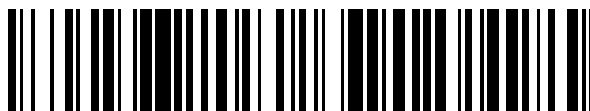


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 761**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 38/22** (2006.01)  
**A61K 47/20** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61K 9/14** (2006.01)  
**A61K 38/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2012 E 12798470 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2773331**

54 Título: **Formulaciones para el tratamiento de la diabetes**

30 Prioridad:

**31.10.2011 US 201161553388 P**  
**09.03.2012 US 201261609123 P**

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

**21.06.2016**

73 Titular/es:

**XERIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**3208 Red River, Suite 300**  
**Austin TX 78705, US**

72 Inventor/es:

**PRESTRELSKI, STEVEN y**  
**SCOTT, NANCY**

74 Agente/Representante:

**URIZAR LEYBA, José Antonio**

Observaciones :

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

**ES 2 574 761 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

5 Formulaciones para el tratamiento de la diabetes

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## A. Campo de la invención

10 [0001] La invención se refiere a formulaciones de insulina para la administración vía parenteral. Estas formulaciones pueden incluir formas monoméricas y diméricas estables de insulina, acelerando con ello la velocidad de absorción de la insulina dentro del torrente sanguíneo de un sujeto.

## B. Descripción de la técnica relacionada

15 [0002] Los pacientes con diabetes Tipo 1 producen poca o nada insulina, y por lo tanto el principal tratamiento para la diabetes Tipo 1 es la terapia por medio de insulina exógena. Además, debido a las limitaciones de los tratamientos sin insulina, muchos pacientes con diabetes Tipo 2 terminan necesitando terapias con insulina. Históricamente, la insulina se ha utilizado durante más de 90 años para el tratamiento de la diabetes. Un tratamiento típico conlleva la administración de varias inyecciones de insulina al día: una insulina basal de acción prolongada una o dos veces al día y una insulina de acción rápida en las comidas. Este tratamiento a pesar de haber sido considerado eficaz tiene sus limitaciones. En primer lugar, a los pacientes normalmente les disgusta inyectarse insulina debido a las molestias y al dolor que les causan las agujas. Por ello, los pacientes no suelen cumplir adecuadamente los regímenes de tratamiento prescritos. Incluso más importante, aun cuando son administrados de forma adecuada, no existen productos inyectables de insulina en las horas de las comidas que repliquen adecuadamente la acción fisiológica natural de la insulina humana. En particular, la respuesta en una primera fase de un no diabético consiste en una aceleración de la secreción de insulina, en donde el nivel de insulina en sangre aumenta bastantes minutos después la entrada de glucosa en sangre por una comida. El nivel de insulina en sangre repunta entonces a los 30 y 60 minutos después del inicio de la acción. En contraste, la insulina inyectada entra en la sangre lentamente, en una concentración máxima observada (Cmax) lo que ocurre después de 90 minutos o más de la inyección de insulina regular humana.

20 [0003] A fin de lograr diferentes perfiles farmacocinéticos (PK) se han venido desarrollando diversas clases de insulina terapéutica y análogos de insulina para compensar los tiempos de inicio de acción, tiempo hasta el pico en plasma junto con la duración de su acción. Una mejora clave en los tratamientos de insulina fue la introducción de análogos de insulina de acción rápida, incluyendo Humalog, Novolog® y Apidra®. Sin embargo, incluso con estos análogos, los picos en los niveles de insulina ocurren normalmente 60 minutos después de la inyección. El fracaso de los productos de insulina que se comercializan actualmente para simular adecuadamente la liberación de insulina en una primera fase tiene como resultado deficientes niveles de insulina al comienzo de una comida y niveles excesivos de insulina entre las comidas, lo cual puede tener el efecto fisiológico de sufrir hiperglucemia al pronto de comenzar a comer y de hipoglucemia más tarde después de las comidas. Ambas situaciones representan importantes desafíos a la promesa de una tecnología de páncreas artificial de ciclo cerrado que requiere algoritmos complejos para gestionar ambas latencias.

25 [0004] Para los pacientes diabéticos tratados con insulina, la principal ruta de administración de insulina exógena es la subcutánea, y los parámetros principales del perfil PK dependen de la absorción subcutánea. Una serie de variables afectan a la absorción de la insulina inyectada por vía subcutánea (por ejemplo, el flujo de sangre, las velocidades de difusión, y el estado de asociación). Cuando las velocidades del flujo de sangre son suficientes, los factores que limitan la velocidad de absorción de la insulina soluble son (a) el transporte intersticial a los capilares mediante difusión y (b) la restricción del transporte sobre la membrana capilar, factores ambos gobernados por el tamaño de la molécula (es decir, el estado de asociación de la insulina).

30 [0005] Normalmente, las formulaciones de insulina tienen una base acuosa. Una razón para ello es que el cuerpo humano esta compuesto en su mayoría de agua, incluyendo el plasma sanguíneo el cual tiene un entorno acuoso. Por lo tanto, la tendencia natural es administrar una formulación de fármaco que sea compatible con el entorno que el medicamento deberá alcanzar. Mientras que las formas de insulina monoméricas y diméricas se absorben más fácilmente en el torrente sanguíneo debido a sus tamaños más pequeños, al compararlas con la forma de hexámero de insulina, la insulina está presente normalmente en las composiciones farmacéuticas en formas estabilizadas de hexámeros de uniones de zinc. La insulina monomérica en solución acuosa es inestable ya que forma fibrillas amiloideas que se degradan por las vías de transmisión de agua. Si bien la estructura de hexámero promueve la estabilidad en una solución (pH 5-8), también dificulta la difusión y la absorción que sigue. Además, el volumen del depósito de la inyección tendrá también un efecto sobre la difusión, ya que cuanto mayor sea el volumen más lenta será la velocidad de difusión. Esta combinación de factores es la principal responsable de la latencia al inicio de la acción y el pico en los niveles de insulina en plasma.

35 [0006] Para prevenir la fibrilación y la degradación de la insulina en una solución acuosa al tiempo que se promueve la absorción subcutánea, se han desarrollado análogos de insulina en donde se ha variado la secuencia de aminoácidos para reducir la propensión a la autoasociación mientras se preserva la afinidad de fijación al receptor. A estas clases de insulina se les llama a menudo insulina "monomérica", pero en realidad son hexámeros asociados débilmente. La absorción de estos preparados se retrasará todavía porque depende de la difusión y la subsiguiente disminución de la concentración subcutánea que necesita el hexámero para disociar a dímero o a monómero. Los análogos de insulina de equilibrio a favor

del estado monomérico (por ejemplo, el análogo de insulina Lispro) han mostrado tener una absorción más rápida y una duración de acción más corta. Sin embargo, estas moléculas de analógicos son menos estables y más propensas a la agregación irreversible bajo estrés térmico y mecánico en comparación a la insulina hexamérica. Además incluso, estos agregados no sólo disminuyen la dosis de insulina disponible, también pueden inducir irritación o reacciones inmunes en los pacientes. Estudios experimentales y epidemiológicos han mostrado su preocupación con respecto a las señales prolongadas de la maquinaria receptora y la inducción de la proliferación de tumores ocasionados por ciertos análogos de insulina recientes. A pesar de sus déficits, los análogos de insulina son caros; cuestan alrededor del doble que la insulina humana regular.

10 [0007] El documento GB 2119248A revela una solución de insulina en DMSO y sugiere la presencia de monómeros de insulina en solución. Sin embargo, este documento no revela el proceso de preparación como se describe en la presente solicitud.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

15 [0008] La presente invención proporciona una solución a los problemas actuales de las formulaciones de insulina. La invención reside en el secado de la insulina en un tampón para crear una forma seca de insulina que mantiene un pH deseado después de reconstituirla y solubilizarla en un disolvente polar aprótico. La presente invención es una formulación para la administración vía parenteral que comprende:

- 20 (a) insulina que comprende una memoria de pH entre 1 a 4 ó entre 6 y 8, la cual previamente se ha secado desde un tampón no volátil; y  
(b) un disolvente polar aprótico,

25 en donde la insulina se solubiliza en el disolvente polar aprótico, en donde la mayor parte de la insulina solubilizada comprende formas monoméricas o diméricas estables de insulina o sus mezclas, y en donde el contenido de agua de la formulación es igual a o menor del 15% w/v.

30 [0009] La formulación resultante incluye formas monoméricas y diméricas de insulina solubilizadas y estabilizadas. Cabe destacar que las formulaciones pueden tener cantidades relativamente pequeñas de agua (20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1% o menos) o pueden ser no acuosas, lo cual permite además una mayor cantidad de insulina presente en la formulación, y que reduce así el volumen de formulación que contiene insulina a administrar a un sujeto. Además, la invención permite utilizar ambas formas de insulinas; no modificadas o formas nativas y las modificadas o análogos de insulina. Dicho de otra manera, aunque se puede utilizar los análogos de insulina en la presente invención, también se puede utilizar insulina no modificada o nativa y seguir siendo estable tanto en sus formas monoméricas como diméricas.

40 [0010] En un aspecto de la presente invención, se revela una formulación que comprende insulina que tiene una memoria de pH entre 1 y 4 (ó entre 1 y 3 ó alrededor de 2) ó entre 6 y 8 (ó 6.5 y 7.5 ó alrededor de 7) y un disolvente polar aprótico, en donde la insulina se puede solubilizar en el disolvente polar aprótico, en donde la insulina monomérica solubilizada puede incluir formas estables monoméricas o diméricas de insulina o sus mezclas, y en donde el contenido de agua en la formulación puede ser igual o menor de 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1% p/v ó p/p ó menor (por ejemplo, anhidro). La formulación se puede utilizar para la administración vía parenteral. En ciertos aspectos, el disolvente polar aprótico puede ser dimetilsulfóxido (DMSO), nmetil pirrolidona (NMP), acetato de etilo, dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA), o carbonato de propileno, o mezclas de los mismos. En ciertos aspectos, el disolvente polar aprótico puede ser dimetilsulfóxido (DMSO). En algunos aspectos, la formulación comprende entre 3 mg/ml y 50 mg/ml, entre 3 mg/ml y 10 mg/ml, ó entre 10 mg/ml y 50 mg/ml de insulina. En otros, puede incluir 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100 mg/ml, ó más cuando sea necesario, o cualquier rango en ellos. En algunos aspectos, la mayor parte de la insulina dentro de la formulación tiene forma monomérica o dimérica o una combinación de formas monoméricas y diméricas. La formulación puede incluir además ingredientes capaces de reducir la agregación de formas monoméricas o diméricas de insulina. Ejemplos no limitativos de tales ingredientes incluyen urea, cloruro de guanidinio, un aminoácido, un azúcar, un poliol, un polímero, un ácido, o un tensoactivo, o mezclas de los mismos. En ciertos aspectos, el ácido puede ser ácido acético, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido glutámico, ácido aspártico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, o ácido adipico, o sus mezclas. La formulación puede incluir un co-disolvente. Un ejemplo de no limitativo de un codisolvente es el agua. En algunos aspectos, la formulación no incluye zinc, incluye bajas cantidades de zinc y / o incluye zinc que está enlazado a un agente quelante con el fin de reducir la probabilidad de formación de hexámero. En ciertos aspectos, la insulina se puede secar previamente en un tampón no volátil, dicho tampón puede tener un intervalo de pH entre 1 a 4 ó entre 1 a 3 ó alrededor de 2 ó entre 6 a 8 ó entre 6.5 a 7.5 ó alrededor de 7. Pueden ser ejemplos de tampones no volátiles, un tampón de glicina, un tampón de citrato, o un tampón de fosfato, o mezclas de los mismos. En algunos aspectos, el tampón puede incluir un agente quelante. Ejemplos no limitativos de agentes quelantes incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilen glicol tetraacético (EGTA), ácido tartárico, glicerina, o ácido cítrico o cualquier combinación de los mismos. La formulación también puede incluir un ingrediente capaz de disminuir el punto de congelación del disolvente polar aprótico a alrededor de 0°C, y ejemplos no limitativos de tal ingrediente incluyen el agua, un azúcar, un alcohol de azúcar, o mezclas de los mismos. En algunos casos, la insulina puede ser no modificada o insulina humana nativa. En otros aspectos, la composición puede incluir además un adyuvante de insulina tal que un análogo de amilina. El análogo de la amilina se puede solubilizar en la formulación. Un ejemplo no limitativo de un análogo de amilina es la pramlintida. La pramlintida se puede procesar para que tenga una memoria de pH entre 1 y 5, ó 2, 3, ó 4, ó alrededor de 2. En algunos casos particulares de la coformulación, la memoria de pH de insulina puede ser alrededor de 2 y la memoria de pH de pramlintida puede ser alrededor de 2. En algunos aspectos, el procesado de la pramlintida puede incluir secar dicha pramlintida en un tampón no volátil, dicho tampón tiene un rango de pH entre 1 y

5, ó 2, 3, ó 4, ó alrededor de 2. En las formulaciones que incluyen insulina y pramlintida, el contenido de agua puede ser entre 5 y 20% p/v ó p/p ó entre 5 y 15% p/v ó p/p ó entre 7 y 12% p/v ó p/p, ó entre 8 y 10% p/v ó p/p, ó alrededor de 9% p/v ó p/p. La formulación puede estar en forma líquida. La formulación puede ser una solución. En ciertos aspectos, menos del 50, 60, 70, 80, o 90% ó un porcentaje mayor de la insulina dentro de la formulación puede mantenerse química y físicamente estable cuando la formulación se almacena a temperatura ambiente durante un mes. En algunos aspectos, la formulación puede estar comprendida dentro de un contenedor. El contenedor puede ser una jeringa, un dispositivo de inyección de bolígrafo, un dispositivo autoinyector, una bomba, o una bolsa de perfusión. En ciertos aspectos, el disolvente polar aprótico puede ser la fase continua de la formulación. La formulación puede incluir al menos un 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ó 99 % p/v ó p/p de disolvente polar aprótico. La insulina dentro de la formulación puede ser meta estable.

[0011] También se revela un procedimiento para disminuir el nivel de glucosa en sangre que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello, cualquiera de las formulaciones de la presente invención en una cantidad eficaz que reduzca el nivel de glucosa en sangre del sujeto. El sujeto puede ser una persona humana (adulto o niño) o un animal (por ejemplo, chimpancé, caballo, vaca, cerdo, conejo, rata, ratón, etc.). En ciertos casos, el nivel temprano de glucosa en sangre  $1/2$  Tmax en el sujeto disminuye a los 10, 20, 30 minutos, 60 minutos, o a los 90 minutos después de la administración. El sujeto puede haber estado ya diagnosticado con diabetes Tipo 1 o Tipo 2 o puede ser susceptible de desarrollar diabetes Tipo 1 o Tipo 2. En algunos casos, la formulación se puede administrar 30, 20, 15, 10 minutos, 5 minutos, o 1 minuto antes la ingestión de alimentos por el sujeto, o al 1 minuto, 5 minutos, 10, 15, 20 ó 30 minutos después de la ingestión de alimentos por el sujeto.

[0012] También se revela un procedimiento de fabricación de las formulaciones de la presente invención. El procedimiento puede incluir el secado de una mezcla que comprende insulina y un tampón no volátil para obtener la insulina seca, en donde la insulina seca puede tener una memoria de pH entre 1 y 4 (o entre 2 y 3 o alrededor de 2) o entre 6 y 8 (ó entre 6.5 y 7.5 ó alrededor de 7) y posteriormente se reconstituye la insulina seca en un disolvente polar aprótico, en donde la insulina se puede solubilizar en el disolvente polar aprótico, en donde la insulina solubilizada puede incluir formas monoméricas o diméricas estables de insulina o sus mezclas, y en donde el contenido de agua de la formulación puede ser igual o inferior del 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1 % p/v ó p/p ó menor (por ejemplo, anhidro). El procedimiento puede incluir además el secado de una mezcla que comprende un análogo de amilina y un segundo tampón no volátil para obtener un análogo de amilina seca y reconstituir el análogo de la amilina seca en el disolvente polar aprótico junto con la insulina seca, en donde el análogo de amilina seca se puede solubilizar en el disolvente polar aprótico. Como se señaló anteriormente, el análogo de la amilina puede ser pramlintida y puede procesarse para que tenga una memoria de pH entre 1 y 5, ó 2, 3, ó 4, ó en casos particulares alrededor de 2. En ciertos casos particulares de la co-formulación, la memoria de pH de la insulina puede ser alrededor de 2 y la memoria de pH de la pramlintida puede ser alrededor de 2. El segundo tampón no volátil puede tener un intervalo de pH entre 1 y 5 o alrededor de 2, 3, ó 4, ó más, particularmente cercano a 2. Este procedimiento puede incluir también añadir a la formulación un codisolvente tal que el agua en cantidades que varían entre 5 y 20% p/v ó p/p, ó entre 5 y 15% p/v ó p/p, ó entre 7 y 12% p/v ó p/p, ó entre 8 y 10% p/v ó p/p, ó alrededor del 9% p/v ó p/p.

[0013] Otro aspecto único de la presente formulación es que puede estar contenida en un recipiente, almacenarse y estar inmediatamente lista para administrarla por vía parenteral en función de las necesidades y sin tener que reconstituir o diluir la formulación. Por lo tanto, el recipiente en donde se puede almacenar la formulación puede ser una jeringa, un dispositivo de inyección de bolígrafo, un dispositivo autoinyector, una bomba, o una bolsa de perfusión. También se contempla utilizar en las formulaciones ingredientes adicionales y excipientes farmacéuticos. Ejemplos no limitativos de ellos incluyen: antioxidantes (los ejemplos incluyen ácido ascórbico, cisteína, metionina, monotioglicerol, tiosulfato de sodio, sulfitos, BHT, BHA, palmitato de ascorbilo, galato de propilo, o vitamina E); agentes quelantes (los ejemplos incluyen EDTA, EGTA, ácido tartárico, glicerina, o ácido cítrico); o conservantes (los ejemplos incluyen alcoholes de alquilo, alcohol bencílico, un parabeno de metilo, o un parabeno propil o mezclas de los mismos). La formulación puede tener forma líquida, forma semisólida, o forma de gel. Como veremos más adelante, la formulación puede tener una viscosidad en un rango deseado (en un ejemplo no limitativo, tal rango podría estar entre 0,5 y 15 cps).

[0014] Se contempla que cualquier realización descrita en esta memoria descriptiva pueda implementarse con respecto a cualquier procedimiento o composición de la invención, y viceversa. Además, las composiciones de la invención se pueden utilizar para lograr procedimientos de la invención.

[0015] "Insulina" significa insulina humana, no humana, recombinante, purificada, y o sintética (por ejemplo, insulina modificada o análogos de insulina. La " insulina humana" significa insulina de hormona péptida humana que es secretada por el páncreas que puede ser aislada a partir de una fuente natural, a partir de un organismo genéticamente alterado, fabricada en síntesis química, comprada, etc., la "Insulina no humana" es la insulina procedente de un animal (por ejemplo, cerdo, vaca, etc.).

[0016] "Insulina modificada" o "análogo de insulina" es una forma alterada de insulina, diferente de aquella en la naturaleza (por ejemplo, de modificación química, de estructura diferente, de diferente secuencia de aminoácidos), pero todavía estar disponible a un sujeto (por ejemplo, humano) para que realice la misma función que la insulina natural no modificada. Por ejemplo, a través de la ingeniería genética de la codificación de ADN, se puede variar la secuencia de aminoácidos de la insulina para alterar sus características ADME (absorción, distribución, metabolismo y o excreción). Ejemplos de análogos de insulina o insulina modificada incluyen Lispro®, Aspart®, Glulisine®, Detemir®, Degludec®, etc. La insulina natural o insulina no modificada incluye la secuencia de aminoácidos nativa o de origen natural.

## ES 2 574 761 T3

[0017] "Insulina estable" significa la insulina dentro de la formulación que no se agrega de manera irreversible dentro de la formulación o que de otro modo perdería su actividad una vez se administra la formulación. La insulina conserva su actividad una vez es absorbida en la sangre. Sin desear quedar limitado por la teoría, se cree que la insulina dentro de la formulación de la presente invención es "meta estable" en que, si bien la conformación de la insulina solubilizada puede cambiar, la insulina vuelve a su conformación nativa una vez administrada y absorbida en la sangre. Además, se cree que el cambio conformacional de la insulina dentro de la formulación reduce la probabilidad de agregación con otros monómeros de insulina y dímeros o adyuvantes tales como análogos de amilina presentes dentro de la formulación. "Forma monomérica de insulina" significa la insulina en su forma de monómero. "Forma dimérica de insulina" significa insulina en su forma dimérica (por ejemplo, dos monómeros asociados o acoplados entre sí). "Forma hexámera de insulina" significa la insulina en su forma de hexámero (por ejemplo, tres formas diméricas asociadas o acopladas entre sí).

[0018] "Libre de Zinc" o "bajo en zinc" significa que la formulación incluye zinc, alrededor de un 0,6% o menos (por ejemplo, 0,5 , 0,4 , 0,3 , 0,2 , 0,1, 0%) en relación al contenido de insulina o 3 iones de zinc por 6 monómeros de insulina o menos (por ejemplo, 2, 1, 0).

[0019] "Disolvente aprótico polar" significa un disolvente polar que no contiene hidrógeno ácido y no actúa como donador de enlace de hidrógeno. Como se señaló anteriormente, los ejemplos no limitativos incluyen dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetato de etilo, n-metil pirrolidona (NMP), dimetilacetamida (DMA) y carbonato de propileno.

[0020] "Administración vía parenteral" se refiere a la administración de la formulación por debajo o a través de una o más capas de piel o de las membranas mucosas de un animal, tal que un paciente humano. Las administraciones parenterales estándar se dan en la región subcutánea o intramuscular de un animal, por ejemplo, un paciente humano. Se han escogido estas localizaciones profundas ya que aquí el tejido se expande más fácilmente que en las zonas cutáneas superficiales y así para dar cabida a los volúmenes administrados por la inyección de insulina de las formulaciones. La administración se puede hacer con una aguja, una bomba, un dispositivo de inyección, un catéter, etc.

[0021] "Vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o vehículo para administrar insulina a un mamífero tal que un animal o humano.

[0022] Ingrediente, excipiente o componente "Farmacéuticamente aceptable" es el adecuado para utilizarlo con humanos y o animales sin indebidos efectos secundarios adversos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) acorde en una relación riesgo beneficio razonable.

[0023] "Biodisponible" significa que es adecuado para ser utilizado con humanos o animales sin indebidos efectos secundarios adversos. (tales como toxicidad, irritación, y respuesta alérgica) acorde con una razonable relación riesgo beneficio.

[0024] "Biodisponibilidad" se refiere al grado en que el sujeto absorbe la insulina de la formulación.

[0025] "Sistémicas" significan con respecto a la entrega o administración de insulina a un sujeto, a que el agente terapéutico es detectable a un nivel biológicamente significativo en el plasma sanguíneo del sujeto.

[0026] "Paciente", "sujeto" o "individuo" se refiere a un mamífero (por ejemplo, humano, primate, perro, gato, bovino, ovino, porcino, equino, ratón, rata, hámster, conejo, o conejillo de indias).

[0027] "Inhibir" o "reducir" o cualquier variación de estos términos, cuando se usa en las reivindicaciones y o en la especificación incluye cualquier disminución medible o inhibición completa para lograr un resultado deseado.

[0028] "Eficaz" o "trata" o "previene" o cualquier variación de estos términos, cuando se usa en las reivindicaciones y o la memoria descriptiva, significa los medios adecuados para lograr un resultado deseado, que se espera, o se tiene previsto.

[0029] El término "alrededor de " o "aproximadamente" se definen como estar cerca de, como lo entiende alguien experto ordinario de la técnica, y en una realización no limitativa, los términos se definen para estar dentro del 10%, preferiblemente dentro del 5%, más preferiblemente dentro del 1%, y más preferiblemente dentro de 0,5%. Además, "sustancialmente no acuoso" se refiere a menos del 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o menos, por peso o volumen de agua.

[0030] El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto al término "que comprende" en las reivindicaciones y o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno."

[0031] Las palabras "comprendiendo" ( y cualquier forma de comprender, tales como "comprende" y "comprenden"), "teniendo" ( y cualquier forma de tener, tales como "que tiene" o "que tienen"), "incluyendo" ( y cualquier forma de incluir, tales como "incluye" e "incluyen") o "conteniendo" ( y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contienen") son inclusivas o de composición abierta y no excluyen elementos adicionales no citados, o pasos del procedimiento.

[0032] Las composiciones y procedimientos para su uso pueden "comprender", "consistir esencialmente en" o "consistir en" cualquiera de los ingredientes o pasos revelados a lo largo de la memoria. Con respecto a la fase de transición "que consiste esencialmente de ", en un aspecto no limitativo, una característica básica y nueva de las formulaciones y procedimientos revelados en esta memoria descriptiva incluye la estabilidad y solubilidad de las formas monoméricas y/o

diméricas de insulina dentro de dichas formulaciones. Por lo tanto, los ingredientes que pueden afectar a la estabilidad o a la solubilidad de las formas monoméricas y/o diméricas de insulina dentro de las formulaciones serían excluidos de dichas formulaciones en los casos en que una reivindicación utilizara la frase de transición "que consiste esencialmente de".

5 [0033] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Deberá entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos, aunque indican formas específicas de realización de la invención, solamente se especifican a modo de ilustración. Además, se contempla que los cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención resulten evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

## 10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0034] Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o varios de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas que se presentan a continuación.

15

FIG. 1: El espectro FTIR de formulaciones de insulina DMSO e insulina acuosa.

FIG. 2: Peso molecular aparente de las formulaciones de insulina DMSO e insulina acuosa.

20

FIG. 3: Distribución de radio hidrodinámico de Ins-E a 50 mg/ml en DMSO. El eje horizontal es una cuadrícula logarítmicamente espaciada de valores de radio hidrodinámico (con puntos adyacentes que difieren en un factor de alrededor de 1,3). El análisis cubre un radio o radio entre 0,01 nm y 20  $\mu$ m. Los picos de señal entre 0,01 y 0,1 nm los cuales son artefactos que surgen posterior a pulsación del fotodetector se han suprimido.

FIG. 4: Distribución de radio hidrodinámico de Ins-E a 30 mg/ml en DMSO (véase más arriba la figura 3 para la explicación gráfica).

25

FIG. 5: Distribución de radio hidrodinámico de Ins-E a 10 mg/ml en DMSO (véase más arriba la figura 3 para la explicación gráfica).

FIG. 6: Distribución de radio hidrodinámico de Ins-E a 3 mg/ml en DMSO (véase más arriba la figura 3 para la explicación gráfica).

30

FIG. 7: Distribución de radio hidrodinámico de Ins-H<sub>2</sub>O a 10 mg/ml en tampón E (véase más arriba la figura explicación gráfica). FIG. 8: Distribución de radio hidrodinámico de Ins- H<sub>2</sub>O a 10 mg/ml en tampón F (véase más arriba la figura 3 para la explicación gráfica).

### Descripción de las realizaciones ilustrativas

35

[0035] Como detalla anteriormente, las dificultades asociadas a la formulación de la insulina en sus formas monoméricas o diméricas de administración parenteral están bien documentadas. Las soluciones actuales a dichas dificultades también están bien documentadas y han sido aceptadas como práctica estándar en el campo de las formulaciones. Por ejemplo, los análogos de insulina o insulina modificada han sido preparados para reducir su afinidad de unión entre ellos tratando de evitar la formación de hexámeros en los análogos. Estos análogos normalmente se administran en un entorno acuoso, lo que reduce su estabilidad y los hace más propensos a agregarse de manera irreversible una vez producida la agregación. Además, tales análogos son caros y pueden inducir irritaciones o reacciones inmunes en los pacientes.

40

[0036] Si lo comparamos aquí, los inventores han encontrado una solución a los problemas anteriormente mencionados. La solución reside en preparar insulina con una memoria de pH particular, en reconstituir y solubilizar dicha insulina en un disolvente polar aprótico. La formulación resultante, que puede tener poca cantidad de agua o no tener agua, incluye formas monoméricas y diméricas de insulina solubilizada y estabilizada. Además, la mayor solubilidad de la insulina en disolventes polares apróticos da lugar a una formulación de poco volumen que tiene gran cantidad de formas monoméricas y diméricas de insulina., las Cabe destacar que las formulaciones pueden ser utilizadas en ambas, en la insulina modificada y sin modificar. En el caso de la insulina sin modificar, uno puede evitar problemas asociados al uso de moléculas modificadas / análogo de insulina tales como irritación, respuesta inmunogénica, y los costes.

50

### **A. La insulina**

55

[0037] La insulina ayuda al cuerpo a utilizar o almacenar la glucosa en la sangre que obtiene de los alimentos. En las personas con diabetes Tipo 1, el páncreas ya no produce insulina. Aunque las personas con diabetes Tipo 2 producen insulina, la respuesta de sus cuerpos no es eficiente o adecuada, lo que se conoce a menudo como de resistencia a la insulina.

60

[0038] La insulina en sí es una hormona peptídica muy conocida y caracterizada. La forma monomérica de la insulina humana está compuesta de 51 aminoácidos, caracteriza además por dos cadenas de péptidos que se refieren como la cadena A y B, cadenas que están unidas por medio de enlaces disulfuro. En la mayoría de las especies, la cadena A consiste en 21 aminoácidos y la cadena B en 30 aminoácidos. Aunque la secuencia de aminoácidos de la insulina varía entre especies, ciertos segmentos de la molécula están muy conservados. Estas similitudes en la secuencia de aminoácidos de la insulina origina la conformación tridimensional de la insulina muy similar entre especies, pudiendo la insulina de un animal ser biológicamente activa en otras especies. Por ejemplo, la insulina de cerdo ha sido utilizada ampliamente para tratar pacientes humanos. Las formas monoméricas la insulina se pueden asociar entre ellas para formar dímeros. Los dímeros se pueden asociar entre ellos para formar hexámeros, lo cual ocurre normalmente en presencia de zinc.

65

[0039] Tanto de las formas monómera y dímera de insulina se difunden fácilmente en la sangre. Si lo comparamos, los hexámeros se difunden mal en gran medida debido a que su tamaño es significativamente mayor. Como ya se ha dicho anteriormente, ello a ha llevado a la fabricación de insulina modificada o los análogos de insulina (por ejemplo, los comercializan Lispro®, Aspart®, Glulisine®, Detemir®, Degludec®, etc.), y por tanto disponibles el mercado y que se usan en el contexto de la presente invención. Además, la insulina no modificada regular también se encuentra disponible fácilmente en el mercado. (por ejemplo, la comercializan Humulin® R, Humulin® N, Humulin® 70/30, Novolin®, etc.) y también es de uso en el contexto de la presente invención. En ciertos aspectos, la forma no modificada o regular de insulina se puede utilizar en lugar de la forma modificada para reducir los costes alérgicos o inmunogénicos o para reducir los costes de la formulación. La insulina la fabrican actualmente numerosos fabricantes, incluyendo las compañías farmacéuticas y fabricantes de fármacos por contrato. Los fabricantes farmacéuticos incluyen a Eli Lilly y Co., Novo Nordisk y Sanofi. Los fabricantes por contrato incluyen a Sigma-Aldrich, Lonza, y Biocon. La insulina utilizada en los ejemplos de esta memoria descriptiva fue insulina humana recombinante no modificada comprada a la empresa Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO).

## 15 B. Memoria pH

[0040] Los inventores además descubrieron un paso de procesamiento utilizado para estabilizar aún más la insulina solubilizada dentro de la formulación. Este paso incluye mezclar la insulina con un tampón no volátil en una solución acuosa y luego secar la mezcla para obtener insulina seca. Antes del secado, la solución acuosa tiene un ratio de pH entre 1 y 4 ó entre 6 y 8, que es el rango óptimo de pH para la estabilidad de la insulina en un entorno acuoso. Por lo tanto, una vez secada la mezcla, se produce una insulina seca con una "memoria de pH" entre 1 y 4 ó entre 6 y 8, tal que dicha memoria pH se conserva después de solubilizar la insulina seca en el disolvente polar aprótico. En algunos casos particulares cuando se incluye luego pramlintida, la memoria de pH de la insulina puede ser alrededor de 2 y la memoria de pH de pramlintida puede ser alrededor de 2.

[0041] En particular, la "memoria de pH" de la insulina es el perfil de la carga resultante (estado de protonación) después de secar la insulina a partir de una solución acuosa tamponada (por ejemplo de un tampón no volátil). El estado de protonación, y por lo tanto la solubilidad y estabilidad de la insulina en disolventes polares apróticos se ve afectada por el pH de la mezcla de la insulina o solución acuosa antes del secado. Cuando la insulina se seca en una especie de tampón en donde tanto los componentes ácidos y básicos son no volátiles, la memoria de pH de la insulina seca será casi igual al pH de la mezcla acuosa de insulina o solución. Véase, por ejemplo, "Reacciones Enzimáticas en Medio Orgánico", Koskinen, A.M.P., y Klibanov, A. M., eds., Springer (1996). Además, el pH de la solución acuosa tamponada (por ejemplo, tampón no volátil) en donde se seca la insulina se puede optimizar para conseguir una memoria de pH de la insulina resultante de óptima estabilidad, máxima solubilidad y mínima degradación cuando la insulina seca posteriormente se reconstituye en el disolvente polar aprótico. Por lo tanto, cuando la insulina secada se reconstituye dentro de dicho disolvente, la insulina en la formulación reconstituida mantendrá las características de solubilidad y estabilidad de la óptima memoria de pH.

[0042] La memoria de pH de la insulina puede medirse de varias maneras. En un procedimiento, la memoria de pH se mide reconstituyendo la insulina seca dentro de en agua tamponada y se mide el pH de la mezcla de insulina reconstituida o solución con un indicador de pH, tal como papel de pH o un electrodo de pH calibrado. Alternativa mente, la memoria de pH se podrá determinar añadiendo al menos el 20% de agua a la formulación de disolvente aprótico polar de insulina y midiendo el pH de la formulación con un indicador de pH. Véase, por ejemplo, Baughman y Kreevoy, "Determinación de la acidez en 80% Dimetil sulfóxido y 20% de Agua," Diario de Química Física "78 (4): 421-23 (1974)". La medición del pH en una solución de agua de disolvente polar aprótico puede necesitar una pequeña corrección (es decir, no más de 0,2 unidades de pH como por Baughman y Kreevoy, supra).

[0043] En vista de lo anterior, los tampones no volátiles útiles en las formulaciones descritas en el presente documento son aquellos que ayudan al establecimiento de un pH de máxima estabilidad y mínima degradación así como aquellos que ayudan a eliminar la humedad residual o el contenido de agua de la insulina. Los tampones no volátiles incluyen los tampones que no van a desaparecer por evaporación como lo hace el agua tras el secado o liofilización. Los tampones no volátiles adecuados incluyen, por ejemplo, tampones de glicina, tampones citrato, tampones de fosfato y similares. En ciertos casos, el tampón no volátil será un tampón de glicina o un tampón de citrato.

[0044] El secado de la insulina con el tampón no volátil se puede llevar a cabo utilizando técnicas de secado por spray o pulverización, por deshidrocongelación, por liofilización, por centrifugación al vacío, etc. Las técnicas de secado por pulverización son muy conocidas por los expertos ordinarios de la técnica. El secado por pulverización incluye los pasos de atomización de una solución que contiene uno o varios sólidos (por ejemplo, agente terapéutico) a través de una tobera de disco giratorio, u otro dispositivo, seguido por la evaporación de las gotitas del disolvente. La naturaleza del polvo resultante es la función de varias variables, incluyendo la concentración de soluto inicial, el tamaño, la distribución de las gotitas producidas y la velocidad de eliminación de los solutos. Las partículas que se originan pueden comprender agregados de partículas primarias que consisten en cristales y o sólidos amorfos, según la velocidad y condiciones de eliminación del disolvente. Un proceso de secado por pulverización para preparar polvos ultrafinos de fármacos se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. no 6051256. Los procedimientos de deshidrocongelación son muy conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 4608764 y n.º 4848094. Los procesos de secado con técnicas de deshidrocongelación por pulverización se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 5208998. Otras técnicas de secado por pulverización se describen, en las patentes de EE.UU. n.º 6253463.; n.º 6001336; n.º 5260306; y Publicaciones internacionales de PCT n.º WO91/16882 y n.º WO 96/09814.

[0045] Las técnicas de liofilización son muy conocidas por los expertos ordinarios de la técnica. La liofilización es una técnica de deshidratación que tiene lugar mientras un producto está congelado y en vacío (sublimación del hielo bajo un vacío) y se seca con un suave calentamiento. Estas condiciones estabilizan el producto, y minimizan la oxidación y otros procesos de degradación. Las condiciones de secado de congelados permiten ejecutar el proceso a bajas temperaturas, por lo tanto, se pueden preservar productos térmicamente lábiles. Los pasos de la deshidrocongelación incluyen pretratamiento, congelación, secado primario y secado secundario. El pretratamiento incluye cualquier procedimiento que trate el producto antes de la congelación. Esto puede incluir concentrar el producto, revisar la formulación (es decir, añadir componentes para aumentar la estabilidad y o mejorar el procesamiento), disminuir una elevada presión de vapor en el disolvente o aumentar el área de superficie. Los procedimientos de pretratamiento incluyen: concentración por congelación, la concentración en fase de solución, y la formulación específica para preservar la apariencia del producto o para proporcionar lio protección a productos reactivos, los que se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. n.º 6199297. Las condiciones de liofilización "estándar", se describen, por ejemplo, en la Patente EE.UU. n.º 5031336, y en "Deshidrocongelación de productos farmacéuticos" (DeLuca, Patrick P., J. Vac. Sci. Technol., Vol. 14, n.º 1, enero y/ febrero de 1977); y "La liofilización de productos farmacéuticos: Una revisión de literatura" (Williams, N. A., y G. P. Polli, Diario de Ciencia Parenteral y Tecnología, Vol. 38, n.º 2, marzo y abril de 1984).

[0046] En ciertos aspectos, el ciclo de Liofilización se puede realizar parcialmente por encima de la deshidrocongelación de la insulina para inducir un colapso de la masa y que forme una torta densa que contiene humedad residual. En otras realizaciones, el ciclo de Liofilización se lleva a cabo por debajo de la temperatura de transición vítrea de la insulina con el fin de evitar un colapso y para conseguir el secado completo de las partículas de insulina.

### C. Disolvente polar aprótico

[0047] Una vez la insulina seca obtiene el H seleccionado, entonces la insulina seca puede ser reconstituida y solubilizada en un disolvente polar aprótico. Los disolventes polares apróticos incluyen aquellos disolventes que carecen de un hidrógeno ácido. Esta característica es muy útil para mantener la memoria de pH de la insulina seca. Ejemplos de disolventes polares apróticos no limitativos incluyen dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetato de etilo, n-metilpirrolidona (NMP), dimetil acetamida (DMA), carbonato de propileno, y mezclas de los mismos. A cada uno de estos disolventes se les conoce bien y se comercializan en el mercado desde una amplia variedad de fuentes.

[0048] Como se muestra en los ejemplos, la insulina solubilizada origina formas monoméricas y diméricas estables de insulina, lo cual puede originar un producto de insulina de acción rápida o ultra-rápido. Además, como se señaló anteriormente y sin querer estar limitado por la teoría, se cree que la insulina solubilizada es "meta estable" en el disolvente polar aprótico. Se piensa que esta meta estabilidad deriva de la combinación de la memoria de pH y la solubilidad de la insulina en el disolvente polar aprótico.

### D. Ingredientes para reducir la agregación de insulina

[0049] Se podrán añadir a la formulación ingredientes adicionales que disminuyan aún más la probabilidad de agregación de las formas monoméricas y o diméricas de insulina. Estos ingredientes se pueden utilizar para disminuir dicha agregación dentro de la formulación antes de su administración (por ejemplo, durante el almacenamiento) o después de su administración (por ejemplo, después de su administración y antes de su absorción en el torrente sanguíneo del sujeto). Tales ingredientes que se pueden utilizar incluyen urea, cloruro de guanidinio, aminoácidos, azúcares, polioles, polímeros, ácidos, agentes tensoactivos, o mezclas de los mismos. Tales ingredientes están disponibles comercialmente desde una amplia variedad de fuentes.

### E. Contenido de agua de las Formulaciones

[0050] Las formulaciones de la presente invención pueden tener un bajo contenido de humedad o de agua como consecuencia de haber utilizado altas cantidades de los disolventes polares apróticos. Esto puede dar una estabilidad adicional a las formas monoméricas y diméricas de insulina presentes dentro de las formulaciones al disminuir la probabilidad de agregación de dichos monómeros y dímeros. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención puede tener un contenido de humedad o agua del 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,05%, 0,025% , 0,01%, a 0% en peso o en volumen de la formulación. En algunos casos, sin embargo, el agua puede también utilizarse como codisolvente. Ello como ocurre cuando la formulación de la presente invención incluye insulina y pramlintida.

### F. Coformulaciones de insulina Pramlintida

[0051] La amilina, una hormona de células  $\beta$ , que normalmente es cosecretada con insulina en respuesta a la entrada de glucosa, también es completamente deficiente en pacientes con diabetes mellitus Tipo 1. La amilina exhibe varios efectos glucoreguladores que complementan a aquellos de la insulina en la regulación de la glucosa postprandial. La amilina humana nativa no es adecuada para uso clínico o farmacéutico debido a varias propiedades fisicoquímicas que incluyen su pobre solubilidad, la autoagregación, y la formación de fibrillas de amiloide, y placas amiloides.

[0052] La pramlintida es un análogo de la amilina humana desarrollada mediante la sustitución selectiva de prolina por Ala-25, Ser-28, y Ser-29. Ella refiere las propiedades físico químicas subóptimas de la amilina humana, a la vez que preserva el importante comportamiento metabólico. La Pramlintida se comercializa en el mercado estando disponible desde varias fuentes (por ejemplo, Symlin® de Amylin Pharmaceuticals).



[0053] La pramlintida normalmente se administra vía inyecciones subcutáneas separadas, además de la insulina. Esta práctica esta aceptada por algunas subpoblaciones de pacientes. Sin embargo, pero estas inyecciones adicionales suponen una carga significativa para los pacientes que ya son inyectados con insulina varias veces al día. Además puede pasar que algunos pacientes de forma deliberada o por descuido mezclen pramlintida e insulina en la misma jeringa antes de la inyección originando eventos adversos o indeseables.

[0054] Una de las razones para administrar de manera separada la pramlintida y la insulina es que estos fármacos entran en conflicto en sus sistemas de tampones, por lo que la compatibilidad de una formulación mixta resulta difícil. Por ejemplo, muchas insulinas y análogos de insulina tienen un punto isoeléctrico en el rango de 5 a 6 y por lo tanto se formulan a un pH de alrededor de 7. La pramlintida tiene un punto isoeléctrico  $> 10,5$ , es óptimamente estable a un pH bajo, y se formula normalmente a un pH de alrededor de 4. La interacción formulaciones de pramlintida y de insulina a diferentes pH y diferentes capacidades de tamponamiento ocasiona a menudo el precipitado de componentes de insulina solubles o la solubilización de componentes de insulina cristalinos. Los estudio in vitro de formulaciones con pramlintida y de insulina de corta y de larga acción han demostrado que cuando se mezclan cantidades diversas de insulina con cantidades fijas de pramlintida, ello origina una importante variabilidad en la solubilidad de la insulina

[0055] Estos problemas de coformulación los resuelve la presente invención. Por ejemplo, la pramlintida puede secarse en un sistema de tampón tal que tenga una memoria de pH entre 1 y 5, ó 2, 3, ó 4, ó más particularmente alrededor de 2. La insulina puede secarse en el mismo sistema de tampón o por separado tal que tenga una memoria de pH de alrededor de 1 y 4, de 1 y 3, ó alrededor de 2 ó entre 6 y 8 ó alrededor de 7. Las pramlintida e insulina secas pueden entonces reconstituirse y solubilizarse en el mismo disolvente polar aprótico y mantener sus respectivas características de solubilidad y estabilidad dentro de la misma formulación. Como tal, sólo se necesita una única formulación para administrar tanto pramlintida como insulina al sujeto. Dicha coformulación reduciría la resistencia de los sujetos a una terapia que imita más de cerca la respuesta fisiológica natural al aumento postprandial de los niveles de glucosa en la sangre. En algunos casos particulares de la coformulación, la memoria de pH de la insulina puede ser alrededor de 2 y la memoria de pH de pramlintida puede ser alrededor de 2.

[0056] Además de pramlintida, pueden utilizarse otros agonistas de la amilina en el contexto de la presente invención. Tales agonistas pueden recombinarse o purificarse desde una fuente natural. Los agonistas de amilina pueden ser humanos o no humanos. Los agonistas de amilina pueden ser también un análogo de amilina el cual puede estar basado en la secuencia de aminoácido de la amilina humana pero tiene una o más diferencias de aminoácidos, o una amilina químicamente modificada o un análogo de amilina. La dosis de la amilina agonista depende de su biodisponibilidad y del paciente a tratar. La "amilina humana" incluye la hormona peptídica humana secretada por el páncreas, ya sea aislada de una fuente natural, preparada mediante química de péptidos sintéticos o producida mediante microorganismos modificados genéticamente. El "análogo de amilina" es una amilina alterada, diferente de la amilina secretada por el páncreas, pero aun así apta para que el cuerpo realice la misma acción que la amilina natural.

## G. Dosis

[0057] Cualquier dosis adecuada de insulina, pramlintida, o una combinación de ambas puede administrarse utilizando las formulaciones de la presente invención. La dosificación administrada, por supuesto, variará dependiendo de factores conocidos, tales como: las características farmacodinámicas del fármaco en particular, la sal, o combinación de las mismas; la edad, la salud, o el peso del sujeto; la naturaleza y extensión de los síntomas; las características metabólicas del agente terapéutico y del paciente; el tipo de tratamiento concurrente; la frecuencia del tratamiento; o el efecto deseado. En general, la insulina puede estar presente en la formulación en una cantidad que varía desde alrededor de 0,5 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml. En algunas formas de realización, la insulina presente en la formulación es una cantidad que varía desde alrededor de 3 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml, 3 mg/ml a alrededor de 10 mg/ml, 10 mg/ml a alrededor de 50 mg/ml, o desde alrededor de 50 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml. En ciertos aspectos, la cantidad de insulina en los rangos de formulación varía desde alrededor de 3 mg/ml a alrededor de 10 mg/ml, lo que puede ocasionar que una parte significativa de la insulina sea de forma monomérica (véanse los datos en los ejemplos). En otros casos, la cantidad de insulina en la formulación varía de alrededor de 10 mg/ml a alrededor de 50 mg/ml lo cual puede ocasionar que la mayor parte de la insulina sea de forma dimérica (véanse los datos en los ejemplos). En algunas realizaciones, la pramlintida está presente en la formulación en una cantidad que oscila de 0,1 a 10 mg/ml, o 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 mg/ml o según sea necesario. Una vez más, será fácilmente evidente para los expertos que la dosis del fármaco puede variarse dependiendo del fármaco utilizado y enfermedad y del trastorno o afección a tratar y que la concentración del fármaco en la formulación variará dependiendo de la solubilidad del medicamento, la dosis y la forma de administración.

## H. Ingredientes adicionales, excipientes farmacéuticos

[0058] Las formulaciones de la presente invención pueden incluir ingredientes adicionales, excipientes farmacéuticos que desarrollan aun más una fórmula para conseguir una propiedad táctil y un rango de viscosidad deseados o para proteger aún más la insulina o la pramlintida. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir además uno cualquiera de, cualquier combinación de, o la totalidad de un antioxidante (ejemplos no limitativos del mismo incluyen ácido ascórbico, cisteína, metionina, monotioglicerol, tiosulfato de sodio, sulfitos, BHT, BHA, palmitato de ascorbilo, galato de propilo, o vitamina E o cualquier combinación de los mismos); un agente quelante (ejemplos no limitativos de el incluyen EDTA, EGTA, ácido tartárico y sales de los mismos, glicerina, y ácido cítrico y sales de los mismos); y o un conservante (ejemplos no limitativos del mismo incluyen alcoholes alquilos, alcoholes bencílicos, parabenos de metilo, propil parabenos y mezclas de los mismos). Además, las formulaciones de la presente invención también pueden incluir un disolvente aprótico no acuoso

(ejemplos no limitativos de los mismos incluyen polietilenglicol (PEG), propilenglicol (PG), polivinilpirrolidona (PVP), metoxipro propilenglicol (MPEG), glicerol, glicofurool, y mezclas de los mismos).

**5 I. Kits / Contenedores**

[0059] Se contempla también que se utilicen kits en ciertos aspectos de la presente invención. Por ejemplo, una formulación de la presente invención puede estar incluida dentro de un kit. Un kit puede incluir un recipiente. En un aspecto, por ejemplo, la formulación puede estar comprendida dentro de un recipiente el cual que está listo para administrarlo por vía parenteral a un sujeto sin tener que reconstituir o diluir la formulación. Es decir, la formulación que va a ser administrada puede almacenarse en el contenedor y estar preparada para ser utilizada cuando se necesite. El recipiente de almacenamiento puede ser una jeringa, un dispositivo de inyección de bolígrafo, un dispositivo de autoinyector o una bomba. Los dispositivos adecuados de autoinyectores y de bolígrafo incluyen, pero no se limitan a, aquellos dispositivos de bolígrafo y autoinyección fabricados por Becton Dickenson, Swedish Healthcare Limited (SHL Group), Ypsomed Ag, y otros similares. Los dispositivos de bombeo adecuados incluyen, aunque no se limitan a aquellos dispositivos de bomba fabricadas por Tandem Diabetes Care, Inc., Delsys farmacéuticos y similares.

[0060] De manera alternativa, un kit de la presente invención puede incluir varios contenedores o múltiples compartimentos dentro de un contenedor. Cada contenedor o los múltiples compartimentos pueden utilizarse para almacenar por separado por ejemplo, el disolvente biocompatible no acuoso y el fármaco de molécula pequeña. Luego, cuando se necesite, se pueden mezclar juntos el disolvente y el fármaco y administrarse inmediatamente o almacenarlos para más tarde, según se necesite.

**25 J. Procedimiento para preparar la formulación**

[0061] Las formulaciones de la presente invención se pueden preparar utilizando los siguientes pasos. Estos pasos se utilizaron para preparar las formulaciones en los ejemplos de la memoria descriptiva.

1. La insulina acuosa se prepara disolviendo polvo de insulina (por ejemplo, insulina humana recombinante, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) en el tampón acuoso deseado (que comprende clases específicas de tampón, concentración y pH; por ejemplo, citrato, pH 2,0) a una concentración de insulina de 10 mg/ml.
2. La pramlintida (por ejemplo, AmbioPharm, Inc., Beech Island, Carolina del Sur y CS Bio, Inc., Menlo Park, CA, que reutiliza en los ejemplos de la memoria descriptiva) se puede preparar de manera similar, salvo que la pramlintida se puede disolver en un tampón acuoso a una concentración de 2 mg/ml.
- 3a. La solución de insulina o pramlintida se dispensa en viales transparentes de HPLC o de Liofilización y se liofilizan según el siguiente ciclo de liofilización en la Tabla 1 o similar.

**Tabla 1**

Paso	Condición de Temperatura	Velocidad/Duración	Vacío (m Torr)
Estante de carga	5 °C	1 hora	N/A
Congelación	-50°C	1°C por minuto	N/A
Remojo helado	-50°C	2 horas	N/A
Rampa de Templado	-15 °C	1 °C por minuto	N/A
Templado térmico	-15 °C	1 hora	N/A
Primer Secado	-15 °C	24 horas	100
Rampa al Secundario	25 °C	1 °C por minuto	100
Secado Secundario	25 °C	8 horas	100
Tapado	25 °C		100

3b. De manera alternativa, la solución acuosa de insulina o pramlintida se dispensa en tubos microcentrífugos y se seca por centrifugación al vacío y un calentamiento suave (25-30 ° C).

4. El polvo de insulina seca o de pramlintida a una memoria de pH seleccionada se disuelve en DMSO mediante suave pipeteo en la concentración deseada o la concentración permitida por el sistema particular de tampón y pH.

5. Las soluciones resultantes se evalúan visualmente por su claridad y o se analizan de pequeñas dispersiones por espectroscopía visible a 630 nM, y se utilizan en diversas aplicaciones posteriores.

**45 EJEMPLOS**

[0062] La presente invención se describirá con mayor detalle por medio de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Los expertos en la técnica

reconocerán fácilmente varios parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para conseguir esencialmente los mismos resultados.

### EJEMPLO 1

5

[0063] Este ejemplo proporciona información de cómo preparar formulaciones de insulina DMSO, en donde la insulina tiene una memoria de pH alrededor de 2. También se realizaron y utilizaron formulaciones comparativas de insulina H<sub>2</sub>O con el Espectroscópico de alta definición de infrarrojos Fourier Transform Infrared (FTIR) y el análisis de dispersión de la luz dinámica "Dynamic Light Scattering" (DLS) (se discute más adelante en los ejemplos 2 y 3, respectivamente). Téngase en cuenta que la insulina utilizada en los ejemplos de esta memoria descriptiva fue insulina humana recombinante no modificada comprada a la empresa Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO).

10

15

20

[0064] **La insulina de tampón A de DMSO:** La insulina humana recombinante (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) se disolvió a una concentración de 10 mg/ml en un tampón A (es decir, 10mM de citrato + 1 mM EDTA, pH 2,0), se dispensó en viales de HPLC en 0,25 ml alícuotas y se liofilizó de acuerdo al procedimiento descrito mas arriba en los pasos 1 a 5 en la sección del "Procedimiento para preparar la formulación". La insulina liofilizada en cada vial tenía una memoria de pH de 2,0 y se reconstituyó con 100 µl de DMSO a una concentración de 25 mg/ml ( la insulina se solubilizó en DMSO para inspección visual ). Después las partes alícuotas de este stock se diluyeron mas con tampón A para crear las soluciones de insulina DMSO H<sub>2</sub>O tamponadas de citrato deseadas (por ejemplo, 12,5 y 5 mg/ml de insulina en DMSO y tampón A). Estas formulaciones se denominan "Ins-A/DMSO" o diluciones indicadas de ellas.

25

[0065] La insulina de tampón A de H<sub>2</sub>O : La insulina se disolvió a una concentración de 10 mg/ml en agua destilada, desionizada y liofilizada en 0,25 ml alícuotas. La fuente de insulina y los procedimientos de liofilización fueron los mismos que los descritos mas arriba. Los viales se reconstituyeron con 250 µl en tampón A (es decir, H<sub>2</sub>O + 10 mM de citrato + EDTA 1 mM, pH 2,0), que produjeron una solución de insulina en tampón A a 10 mg/ml. Las alícuotas de este stock se diluyeron adicionalmente con tampón A para crear las soluciones de insulina tampón A como se desee (por ejemplo, 5 mg/ml de insulina en tampón A). La insulina se solubilizó en tampón A para inspección visual. Estas formulaciones se denominan "Ins-A de H<sub>2</sub>O."

30

35

[0066] La insulina de tampón E de DMSO: La insulina se disolvió a una concentración de 10 mg/ml en tampón E (es decir, H<sub>2</sub>O + 10 mM citrato + EDTA 1mM + 10mM NaCl 10, pH 2,0) y liofilizada en partes alícuotas de 0,5 ml. La fuente de la insulina y los procedimientos Liofilización fueron los mismos que los descritos anteriormente. La insulina liofilizada en cada vial tenía una memoria pH de 2,0, y se reconstituyó con 100 FLL de DMSO a una concentración de 50 mg/ml. La insulina se solubilizó en DMSO para inspección visual. Las partes alícuotas de este stock se diluyeron adicionalmente con DMSO para crear soluciones de insulina DMSO como se desee (por ejemplo, 30, 25, 10, 5 y 3 mg/ml de insulina en DMSO). Estas formulaciones se denominan "Ins-E/DMSO."

40

45

[0067] La insulina de tampón E y F de H<sub>2</sub>O: La insulina se disolvió a una concentración de 10 mg/ml en agua destilada, desionizada, y liofilizada en partes alícuotas de 0,5 ml. La fuente de la insulina y los procedimientos de liofilización fueron los mismos que los descritos arriba. Se reconstituyó un vial con 500 µl de tampón E, que produjo una insulina en solución de tampón E a 10 mg/ml. El otro vial se reconstituyó con 500 µl de tampón F (es decir, H<sub>2</sub>O + 10 mM de fosfato citrato + 1 mM EDTA + 10 mM NaCl, pH de 7,0), que produjo una solución de insulina en tampón F a 10 mg/ml. La insulina se solubilizó en ambas soluciones de tampón E y F para su inspección visual. Estas muestras se conocen como "Ins-E/H<sub>2</sub>O" e "Ins-F/H<sub>2</sub>O", respectivamente.

### EJEMPLO 2

50

[0068] Este ejemplo proporciona datos de FTIR que muestran los efectos de DMSO en la conformación de insulina. La compañía BioTools Inc. (Júpiter, Florida, EE.UU.) realizó el análisis FTIR y proporcionó los datos correspondientes (véase más adelante).

55

[0069] **Materiales y Procedimientos para el Análisis FTIR:** Para el análisis FTIR se prepararon las siguientes formulaciones:

Fórmula 1 (F1): Ins-A/DMSO diluida con 1 parte de tampón A a 12,5 mg/ml.

Fórmula 2 (F2): Ins-A/H<sub>2</sub>O diluida a 5 mg/ml con tampón A.

Fórmula 3 (F3): Ins-A/H<sub>2</sub>O reconstituida a 10 mg/ml con tampón A

Fórmula 4 (F4): Ins-A/DMSO a 25 mg/ml.

60

Fórmula 5 (F5): Ins-A/DMSO diluida con 4 partes de tampón A a 5 mg/ml.

65

[0070] Los espectros electromagnéticos de FTIR se recogieron en el espectrómetro PROTA FTIR (BioTools, Inc.) equipado con un detector de DTGS a 4 cm<sup>-1</sup> de resolución, con un tiempo de recogida de 20 minutos para cada muestra y tampón. Las muestras se disolvieron como se ha descrito, y se colocaron en 6 µm BioCell con ventanas CaF<sub>2</sub> para muestras de base de agua y 75 micras para muestras basadas en DMSO. Todo el análisis espectral (sustracción de tampón y elucidación de la estructura) se llevaron a cabo utilizando el paquete de software PROTA.

[0071] **Resultados:** La FIG. 1 muestra el espectro FTIR en la región de amida 1 de conformación sensible. Estos datos confirman que la insulina no se desdobra de forma irreversible en DMSO, pues el perfil de la insulina sigue siendo relativamente constante en las fórmulas 1 a 5 que fueron probadas. Cabe destacar que la fórmula 3 muestra el espectro de insulina típico indicativo de una proteína mixta  $\alpha$ -hélice, de forma laminar  $\beta$ . La fórmula 4 muestra un desplazamiento a una frecuencia más alta al tiempo que conserva su perfil. Esto puede ser el resultado de un cambio conformacional o el carácter mas fuerte del enlace de hidrógeno del disolvente DMSO. La fórmula 5 es esencialmente idéntica al espectro acuoso de insulina. Estos datos de la Fig.1 confirman que la insulina no se desdobra de forma irreversible en DMSO.

### EJEMPLO 3

[0072] Este ejemplo proporciona un análisis DLS que confirma el estado de asociación de la insulina (es decir, en forma monomérica, forma dimérica, forma hexamérica) en DMSO comparadas a las muestras de control. Los laboratorios 'Protein Laboratories Alianza' (Thousand Oaks, California, EE.UU.) realizaron el análisis DLS proporcionando los datos correspondientes (véase más adelante). Tenga en cuenta que sistemas de tampón E y tampón F se utilizaron debido a la presencia de NaCl, lo cual es necesario para realizar la valoración DLS.

[0073] **Materiales y Procedimientos para el Análisis DLS:** Para el análisis DLS se prepararon las formulaciones siguientes:

Fórmula 6 (F6): Ins-E/DMSO a 50 mg/ml.  
 Fórmula 7 (F7): Ins-E/DMSO a 30 mg/ml.  
 Fórmula 8 (F8): Ins-E/DMSO a 10 mg/ml.  
 Fórmula 9 (F9): Ins-E/DMSO a 3 mg/ml.  
 Fórmula 10 (F10): Ins-E/H<sub>2</sub>O a 10 mg/ml.  
 Fórmula 11 (F11): Ins-F/H<sub>2</sub>O a 10 mg/ml.

[0074] En DLS (también conocido como dispersión cuasielástica de luz o espectroscopia de correlación de fotones) se mide las fluctuaciones dependientes del tiempo en la dispersión de la luz. Estas fluctuaciones están relacionadas con el movimiento Browniano de las moléculas, y por lo tanto se puede utilizar para determinar el coeficiente de difusión. Generalmente se hace la conversión de este coeficiente de difusión a radios hidrodinámicos (Stokes)  $R_h$  a través de la relación de Stokes-Einstein:

$$R_h = k_B T / 6 \pi \eta D$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta,  $\eta$  es la viscosidad del disolvente, y  $D$  el coeficiente de difusión.

[0075] Los datos se recogieron a una temperatura regulada de 25 °C utilizando un instrumento DynaPro MS/X Solución de Proteínas (ahora Wyatt Technology) utilizando 12  $\mu$  de células de dispersión de cuarzo. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos en un microcentrifugador (modelo Fisher 235 A) para eliminar el polvo y las partículas grandes antes de la carga en la cubeta de análisis. Normalmente se registraron y promediaron acumulaciones de datos de 25 décimas de segundo para mejorar la relación señal ruido. Los datos resultantes se analizaron con el software *Dynamics* de versión 6.12.0.3 proporcionado por el fabricante. Los tamaños de Media (promedio  $z$ ) se basaron en el procedimiento *Cumulant*. Las distribuciones de tamaños se calcularon utilizando el procedimiento de análisis *Dynals*. Se estimaron fracciones de peso utilizando el modelo de esferas *Raleigh*. La calibración del instrumento es absoluta, basada en unidades de tiempo y distancia (con la distancia medida por la longitud de onda de la fuente de luz). Sin embargo, la calibración del instrumento se confirma cada año utilizando esferas calibradas de látex de tamaño estándar (diámetro  $21 \pm 1,5$  nm, producto 3020A lote 35266 de *Thermo Scientific*). El índice de viscosidad del DMSO asignado fue 1.991 cp y 1,4768.

[0076] **Resultados generales:** El estado de agregación de la insulina en DMSO fue examinado mediante dispersión dinámica de luz (DLS). La insulina monomérica tiene un MW verdadero alrededor de 6 kDa. En consecuencia, la insulina dimérica tendría un MW verdadero de 12 kDa y la insulina hexamérica de 36 kDa. La FIG. 2 resume el peso molecular aparente (MW) de la insulina medida en el preparado DMSO y las soluciones acuosas (es decir, las fórmulas 6 a 10). El MW aparente de la insulina en una formulación acuosa a pH 7,0 y concentración de 10 mg/ml (fórmula 10) es 53 kDa. A esta alta concentración, la solución es probablemente no ideal, con efectos intermoleculares resultantes en un MW aparente que es mayor que el MW verdadero. En cualquier caso, la medida MW aparente es indicativa de que la insulina se encuentra en un estado hexamérico.

[0077] Con respecto a las formulaciones de insulina DMSO, a 10 mg/ml (fórmula 7), el peso molecular aparente es 6 kDa, que es alrededor de un tercio del MW de insulina acuosa a 10 mg/ml (fórmula 10), lo que indica que la insulina en DMSO se asocia como un dímero a esta concentración. Además ello parece ser el caso también para concentraciones de hasta 50 mg/ml (fórmulas 8 a 9), ya que la aproximadamente diferencia lineal de MW aparente que se observa al aumentar la concentración es probablemente un artefacto de un efecto de volumen típico excluido para esta técnica. Sin embargo, la reducción en MW aparente de 13 kDa en 3 mg/ml (fórmula 6) se desvía de esta tendencia, e indica que a esta concentración existe la disociación reversible a monómero.

[0078] Estos estudios DLS sugieren que sobre el rango de concentraciones de aplicación pertinentes, el estado más grande de multímeros de INS-2E en DMSO es un dímero, y que en el extremo inferior del rango de concentración existe un

equilibrio monómero-dímero. Estos resultados contrastan con las formulaciones acuosas de insulina, donde predomina el hexámero, incluso en ausencia de zinc y el monómero es inestable y de rápida fibrilación. Basándonos en los modelos cinéticos actuales de asociación y absorción de la insulina, se espera que una formulación de insulina desprovista de insulina hexamérica originará una cinética de absorción más rápida que aquellas formulaciones de insulinas actuales de acción rápida (por ejemplo, Lispro®, Aspart®, ETG.), que todavía contienen cantidades significativas de insulina hexamérica. Tomados en su conjunto, estos estudios físico químicos muestran que el enfoque que utiliza un disolvente no acuoso para desarrollar una formulación de insulina de acción ultra-rápida tendrá probablemente más éxito que el enfoque con solución acuosa. En la solución acuosa, que incluye formulaciones de acción rápida, la insulina monomérica es inestable predominando la forma hexamérica, mientras que en DMSO, la más rápida absorción de insulina de monómero y dímero se la prefiere termodinámicamente, incluso a concentraciones relativamente altas. Además, estos datos (incluyendo los datos DLS y FTIR) muestran que cualquier cambio conformacional que aparece inducido por DMSO es reversible tras la reconstitución en un medio acuoso.

[0079] **Resultados Específicos de la Fórmula 6 ( Ins-E/DMSO a 50 mg/ml )**: La distribución de tamaños (histograma de la intensidad de dispersión vs. radio hidrodinámico) para Ins-E a 50 mg/ml en DMSO se muestra en la Fig. 3. El pico principal (en peso) es el primer pico, el cual tiene un radio medio de 2,12 nm y representa el 34,7% de la intensidad de dispersión total. Ese radio corresponde a una masa molar de alrededor de 20 kDa, basado en los estándares de proteínas globulares acuosas. Además del pico principal se detectan tres picos a radios mayores, en los radios medios de 110 nm, 2,29  $\mu$ m y 9,85  $\mu$ m. Aunque estos otros 3 picos contribuyen a alrededor de 2/3 de la intensidad de dispersión total, representan en realidad una fracción muy pequeña sobre el porcentaje en base de peso, según lo estimado en la tabla 2 mostrada a continuación. Lamentablemente no es posible hacer fracción significativa de estimaciones en peso para las especies más grandes de 1  $\mu$ m debido a que (1) la dispersión de dichas grandes partículas depende mucho del detalle de la forma de la partícula (debido a las reflexiones internas) y (2) casi toda la luz dispersada se emite en sentido directo, con sólo una pequeña fracción en el ángulo de 90° observado aquí. Algunas o todas estas otras especies podrían ser debidas a contaminantes o componentes de tampón disueltos de forma incompleta en lugar de agregados de insulina.

Tabla 2\*

Resumen para Ins-E a 50 mg/ml en DMSO				
Pico n.º	radio medio (nm)	masa molar estimada	Fracción de Intensidad	Fracción en peso (%)
1	2,12	20 kDa	34,7	99,970
2	110	200 MDa	54,5	0,030
3	2,290	250 GDa	5,6	**
4	9,850	7,4 TDa	5,2	**

\*Z-radio medio 24,5 nm; intensidad media 182 kcnt/s.  
 \*\*La fracción de peso para las especies de este tamaño no se puede estimar de forma fiable por lo que este pico se excluye de este cálculo.

[0080] **Resultados específicos de la Fórmula 7 (Ins-E/DMSO a 30 mg/ml )**: La distribución de tamaños obtenida para INS-E a 30 mg/ml en DMSO se muestra en la Fig. 4. A esta concentración el pico principal se ha desplazado a un radio ligeramente menor de 2,02 nm (masa estimada de 17 kDa). Cabe destacar que las especies a 2,29 y 9,85  $\mu$ m ya no se detectan, lo cual sugiere en forma contundente que aquellos eran componentes de tampón que se han disuelto ahora. La relativa intensidad de las especies cerca de 100 nm también se ha reducido sustancialmente. A esta concentración se detectó una nueva especie a 17,7 nm. Dado que estas especies representan sólo el 1,9% del total de luz dispersada, es posible que esta especie estuviera presente al mismo nivel en la muestra a 50 mg/ml, sin embargo no se detectó porque se perdió en el resplandor (la fuerte dispersión de la especie a 100 nm y mayor). El dato en bruto de DLS (la función de autocorrelación) tiene un rango dinámico limitado, y eso significa que las especies que representan menos de alrededor del 1% de la luz dispersada total caen a menudo por debajo del umbral de detección. Un resumen de estos datos se proporciona en la Tabla 3 para la fórmula 7.

Tabla 3\*

Resumen para Ins-E a 30 mg/ml en DMSO				
Pico n.º	radio medio (nm)	masa molar estimada	Fracción de Intensidad	Fracción en peso (%)
1	2,02	17 kDa	76,7	99,9932
2	17,7	2,8 MDa	1,9	0,0037
3	102	170 MDa	21,4	0,0031

\*Z-radio medio 2,12 nm; intensidad media 77,9 kcnt/s.

[0081] **Resultados específicos de la fórmula 8 ( Ins-E a 10 mg/ml en DMSO):** La distribución de tamaño a 10 mg/ml en DMSO se muestra en la Fig. 5. La dilución ha desplazado aún más el pico principal hacia abajo a 1,94 nm (masa estimada de 16 kDa). En esta concentración no se detectó el pico a 17,7 nm, y la intensidad relativa de la especie cerca de 100 nm se ha reducido más. También estuvo presente un rastro de partículas grandes a 5,45  $\mu\text{m}$  (pero a veces la eliminación de dichas especies por la centrifugación no es completa). La Tabla 4 presenta un resumen de los datos de la fórmula 8:

Tabla 4 \*

Resumen para Ins-E a 10 mg/ml en DMSO				
Pico n.º	radio medio (nm)	masa molar estimada	Fracción de Intensidad	Fracción en peso (%)
1	1,94	16 kDa	87,1	99,9975
2	115	220 kDa	12,2	0,0025
3	5450	1,9 TDa	0,7	**

\*Z-radio medio 1,07 nm; intensidad media 43,1 kcnt/s.  
 \*\*La fracción de peso para las especies de este tamaño no se puede estimar de forma fiable por lo que este pico se excluye de este cálculo.

[0082] **Resultados Específicos de la Fórmula 9 (Ins-E/DMSO a 3 mg/ml):** La distribución de tamaños a 3 mg/ml en DMSO se muestra en la Fig. 6. A esta concentración el pico principal cae a 1,79 nm (masa estimada 13 kDa ). A esta concentración se detectó un nuevo pico a 6,34 nm, el cual puede representar una pequeña cantidad de agregados de insulina (tal vez generada por la Liofilización). El pico visto en esta muestra a 60,8 nm es probablemente el mismo material medido como 100 a 110 nm en concentraciones más altas; el aparente desplazamiento podría deberse bien a la menor relación señal de ruido en esta concentración, o puede ser una consecuencia de resolver el nuevo pico a 6,34 nm. La Tabla 5 proporciona un resumen de los datos para la Fórmula 9.

Tabla 5 \*

Resumen para Ins-E a 3 mg/ml en DMSO				
Pico n.º	radio medio (nm)	masa molar estimada	Fracción de Intensidad	Fracción en peso (%)
1	1,79	13 kDa	84,7	99,9393
2	6,34	250 kDa	2,2	0,060
3	60,8	50 MDa	13,1	0,0009

\*Z-radio medio 0,24 nm; intensidad media 31,4 kcnt/s.

[0083] **Resultados Específicos de la Fórmula 10 (Ins-E/ H<sub>2</sub>O ):** La distribución del tamaño de Ins-H<sub>2</sub>O en serón tampón E (pH 2,0) se muestra en la Fig.7. El pico principal ocurre a un radio de 3,08 nm. Dicho radio corresponde a una masa estimada de 47 kDa, lo que sugiere que la muestra está todavía en forma predominantemente hexámera (o más) a este bajo pH. Téngase en cuenta que a una concentración de 10 mg/ml los efectos no ideales de la solución los de "hacinamiento molecular" pueden estar causando cierta distorsión en el tamaño, pero el que la distorsión sea ascendente o descendente depende de si dominan los efectos electrostáticos o de volumen excluidos. También se detectaron trazas de especies más grandes a 27 nm y 165 nm, pero no está claro si estos representan agregados de insulina o partículas contaminantes. La tabla 6 presenta un resumen de los datos para la Fórmula 10.

Tabla 6 \*

Resumen para Ins-E H <sub>2</sub> O a 10 mg/ml en tampón E				
Pico n.º	radio medio (nm)	masa molar estimada	Fracción de Intensidad	Fracción en peso (%)
1	3,08	47 kDa	67,5	99.894
2	27,0	7,5 MDa	20,5	0,053
3	165	520 MDa	12,0	0.053

\*Z-radio medio 4,06 nm; intensidad media 375 kcnt/s.

[0084] **Resultados Específicos de la Fórmula 10 (Ins-E/ H<sub>2</sub>O )**: La distribución del tamaño de Ins-H<sub>2</sub>O en tampón F (pH 2,0) se muestra en la Fig. 8. El pico principal ocurre a un radio de 3,26 nm. Dicho radio corresponde a una masa estimada 53 kDa. De nuevo aquí a 10 mg/ml los efectos no ideales de la solución ("hacinamiento molecular") pueden estar causando cierta distorsión en el tamaño, pero la carga más baja a pH neutral, significa probablemente que domina el volumen excluido y por lo tanto el tamaño aparente sería un poco más grande que el tamaño verdadero. También se detectaron trazas de especies mayores a 35 nm y 238 nm. La Tabla 7 presenta un resumen de los datos para la Fórmula 11.

Tabla 7 \*

Resumen para Ins-E H <sub>2</sub> O a 10 mg/ml en tampón F				
Pico n.º	radio medio (nm)	masa molar estimada	Fracción de Intensidad	Fracción en peso (%)
1	3,26	53 kDa	77,2	99,9688
2	35,0	14 MDa	18,2	0,023
3	238	1,2 GDa	4,6	0,0078
*Z-radio medio 3,80 nm; intensidad media 447 kcnt/s.				

#### 15 EJEMPLO 4

[0085] Este ejemplo aporta datos relativos a la pramlintida y las coformulaciones insulina y pramlintida en el contexto de las formulaciones de la presente invención.

20 [0086] **La solubilidad de la pramlintida en DMSO y los Codisolventes DMSO Agua**: Se prepararon soluciones de pramlintida a una concentración de 2 mg/ml en 10 mM de pH 2,0, o 10 mM de citrato, pH 4,0; cada una con o sin 2 mg/ml de trehalosa. Las soluciones se secaron por centrifugación al vacío durante cerca de 3,5 horas a 25-30 °C, o como se ha descrito anteriormente se liofilizaron.

25 [0087] La pramlintida secada en tampón citrato con una memoria de pH de 2,0 (con y sin trehalosa) se disuelve completamente en DMSO durante varios minutos con pipeteo suave intermitente a 20 mg/ml (la concentración más alta probada). La solución resultante fue una pasta líquida clara completamente según inspección visual.

30 [0088] La pramlintida secada en tampón citrato con una memoria de pH de 4,0 fue algo resistente a la reconstitución a la concentración de inicio de 2 mg/ml en DMSO puro, y fue efectivamente insoluble en agua. La adición de agua entre un 6% y 10% a la pramlintida en DMSO a concentraciones de pramlintida nominales entre 2 y 5 mg/ml produjo la mejora o casi completa solubilidad del péptido según la medición realizada en base a una inspección visual.

35 [0089] Las Coformulaciones de insulina y pramlintida: Se preparó una coformulación de la insulina y pramlintida como sigue: Se disolvió insulina humana recombinante a una concentración de 10 mg/ml en 10 mM de citrato en tampón de EDTA de 1,0 mM, a pH 2. La pramlintida se disolvió a una concentración de 2 mg/ml en 10 mM citrato, a pH 2,0, con o sin 2 mg/ml de trehalosa. Las soluciones se secaron por centrifugación al vacío en partes alícuotas de 0,5 ml como se describe anteriormente. La insulina se reconstituyó con 50 µm de DMSO a una concentración de 100 mg/ml, y se la pramlintida reconstituyó con 50 µm de DMSO a una concentración de 20 mg/ml. Se mezclaron volúmenes iguales de las soluciones de péptido DMSO para obtener una solución combinada de 50 mg/ml de insulina y 10 mg/ml de pramlintida, con o sin 10 mg/ml de trehalosa. Las soluciones fueron en pasta fluida y completamente claras en la inspección visual. El ratio 5:1 (w/w) de insulina:pramlintida representa un posible ratio de dosificación terapéutica, y los péptidos se mantuvieron de forma estable en una única solución altamente concentrada durante más de 6 horas de observación visual. Con la tecnología preexistente de formulación, estos péptidos requieren sistemas de tampón separados e incompatibles, que a su vez requieren se administren vía inyecciones separadas en sitios del cuerpo separados, lo cual es una barrera importante para la aplicación del presente tratamiento beneficioso.

#### 50 EJEMPLO 5

[0090] Este es un ejemplo profético para determinar la bioactividad y las habilidades farmacológicas y farmacocinéticas de las formulaciones de la presente invención cuando se comparan con productos existentes de insulina de acción rápida (por ejemplo, Aspart®, Glulisine®, Lispra®).

55 [0091] **La bioactividad**: La acción de la insulina a nivel celular implica la fijación al receptor de insulina (RI), la autofosforilación del receptor, fosforilación mediada RI de los sustratos del receptor de insulina, y la posterior activación de la cascada Akt cinasa PI3. La fijación al receptor se determina, en parte, por el estado de asociación de la molécula de insulina, y por lo tanto puede ser una medida no sólo de la bioactividad general de una formulación de insulina, sino también del estado multimérico o monomérico del péptido. La bioactividad de las formulaciones de la presente invención

5 puede medirse y compararse por su habilidad para inducir la fosforilación de RI en fibroblastos de embrión de ratón que sobre expresan la isoforma RI-B (la versión principal que se encuentra en los tejidos sensibles a la insulina), utilizando un kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de la empresa *Fram R & D Systems*. Como la fijación del RI por sí sola no necesariamente predice la señalización aguas abajo más proximal a la respuesta biológica máxima, tal como la regulación de la glucosa, la captación de ácidos grasos y la lipólisis, las células lisadas se pueden cuantificar de manera similar por Akt fosforilado ( véanse Marks, AG., et al. (2011), "Distribución del plasma y las actividades de señalización de los precursores IGF-II. *Endocrinología*" 152: 922-930; Denley, A, et al. (2007), "Activación diferencial de los sustratos del receptor de insulina (RIS):1 y 2 mediante receptores de insulina activados IGF" *Mol. Célula. Biol.* 27: de 3569 a 3577; y Denley, A., et al. (2006), "Activación diferencial de las isoformas del receptor de insulina mediante factores de crecimiento como la insulina que está determinada por el dominio C ", *Endocrinología*, 147: de 1029 a 1036, todos los cuales se incorporan por referencia ).

10 [0092] **Farmacología:** Los estudios de farmacología se pueden realizar utilizando un modelo de cerdo consciente infundido de octreotide con un puerto de acceso vascular de implante subcutáneo (VAP). El modelo de cerdo consciente Yorkshire no diabético puede ser utilizado basándose en: (a) la fisiología de carbohidratos similar a los seres humanos, (b) las venas grandes adecuadas para colocar el catéter IV, (c) el modelo consciente evita complicaciones de anestesia prolongada (atelectasia, neumonía, dificultad de intubación y extubación) y (d) puede utilizarse un cerdo para estudios múltiples. El estudio puede diseñarse para probar formulaciones de la presente invención que tengan una dosis de insulina aceptable (por ejemplo, 0,2 mg/kg) en tiempos de 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, y 240 minutos.

15 [0093] **Farmacocinética:** Las muestras de sangre pueden ser objeto de ensayo utilizando un ensayo previo validado para la insulina nativa y analógico de insulina en suero de cerdo a OHSU (véase Mercodia Iso-insulina ELISA, n.º de producto 10-1128-01, fabricado por Mercodia AB Uppsala, Suecia). Los niveles sanguíneos de insulina humana (por ejemplo, formulaciones de la presente invención y una formulación acuosa comparativa) así como los análogos de insulina se pueden cuantificar durante el transcurso de un tiempo indicado y compararse para el área bajo la curva, Cmax, Tmax, temprano ½ Tmáx y tardío ½ Tmáx. Los parámetros primarios pueden ser los valores temprano y tardío ½ Tmax, que son sustancialmente más sensibles a los cambios en PK que Tmax. El Tmáx ocurre a menudo en una larga meseta, que puede ser difícil de medir y dar lugar a resultados engañosos, mientras que los valores tempranos y tardíos aumentan y caen rápidamente por lo tanto resultan mucho más fiables.

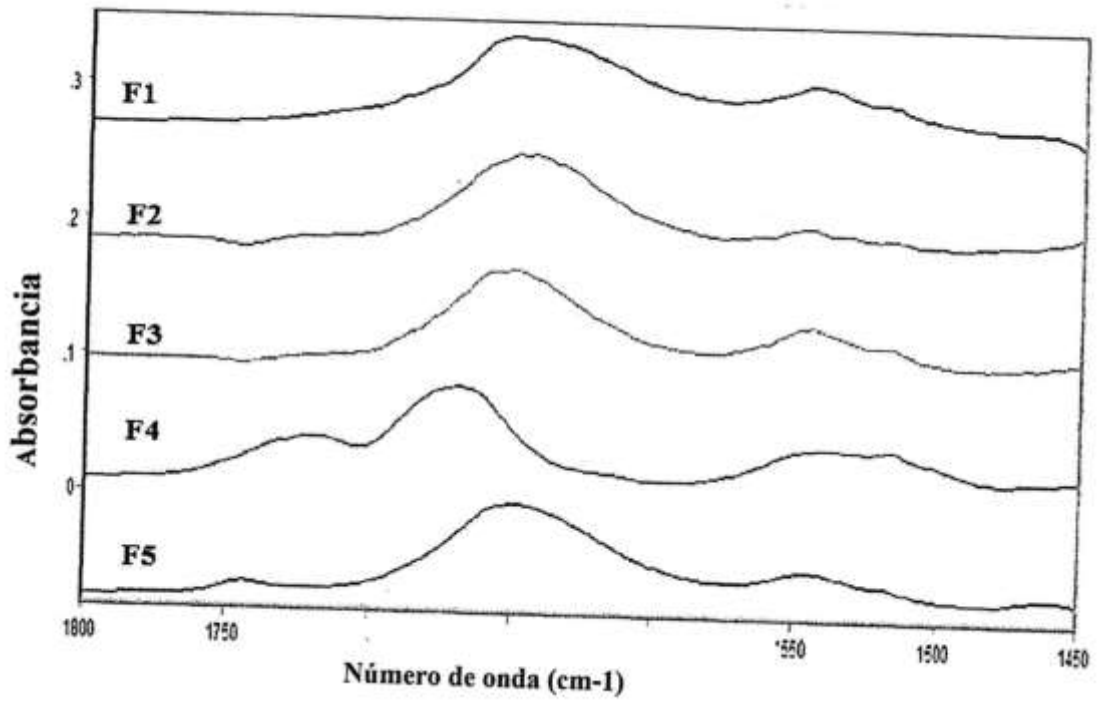


**REIVINDICACIONES**

- 1.- Una formulación para administración por vía parenteral que comprende:
- 5 (a) insulina que comprende una memoria de pH entre 1 y 4 ó entre 6 y 8 y que previamente ha sido secada a partir de un tampón no volátil; y  
(b) un disolvente polar aprótico
- 10 en donde la insulina se solubiliza en el disolvente polar aprótico, en donde la mayor parte de la insulina solubilizada comprende formas estables monoméricas o diméricas de insulina o sus mezclas, y en donde el contenido de agua de la formulación es igual o menor del 15% p/v.
- 2.- La formulación de la reivindicación 1, en donde la memoria de pH de la insulina es entre 1 y 4 ó entre 1 y 3, ó alrededor de 2, o en donde la memoria de pH de la insulina es entre 6 y 8 ó alrededor de 7.
- 15 3.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el disolvente polar aprótico es dimetilsulfóxido (DMSO), n-metil pirrolidona (NMP), acetato de etilo, dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA), o carbonato de propileno, o mezclas de los mismos, en particular dimetilsulfóxido (DMSO).
- 20 4.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la formulación comprende 3 mg/ml a 50 mg/ml, de 3 mg/ml a 10 mg/ml, o de 10 mg/ml a 50 mg/ml de insulina.
- 25 5.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la mayor parte de la insulina solubilizada se encuentra en forma monomérica o dimérica.
- 6.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un ingrediente que es capaz de reducir la agregación de formas monoméricas o diméricas de insulina.
- 30 7.- La formulación de la reivindicación 6, en donde el ingrediente que es capaz de reducir la agregación de formas monoméricas o diméricas de insulina es urea, cloruro de guanidinio, un aminoácido, un azúcar, un poliol, un polímero, un ácido, o un tensoactivo, o mezclas de los mismos.
- 35 8.- La formulación de la reivindicación 7, en donde el ácido es ácido acético, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido glutámico, ácido aspártico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, o ácido adípico, o mezclas de los mismos.
- 40 9.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un codisolvente, en particular el agua.
- 10.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la formulación no incluye zinc o en donde el zinc presente en la formulación está unido a un agente quelante.
- 45 11.- La formulación de la reivindicación 10, en donde el tampón no volátil es un tampón de glicina, un tampón de citrato, o un tampón de fosfato o mezclas de los mismos.
- 50 12.- La formulación de la reivindicación 11, en donde el tampón comprende un agente quelante, en particular ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), ácido tartárico, glicerina, o ácido cítrico.
- 55 13.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además un ingrediente que es capaz de deprimir el punto de congelación del disolvente polar aprótico a alrededor de 0° C, en particular el agua, un azúcar, un alcohol de azúcar, o mezclas de los mismos.
- 60 14.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la insulina es insulina humana no modificada.
- 15.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende además un análogo de amilina que se solubiliza en la formulación, en particular pramlintida.
- 65 16.- La formulación de la reivindicación 15, en donde la pramlintida tiene una memoria de pH alrededor de 2 ó en donde la pramlintida tiene una memoria de pH alrededor de 2 y la insulina tiene una memoria de pH alrededor de 2.
- 17.- La formulación de la reivindicación 16, en donde la pramlintida ha sido previamente secada en un tampón no volátil, dicho tampón tiene un pH alrededor de 2.
- 18.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde el contenido de agua de la formulación está entre 5 y 15% p/v, 7 y 12% p/v, o entre 8 y 10% p/v, o alrededor de 9% p/v.

## ES 2 574 761 T3

- 19.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde la formulación se encuentra en forma líquida, en particular en forma de una solución.
- 5 20.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde al menos el 90% de la insulina en el interior de la formulación se mantiene química y físicamente estable cuando se almacena a temperatura ambiente durante un mes.
- 10 21.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde la formulación está comprendida dentro de un contenedor, en particular una jeringa, un dispositivo de inyección de bolígrafo, un dispositivo autoinyector, una bomba, o una bolsa de perfusión.
- 15 22.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde el disolvente polar aprótico es la fase continua de la formulación.
- 20 23.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en donde la formulación comprende al menos el 75, 80, 85, 90, o 95% p/v de disolvente polar aprótico.
- 25 24.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde la insulina solubilizada es meta estable.
- 30 25.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 para utilizarla en un procedimiento para reducir el nivel de glucosa en sangre, que comprende la administración de la formulación a un sujeto necesitado del mismo, en una cantidad eficaz que disminuya del sujeto el nivel de glucosa en sangre.
- 35 26.- La formulación de la reivindicación 25, en donde el nivel de glucosa en sangre del sujeto disminuye a los 30 minutos, 60 minutos, o a los 90 minutos después de la administración.
- 40 27.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 26, en donde el nivel  $\frac{1}{2}$  Tmax mas temprano de insulina en sangre en el sujeto ocurre entre los 30 y 60 minutos después de la administración.
- 45 28.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en donde el sujeto ha sido diagnosticado de diabetes Tipo 1 o Tipo 2.
- 50 29.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en donde la formulación se administra al sujeto 10 minutos, 5 minutos, o 1 minuto antes de la ingestión de alimentos, ó 1 minuto, 5 minutos, ó 10 minutos después de la ingestión de alimentos por parte del sujeto.
- 55 30.- Un procedimiento de fabricación de la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 que comprende:  
(a) el secado de una mezcla que comprende insulina y un tampón no volátil para obtener insulina seca, en donde la insulina seca tiene una memoria de pH entre 1 y 4 ó entre 6 y 8; y  
(b) la reconstitución de la insulina secada en un disolvente polar aprótico, en donde la insulina se solubiliza en el disolvente polar aprótico, en donde la insulina solubilizada comprende formas estables monoméricas o diméricas de insulina o mezclas de las mismas, y en donde el contenido de agua de la formulación es igual o menor del 15% p/v.
- 60 31.- El procedimiento de la reivindicación 30, en donde la formulación comprende de 3 mg/ml a 50 mg/ml, de 3 mg/ml a 10 mg/ml, o de 10 mg/ml a 50 mg/ml de insulina, o de 50 mg/ml a 100 mg/ml de insulina.
- 65 32.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 31, que además comprende:  
(c) el secado de una mezcla que comprende un análogo de la amilina y el mismo tampón no volátil del paso (a), o un segundo tampón no volátil para obtener un análogo de amilina seco; y  
(b) la reconstitución del análogo de amilina secada en el disolvente polar aprótico junto con la insulina seca, en donde el análogo de amilina seca se solubiliza en el disolvente polar aprótico.
- 33.- El procedimiento de la reivindicación 32, en donde el análogo de amilina es pramlintida, y en donde la pramlintida tiene una memoria de pH alrededor 2 o en donde la pramlintida tiene una memoria de pH alrededor de 2 y la insulina tiene una memoria de pH alrededor de 2.
- 34.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 33, en donde el tampón no volátil tiene un rango de pH alrededor de 2.
- 35.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, que comprende además añadir entre 5 y 15% p/v de la formulación de agua como codisolvente.



**FIG. 1**

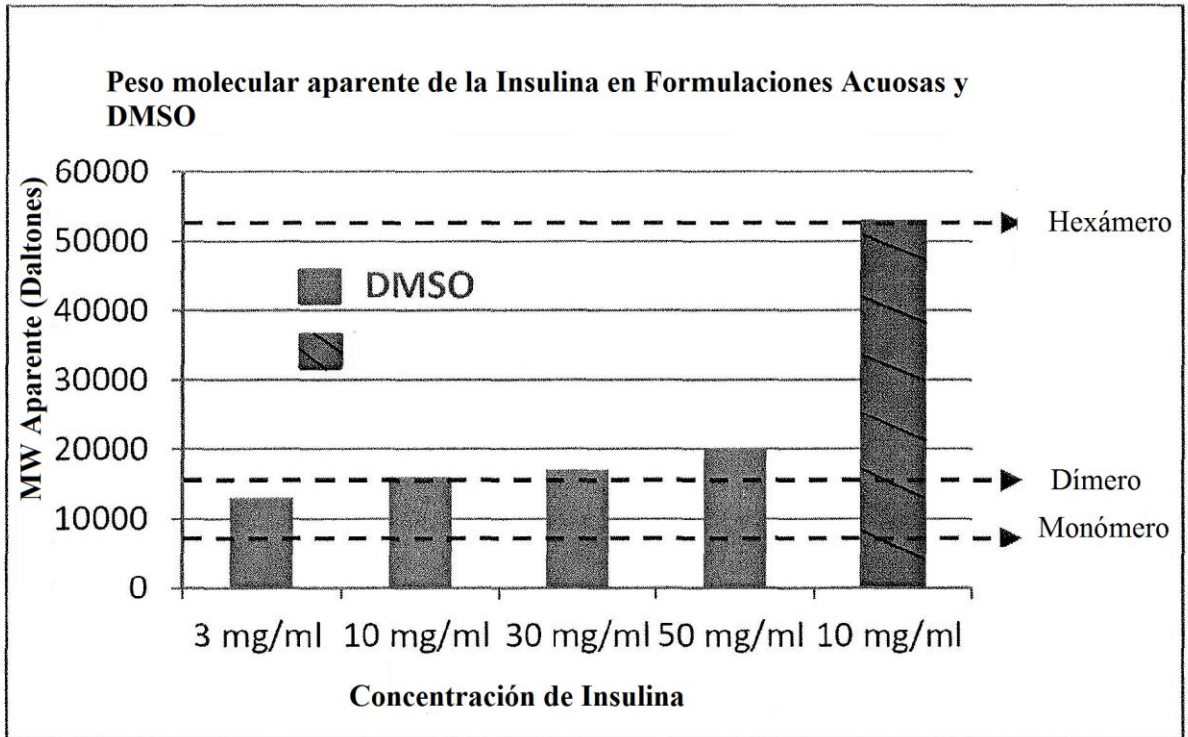
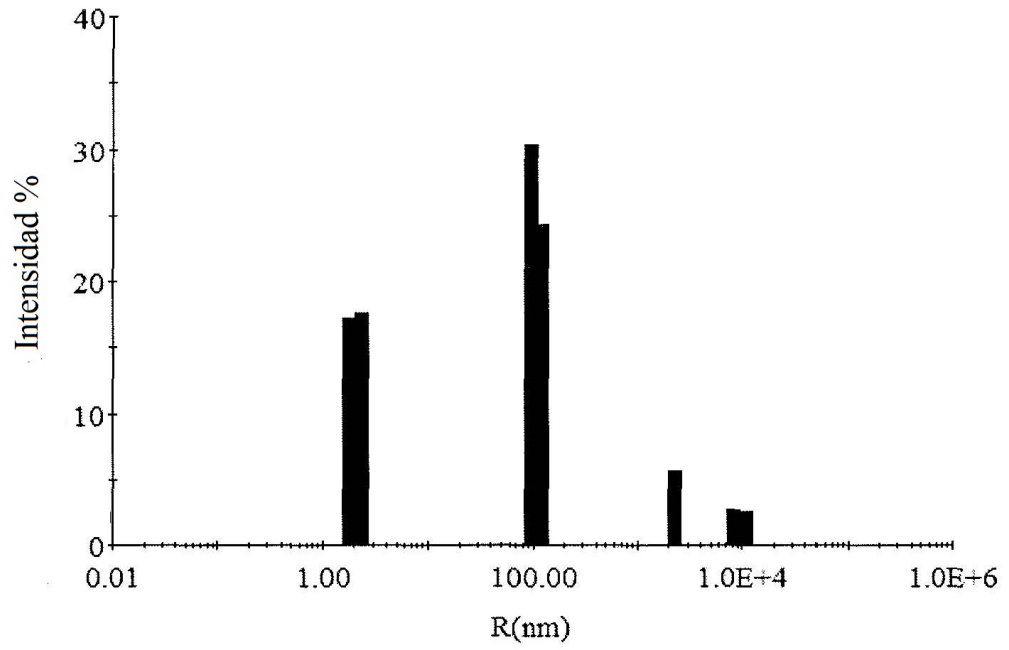
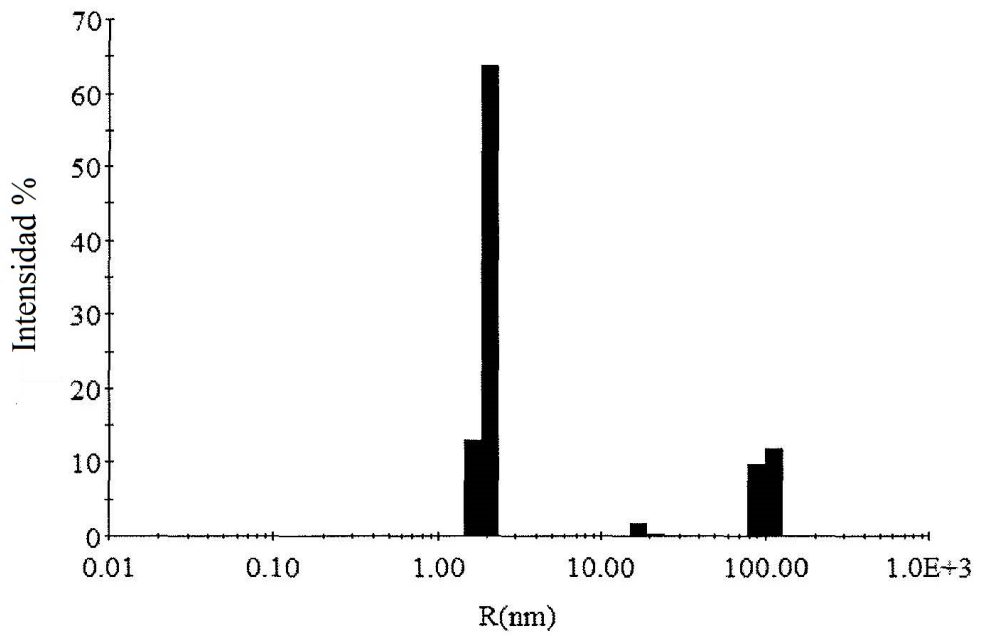


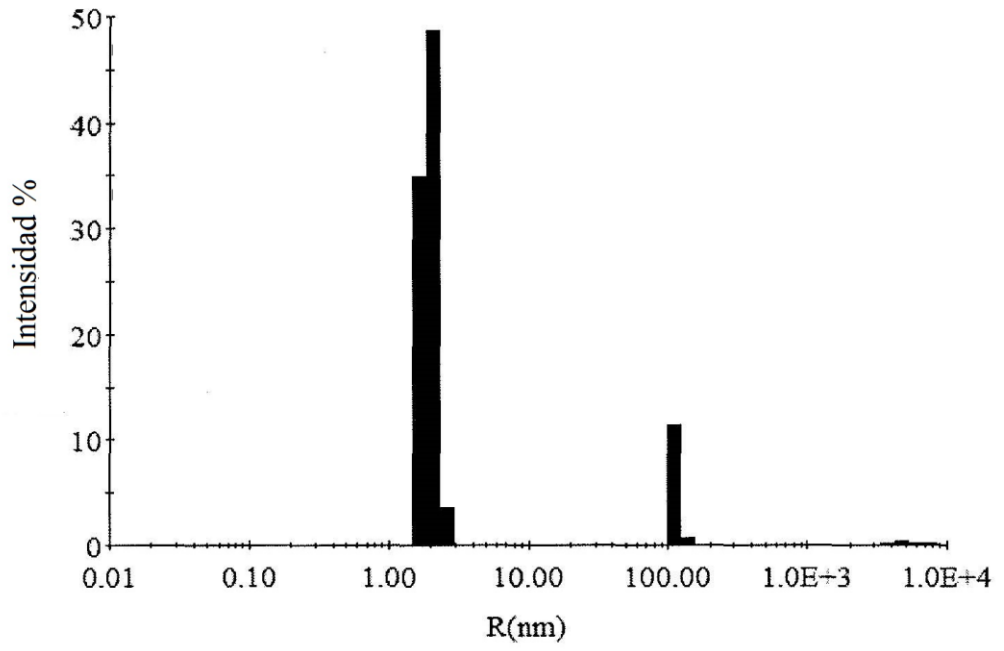
FIG. 2



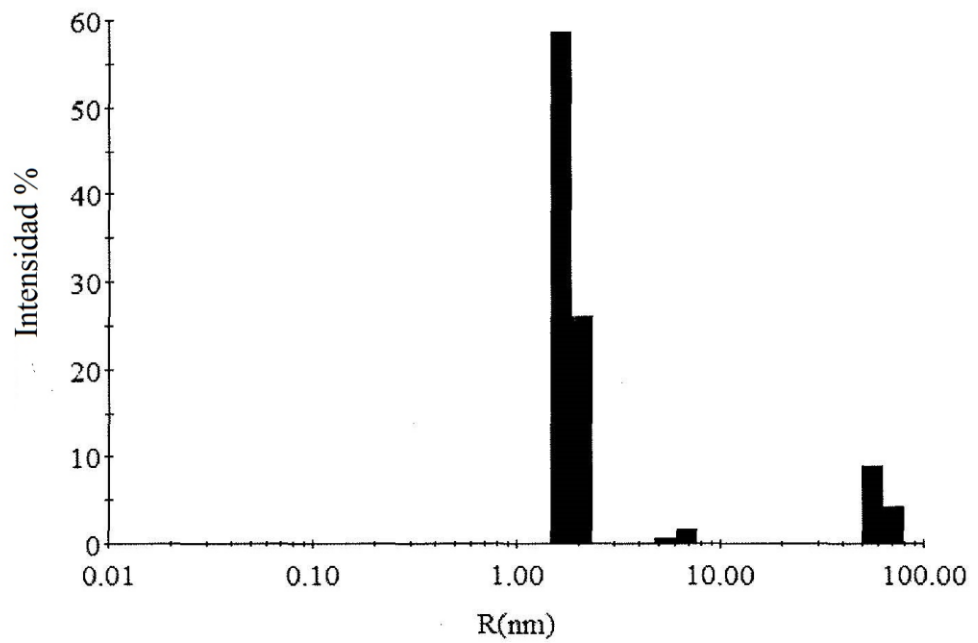
**FIG. 3**



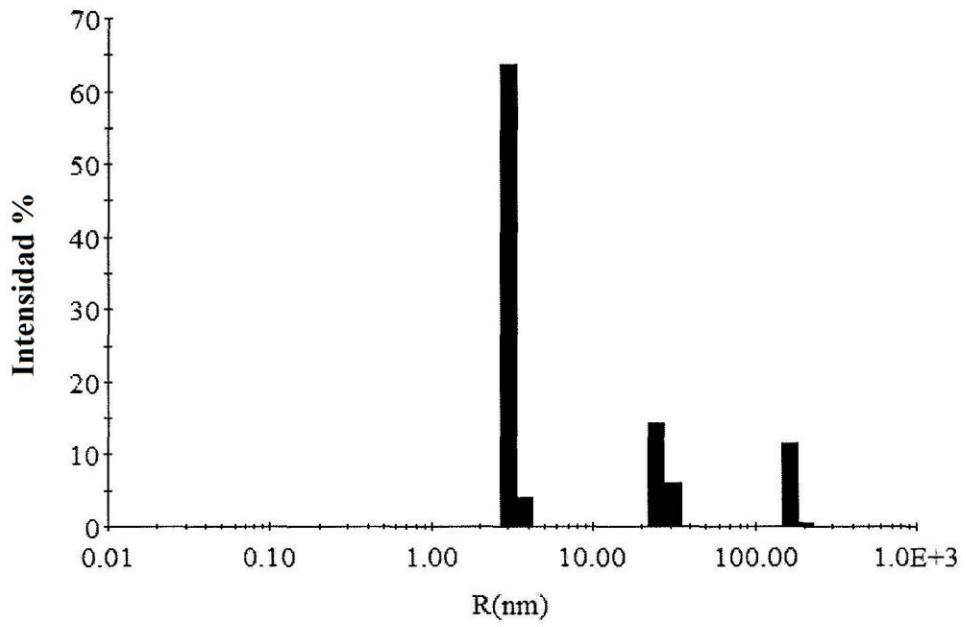
**FIG. 4**



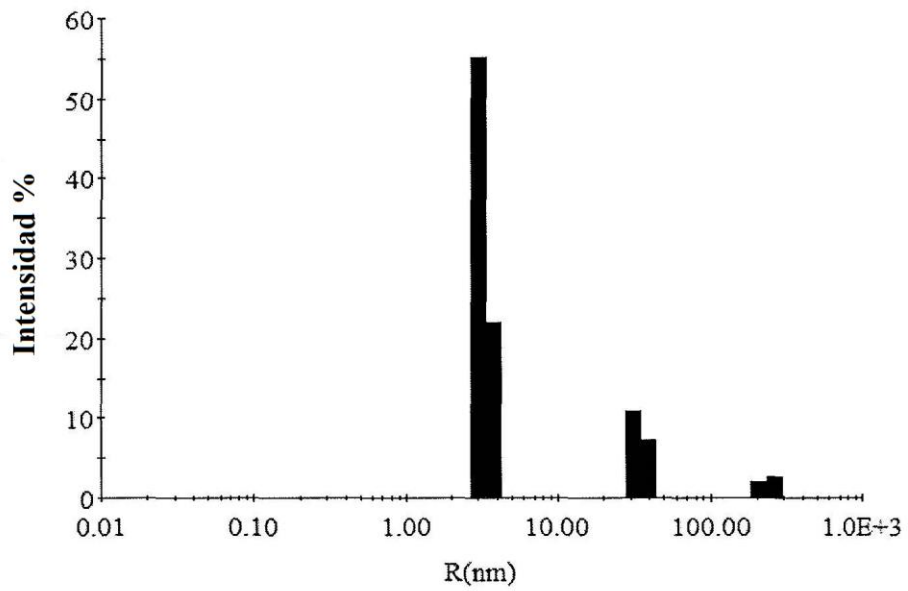
**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG. 8**