



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 505**

51 Int. Cl.:
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02729985 .8**
96 Fecha de presentación : **09.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1381385**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2004**

54 Título: **Preparados de insulina libre de zinc o con bajo contenido en zinc con estabilidad mejorada.**

30 Prioridad: **23.03.2001 DE 101 14 178**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.06.2011

73 Titular/es:
SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GmbH
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt am Main, DE

72 Inventor/es: **Boderke, Peter**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 360 505 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

Preparados de insulina libre de zinc o con bajo contenido en cinc con estabilidad mejorada

5 La invención se refiere a formulaciones farmacéuticas estabilizadas que contienen insulina humana Lys(B3), Glu (B29); un tensioactivo o combinaciones de múltiples tensioactivos, en donde el tensioactivo representa ésteres y éteres parciales y de ácidos grasos de alcoholes polivalentes, de glicerol y sorbitol, y opcionalmente un conservante o combinación de múltiples conservantes, así como, opcionalmente, un agente isotónico, un tampón u otros aditivos o sus combinaciones, en donde la formulación farmacéutica tiene un bajo contenido en cinc o está libre de cinc. Estas formulaciones se pueden utilizar en el tratamiento de la diabetes y se usan de manera especial en bombas de insulina, plumas, inyectores, inhaladores o en preparaciones en las que se requiere una mayor estabilidad física. La invención se refiere igualmente a preparaciones parenterales, que contienen dichas formulaciones y que pueden ser utilizadas en la diabetes, así como a métodos de fabricación de estas preparaciones y para mejorar la estabilidad de los preparados de insulina.

15 En el mundo, alrededor de 120 millones de personas sufren diabetes mellitus. De esta cifra, aproximadamente 12 millones son diabéticos Tipo I, en los que la sustitución de la secreción deficitaria de insulina endocrina constituye, en la actualidad, la única terapia posible. Los afectados dependen de inyecciones de insulina, por regla general varias al día, para el resto de su vida. Al contrario que la diabetes de Tipo I, en la diabetes de Tipo II no existe un déficit fundamental de insulina, si bien en un elevado número de casos, sobre todo en etapas avanzadas, el tratamiento con insulina, eventualmente en combinación con un antidiabético oral, se considera una forma de terapia favorable.

20 En las personas sanas, la liberación de insulina desde el páncreas se encuentra ligada estrictamente a la concentración sanguínea de glucosa. Los niveles elevados de glucosa, por ejemplo los que aparecen tras las comidas, son compensados rápidamente por un incremento correspondiente de la secreción de insulina. En ayunas, el nivel plasmático de insulina desciende hasta un valor basal, que basta para asegurar un suministro continuo de glucosa a órganos y tejidos sensibles a la insulina, y mantener baja durante la noche la producción hepática de glucosa. Por lo general, la sustitución de la secreción propia de insulina por la administración exógena, y la mayoría de las veces subcutánea, de insulina, no alcanza ni con mucho la calidad antes descrita de la regulación fisiológica de la glucosa sanguínea. Se producen frecuentemente fluctuaciones de la glucosa sanguínea hacia arriba o hacia abajo, que en sus formas más graves pueden ser potencialmente mortales. Además, los niveles elevados de glucosa a lo largo de los años sin síntomas iniciales, representan un considerable riesgo para la salud. El estudio a gran escala DCCT, (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) *N. Engl. J. Med.* 329, 977-986), realizado en EE.UU., demostró claramente que los niveles de glucosa en sangre crónicamente elevados son responsables básicamente del desarrollo de trastornos diabéticos tardíos. Los trastornos diabéticos tardíos son lesiones micro- y macrovasculares que se manifiestan según el caso como retinopatías, nefropatías o neuropatías, y que conducen a la ceguera, al fracaso renal, y a la amputación de extremidades, y que se asocian, además, con un riesgo elevado de enfermedades cardiovasculares. De ello se deduce que una terapia mejorada de la diabetes debe estar dirigida, en primer lugar, a mantener la glucosa sanguínea dentro de un intervalo fisiológico lo más estrecho posible. Según el concepto de la terapia insulínica intensificada, esto se debe conseguir mediante varias inyecciones al día de preparaciones de insulina de acción rápida y de acción lenta. Las formulaciones de acción rápida se administran con las comidas, para compensar el aumento postprandial de la glucosa sanguínea. Las insulinas basales de acción lenta deben asegurar el suministro básico de insulina, especialmente durante la noche, para evitar la aparición de una hipoglucemia.

45 La insulina es un polipéptido formado por 51 aminoácidos, que se distribuyen en 2 cadenas de aminoácidos: la cadena A, con 21 aminoácidos, y la cadena B, con 30 aminoácidos. Las cadenas están unidas entre sí a través de 2 puentes disulfuro. Las preparaciones de insulina se utilizan desde hace muchos años en la terapia de la diabetes. En este sentido, no se utilizan solamente insulinas de origen natural, sino que más recientemente se vienen empleando también derivados y análogos de insulina.

50 Los análogos de insulina son análogos de insulinas de origen natural, concretamente insulinas humanas o insulinas de origen animal, que se diferencian de la insulina de origen natural por la sustitución de al menos un radical aminoácido, que se encuentra presente en la forma natural, con otro radical aminoácido, y/o la adición/eliminación de al menos un radical aminoácido de la correspondiente insulina de origen natural que, por lo demás, es igual. Los radicales aminoácidos agregados y/o sustituidos pueden ser también de procedencia no natural.

Los derivados de insulina son derivados de insulinas de origen natural o de un análogo de insulina, que se obtienen por modificaciones químicas. La modificación química puede consistir, por ejemplo, en la adición de uno o múltiples grupos químicos determinados a uno o múltiples aminoácidos.

55 Por lo general, los derivados de insulina y los análogos de insulina muestran, con respecto a la insulina humana, una acción algo modificada.

En los documentos EP 0 214 826, EP 0 375 437 y EP 0 678 522 se describen análogos de insulina con un inicio de acción acelerado. El documento EP 0 124 826 se refiere, entre otras, a sustituciones de B27 y B28. El documento

EP 0 678 522 describe análogos de insulina que presentan en la posición B29 diversos aminoácidos, preferentemente prolina, pero no ácido glutámico.

5 El documento EP 0 375 437 comprende análogos de insulina con lisina o arginina en B28 que, opcionalmente, pueden estar modificados además en B3 y/o A21.

En el documento EP 0 419 504 se dan a conocer análogos de insulina que están protegidos contra modificaciones químicas, en donde se han cambiado la asparagina en B3 y al menos otro aminoácido en las posiciones A5, A15, A18 o A21.

10 En el documento WO 92/00321 se describen análogos de insulina en los que al menos un aminoácido de las posiciones B1-B6 está sustituido con lisina o arginina. Según el documento WO 92/00321, estas insulinas exhiben una acción prolongada.

15 Los preparados de insulina disponibles en el mercado, procedentes de insulinas de origen natural, y destinados a la sustitución de insulina, se diferencian en el origen de la insulina (por ejemplo, insulina bovina, porcina o humana), así como en la composición, con lo que se puede influir sobre el perfil de acción (inicio y duración del efecto). A través de la combinación de diferentes preparados de insulina se pueden obtener los más diversos perfiles de acción y ajustar valores de azúcar en sangre lo más fisiológicos posible. Desde hace algún tiempo, no son solamente las insulinas de origen natural mencionadas, sino también preparados procedentes de derivados o análogos de insulina disponibles en el comercio, las que exhiben una cinética modificada. Hoy en día, la tecnología de ADN recombinante permite la fabricación de estas insulinas modificadas. Entre estas se encuentran los llamados análogos monómeros de insulina tales como insulina Lispro, insulina Aspart e insulina humana HMR1964 (Lys(B3), Glu(B29) con un efecto de rápida instauración, así como la insulina Glargina, con una duración de acción prolongada.

20 Además de la duración de acción, la estabilidad del preparado es de gran importancia para los pacientes. Se requieren formulaciones estabilizadas de insulina, con una estabilidad física aumentada a largo plazo, especialmente para preparaciones que están expuestas a sobrecargas mecánicas particulares o a temperaturas más elevadas. Se incluyen entre estas, por ejemplo, las insulinas que se presentan en sistemas de administración tales como plumas, sistemas de inhalación, sistemas de inyección sin aguja o bombas de insulina. Las bombas de insulina son portadas por el paciente o están implantadas en su cuerpo. En ambos casos, el preparado está sometido al calor del cuerpo y al movimiento, así como al movimiento impulsor de la bomba y, por consiguiente, se encuentra expuesto a una muy elevada sobrecarga termo-mecánica. Dado que también las plumas de insulina (plumas de uso único o múltiple) a menudo también se deben llevar sobre el cuerpo, se plantean los mismos problemas. Los preparados existentes en la actualidad muestran una estabilidad limitada bajo estas condiciones. La insulina se presenta como solución neutra en concentración farmacéutica, en forma de hexámeros estabilizados que contienen cinc, constituida por 3 unidades dimeras idénticas (Brange et al., *Diabetes Care* 13:923-954 (1990)). Mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos se puede reducir la asociación de la insulina. De este modo, por ejemplo, el análogo de insulina Lispro se encuentra predominantemente como monómero y, por lo tanto, se absorbe más rápidamente y exhibe una duración de acción más corta (HPT Ammon y C. Weming; *Antidiabetika*; 2. Ed.; Wiss. Verl.-Ges. Stuttgart; 2000; pág. 94 y siguientes). Precisamente los análogos de insulina de acción rápida, presentes en forma de monómero o dímero, muestran, sin embargo, una menor estabilidad y una tendencia mayor a la agregación bajo sobrecargas térmicas y mecánicas. Esta última se manifiesta a menudo por la aparición de turbiedades y la precipitación de agregados insolubles. (Bakaysa et al, Patente de EE.UU. No. 5474978). Estos productos de transformación, de elevado peso molecular (dímeros, trímeros, polímeros) y agregados no solo reducen la dosis administrada de insulina, sino que pueden desencadenar irritaciones o reacciones inmunológicas en el paciente. Adicionalmente, estos agregados insolubles pueden adherirse a las cánulas y conductos de las bombas y obstruirlas. Puesto que el cinc conduce a una estabilización adicional de la insulina, los preparados libres de cinc o con un bajo contenido de cinc son especialmente propensos a sufrir inestabilidad. Sobre todo, los análogos monómeros de insulina, con un rápido inicio de acción, muestran una tendencia muy acusada a sufrir agregación e inestabilidad física, porque la formación de agregados insolubles tiene lugar a partir de los monómeros de insulina. Para garantizar la calidad de un preparado de insulina es preciso evitar la formación de agregados.

50 Existen diversos métodos para estabilizar las formulaciones de insulina. Por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO98/56406 se describen formulaciones estabilizadas a través de tampones de TRIS o arginina. La patente de EE.UU. 5866538 describe un preparado de insulina que contiene glicerol y cloruro sódico en concentraciones de 5 - 100 mM y que debe exhibir una estabilidad incrementada. La patente de EE.UU. 5948751 describe preparaciones de insulina con una estabilidad física aumentada, que se obtiene por la adición de manitol o azúcares simulares. La adición de un exceso de cinc a una solución de insulina que contiene cinc puede elevar también la estabilidad (J. Brange et al., *Diabetic Medicine*, 3: 532-536, 1986). Igualmente, se ha descrito detalladamente la influencia del valor de pH y diferentes aditivos sobre la estabilidad de preparaciones de insulina (J. Brange & L. Langkjaer, *Acta Pharm. Nordica* 4: 149-158).

Con frecuencia, estos métodos de estabilización no son suficientes para satisfacer las necesidades aumentadas (mejora de la conservación a temperatura ambiente o corporal, y sobrecarga mecánica), o para los llamados análogos monómeros de insulina o insulinas de acción rápida, que son especialmente sensibles a las tensiones físicas. Además, todos los preparados comerciales de insulina contienen cinc, que se agrega para estabilizar el preparado. De esta forma, Bakaysa et al. describen en la patente de EE.UU. 5474978 formulaciones estabilizadas, formadas por complejos de insulina, que están compuestas por 6 monómeros de análogos de insulina, 2 átomos de cinc y por lo menos 3 moléculas de un conservante fenólico. Adicionalmente, estas formulaciones pueden contener un tampón fisiológicamente aceptable y un conservante. Si, por el contrario, se quiere fabricar preparados de insulina con un contenido nulo o bajo en cinc, los citados métodos de estabilización no son suficientes para un preparado comercializable. Por ejemplo, no fue posible desarrollar una preparación libre de cinc de insulina Lispro debido a una estabilidad insuficiente (Bakaysa et al., *Protein Science* (1996), 5:2521-2531). En el estado de la técnica no se describen formulaciones de insulina con bajo o nulo contenido en cinc y que tengan estabilidad suficiente, en particular estabilidad física.

Por lo tanto, la presente invención tuvo como misión obtener preparaciones libres de cinc para insulinas y sus derivados y análogos, que se distingan por una elevada estabilidad.

De manera sorprendente, se ha encontrado que la adición de tensioactivos (emulsionantes) tales como, por ejemplo, poloxámeros o polisorbatos (Tween[®]) puede incrementar drásticamente la estabilidad de los preparados de insulina y, por consiguiente, se pueden fabricar preparaciones incluso exentas de cinc que exhiben una estabilidad superior y que se pueden utilizar también en bombas de infusión u otros sistemas de administración. Estas preparaciones muestran una estabilidad aumentada, especialmente bajo condiciones de tensión. Esta afirmación es válida tanto para la insulina como para análogos y derivados de la insulina, o mezclas de los mismos.

La insulina forma complejos con los iones de cinc en preparaciones neutras. En este caso, en presencia de concentraciones suficientes de cinc, se forman hexámeros estables a partir de 6 moléculas de insulina y 2 iones de cinc. Para la formación de esta estructura es necesaria una concentración de cinc, con respecto a la insulina, de al menos 0,4% (en peso). Para una preparación de 100 UI/ml de insulina, esto corresponde a una concentración de aprox. 13 µg/ml de cinc. Un exceso de cinc (por ejemplo, 4 iones de cinc por hexámero) estabiliza claramente la preparación frente a las tensiones físicas (J. Brange et al., Neutral insulin solutions physically stabilized by the addition of Zn²⁺ (Soluciones neutras de insulina estabilizadas físicamente por la adición de Zn²⁺) *Diabetic Med.* 3, 532-536 (1986)). Por el contrario, en las preparaciones con concentraciones menores de cinc (< 0,4 por ciento en peso, referida a la insulina) se reduce la formación de hexámeros. Esto conduce a una estabilidad fuertemente reducida de la preparación (J. Brange y L. Langkjaer; *Acta Pharm Nord*, 4: 149-158 (1992)). En el sentido de esta solicitud, "libre de cinc" o "con bajo contenido en cinc" significa, por lo tanto, la presencia de menos de 0,4 por ciento en peso de cinc referido al contenido en insulina de la preparación, preferentemente menos de 0,2 por ciento en peso con respecto al contenido de insulina. Por ejemplo, en el caso de un preparado habitual de insulina con 100 unidades por mililitro (0,6 µmol/ml), esto representa una concentración de menos de 13 µg/ml de iones Zn⁺⁺ (0,2 µmol/ml), preferentemente menos de 6,5 µg/ml de iones Zn⁺⁺ en la preparación farmacéutica, referida a una concentración de insulina de 100 unidades/ml. La ausencia de cinc se puede lograr también por la adición de sustancias complejantes de cinc tales como, por ejemplo, citrato o EDTA, de forma que no haya disponibles suficientes iones cinc para la formación de complejos de hexámeros insulina/cinc.

Según la reivindicación 1, las preparaciones farmacéuticas contienen 60-6000 nmol/ml, preferentemente 240-3000 nmol/ml de insulina.

Como tensioactivos se utilizan tensioactivos según la reivindicación 1 tales como, por ejemplo: ésteres parciales y de ácidos grasos de alcoholes polivalentes tales como glicerol, sorbitol entre otros (Span[®], Tween[®], Myrij[®], Brij[®]).

Los tensioactivos se encuentran presentes en la composición farmacéutica en una concentración de 0,1 µg/ml - 10000 µg/ml, preferentemente, 1 µg/ml - 1000 µg/ml.

Adicionalmente, la preparación puede contener conservantes (por ejemplo, fenol, cresol, parabenos), agentes isotónicos (por ejemplo, manitol, sorbitol, lactosa, dextrosa, trehalosa, cloruro sódico, glicerol), sustancias tamponantes, sales, ácidos y álcalis, así como otros aditivos. Estas sustancias pueden estar presentes de forma aislada o como mezclas.

Glicerol, dextrosa, lactosa, sorbitol y manitol están presentes habitualmente en la preparación farmacéutica en una concentración de 100 - 250 mM, y NaCl en una concentración de hasta 150 mM. Las sustancias tamponantes tales como, por ejemplo, tampones fosfato, acetato, citrato, arginina, glicil-glicina o TRIS (es decir, 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol), así como las correspondientes sales, se hallan presentes en una concentración de 5 - 250 mM, preferentemente 10 - 100 mM.

Los aditivos adicionales pueden ser, entre otros, sales, arginina, protamina o Surfen[®].

Por lo tanto, el objeto de la invención es una formulación farmacéutica según la reivindicación 1, que contiene opcionalmente un conservante o combinaciones de múltiples conservantes; y opcionalmente un agente isotónico,

5 sustancias tamponantes y/o aditivos adicionales o combinaciones de los mismos, en donde la formulación farmacéutica está exenta de cinc o presenta un bajo contenido de este elemento; se prefiere una formulación farmacéutica de este tipo, en la que los ésteres y éteres parciales y de ácidos grasos de glicerol y sorbitol se seleccionan de un grupo que contiene Span[®], Tween[®], Myrj[®], Brij[®], Cremophor[®]; en donde el conservante se selecciona de un grupo que contiene fenol, cresol, parabenos; en donde el agente isotónico se selecciona de un grupo que contiene manitol, sorbitol, cloruro sódico, glicerol; en donde los aditivos se seleccionan de un grupo que contiene sustancias tamponantes, ácidos, álcalis; en donde la insulina es insulina humana Lys(B3)-Glu(B29).

10 Un objeto adicional de la invención es una formulación farmacéutica como la que se ha descrito anteriormente, en la que el análogo de insulina se encuentra presente en una concentración de 60 - 6000 nmol/ml, preferentemente en una concentración de 240 - 3000 nmol/ml (correspondiente aproximadamente a una concentración de 1,4 - 35 mg/ml o 40 - 500 unidades/ml); en la que el tensioactivo está presente en una concentración de 0,1 - 10000 µg/ml, preferentemente en una concentración de 1 - 1000 µg/ml.

15 Un objeto adicional de la invención es una formulación farmacéutica como la que se ha mencionado anteriormente, en la que el glicerol y/o el manitol están presentes en una concentración de 100 - 250 mM, y/o el cloruro está presente, preferentemente, en una concentración de hasta 150 mM.

Otro objeto adicional de la invención es una formulación farmacéutica como la descrita anteriormente, en la que está presente una sustancia tamponante en una concentración de 5 - 250 mM.

20 Otro objeto de la invención es una formulación farmacéutica de insulina que contiene otros aditivos tales como, por ejemplo, sales, protamina o Surfen[®], que retrasan la liberación de insulina. Se incluyen en este contexto también mezclas de estas insulinas de liberación retardada con las formulaciones anteriormente descritas.

Un objeto adicional de la invención es un método para la fabricación de tales formulaciones farmacéuticas. Así mismo, la invención permite la aplicación de estas formulaciones para el tratamiento de la diabetes mellitus.

Un objeto adicional de la invención es el uso o la adición de los tensioactivos reivindicados como estabilizadores durante el proceso de fabricación del análogo de insulina.

25 En las formulaciones farmacéuticas descritas que contienen un polipéptido según la reivindicación 1, el valor de pH se encuentra entre 2 y 12, preferentemente entre 6 y 8,5 y, de forma especialmente preferida, entre 7 y 7,8.

A continuación, la solicitud se describirá mediante algunos ejemplos (comparativos) que, en ningún caso, pretenden limitarla.

Ejemplos:

30 Estudios comparativos: Se fabrican diversas preparaciones libres de cinc con los análogos de insulina HMR1964 (insulina humana Lys(B3), Glu(829)). Para esto, se disuelven HMR1964 libre de cinc y los restantes componentes en una parte de agua para inyección y se ajusta el valor de pH con ácido clorhídrico/NaOH a 7,3 +/- 0,2, y se enrasa hasta el volumen final. En cada uno de los ensayos descritos a continuación, la concentración de HMR1964 es de 3,5 mg/ml (correspondiente a 100 unidades/ml). Se fabrica una segunda preparación de forma idéntica, aunque se 35 agrega una cantidad determinada de un tensioactivo. Las soluciones se envasan en recipientes de vidrio (viales) de 5 ml o 10 ml y se sella con tapón de rosca. Estos recipientes se someten, entonces, a condiciones de tensión:

1. Ensayo de rotación: 5 viales de un lote, así como 5 viales del lote comparativo se someten a un ensayo de rotación. A tal efecto, los viales se fijan en un rotador y se hacen girar a 37°C a 60 rpm en un ángulo de 360°. Después del periodo de tiempo establecido, se compara la turbiedad presente en las preparaciones que se encuentran en los viales con un estándar de turbiedad, o en un fotómetro de laboratorio para la detección de la turbiedad (nefelómetro) se determina el valor en Unidades Nefelométricas en Formacina (FNU). El ensayo se lleva a cabo durante el tiempo necesario hasta que en todos los viales se haya superado un valor de turbiedad de 18 FNU.

2. Ensayo de agitación: Los viales se depositan en un agitador de laboratorio provisto de una incubadora y se agitan a 30°C a 100 revoluciones por minuto. Después de periodos de tiempo definidos, se determina el valor de turbiedad de las muestras por medio de un fotómetro de turbiedad de laboratorio (nefelómetro), expresado en Unidades Nefelométricas en Formacina (FNU).

Ejemplo 1: Estabilización de HMR1964 por la adición de cinc en el ensayo de rotación

50 a) En una solución acuosa que, en la formulación final contiene 2,7 mg/ml de m-cresol, 20 mg/ml de glicerol y 6 mg/ml de trometamol (Tris), se disuelve HMR1964 libre de cinc (calculada de forma que en la formulación terminada se alcance una concentración de 3,5 mg/ml), y se ajusta el valor de pH con ácido clorhídrico 1N/NaOH 1N a 7,2 - 7,4 (medido a temperatura ambiente). La solución se enrasa hasta el volumen final con agua y se filtra bajo condiciones estériles por medio de un filtro de 0,2 µm. Finalmente, se envasa en viales de inyección de 5 ml y se cierra con un tapón.

b) De manera idéntica, se prepara una solución de comparación, aunque antes de enrasar con agua, se agrega una cantidad correspondiente de una solución madre de cloruro de cinc al 0,1%, de modo que en la formulación terminada se alcanza un contenido en cinc de 15 µg/ml.

5 A continuación, se someten al ensayo de rotación 5 muestras de cada una de estas soluciones, y se determina la turbiedad después de diferentes intervalos de tiempo. Los resultados se muestran en la Tabla siguiente.

Descripción	Número de muestras de ensayo con turbiedad > 18 FNU después de					
	0 h	8 h	16 h	32 h	40 h	56 h
HMR1964 sin aditivo	0	5	-	-	-	-
HMR1964 +15 µg/ml de Zn	0	0	0	4	4	5

La adición de cinc puede retrasar claramente en el tiempo la turbiedad existente en la solución y, por lo tanto, estabiliza la formulación de HMR1964. Sin la adición de cinc, la preparación exhibe una turbiedad evidente ya después de 8 horas en el ensayo de rotación.

10 **Ejemplo 2: Estabilización de HMR1964 por la adición de polisorbato 20 (Tween® 20) en el ensayo de rotación**

15 a) En una solución acuosa que, en la formulación final contiene 3,15 mg/ml de m-cresol, 5 mg/ml de NaCl y 6 mg/ml de trometamol, se disuelve HMR1964 libre de cinc (calculada de forma que en la formulación terminada se alcance una concentración de 3,5 mg/ml), y se ajusta el valor de pH con ácido clorhídrico 1N/NaOH 1 N a 7,2 - 7,4 (medido a temperatura ambiente). La solución se enrasa hasta el volumen final con agua y se filtra bajo condiciones estériles por medio de un filtro de 0,2 µm. Finalmente, se envasa en viales de inyección de 5 ml y se cierra con un tapón.

b) De manera idéntica, se prepara una solución de comparación, aunque antes de enrasarla con agua, se agrega una cantidad correspondiente a una solución madre al 0,1% de polisorbato 20 (Tween® 20), de modo que en la formulación terminada se obtenga una concentración de 10 µg/ml.

20 A continuación, se someten al ensayo de rotación 5 muestras de cada una de estas soluciones, y se determina la turbiedad después de diferentes intervalos de tiempo. Los resultados se muestran en la Tabla siguiente.

Descripción	Número de muestras de ensayo con turbiedad > 18 FNU después de					
	0 h	8h	16 h	24 h	32 h	40 h
HMR1964 sin aditivo	0	5	-	-	-	-
HMR1964 + 10 µg/ml Tween® 20	0	0	0	0	5	-

La adición de polisorbato 20 retrasa muy claramente la aparición de la turbiedad.

Ejemplo 3: Estabilización de HMR1964 por la adición de poloxámero en el ensayo de rotación

25 a) En una solución acuosa que, en la formulación final contiene 4,5 mg/ml de fenol, 5 mg/ml de NaCl y 6 mg/ml de trometamol, se disuelve HMR1964 libre de cinc (calculada de forma que en la formulación terminada alcance una concentración de 3,5 mg/ml), y se ajusta el valor de pH con ácido clorhídrico 1N/NaOH 1N a 7,2 - 7,4 (medido a temperatura ambiente). La solución se enrasa hasta el volumen final con agua y se filtra bajo condiciones estériles por medio de un filtro de 0,2 µm. Finalmente, se envasa en viales de inyección de 5 ml y se cierra con un tapón.

30 b) De manera idéntica, se prepara una solución de comparación, aunque antes de enrasarla con agua, se agrega una cantidad correspondiente a una solución madre al 0,1% de poloxámero 171 (por ejemplo, Genapol®), de modo que en la formulación terminada se obtenga una concentración de 10 µg/ml.

A continuación, se someten al ensayo de rotación 5 muestras de cada una de estas soluciones, y se determina la turbiedad después de diferentes intervalos de tiempo. Los resultados se muestran en la Tabla siguiente.

Descripción	Número de muestras de ensayo con turbiedad > 18 FNU después de					
	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h
HMR1964 sin aditivo	0	5	-	-	-	-
HMR1964 + 0,01 mg/ml de poloxámero 171	0	0	0	2	5	-

También la adición de poloxámero 171 retrasa claramente la aparición de la turbiedad y estabiliza la preparación.

Ejemplo 4: Estabilización de HMR1964 por la adición de polisorbato 20 o polisorbato 80 en el ensayo de agitación

- 5 a) En una solución acuosa que, en la formulación final contiene 3,15 mg/ml de m-cresol, 5 mg/ml de NaCl y 6 mg/ml de trometamol, se disuelve HMR1964 libre de cinc (calculada de forma que en la formulación terminada se alcance una concentración de 3,5 mg/ml), y se ajusta el valor de pH con ácido clorhídrico 1N/NaOH 1N a 7,2 - 7,4 (medido a temperatura ambiente). La solución se enrasa hasta el volumen final con agua y se filtra bajo condiciones estériles por medio de un filtro de 0,2 µm. Finalmente, se envasa en viales de inyección de 5 ml y se cierra con un tapón.
- 10 b) De manera idéntica, se prepara una solución de comparación, aunque antes de enrasarla con agua, se agrega una cantidad correspondiente a una solución madre al 0,1% de polisorbato 20 (Tween® 20), de modo que en la formulación terminada se obtenga una concentración de 10 µg/ml.
- c) Se prepara una solución de comparación de forma idéntica a la que se ha descrito en el apartado b), pero en esta ocasión se utiliza polisorbato 80 (Tween 80) en lugar de polisorbato 20.
- 15 Las muestras se agitan a 30°C en un agitador de laboratorio (60 rpm) y se mide la turbiedad de las muestras a determinados intervalos de tiempo. Los resultados se muestran en la Tabla siguiente.

Ensayo de agitación, Turbiedad (FNU) después de					
Adición	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Sin adición	0,55	2,04	4,86	6,12	10,51
0,01 mg/ml de Tween 20	1,75	2,60	2,44	2,44	3,80
0,01 mg/ml de Tween 80	2,38	2,98	2,86	3,01	4,14

La adición tanto de polisorbato 20 como de polisorbato 80 exhibe un efecto estabilizador sobre la HMR1964 en el ensayo de agitación.

20 **Ejemplo 5: Estabilización de HMR1964 por la adición de cinc o poloxámero (Genapol®) en el ensayo de agitación**

- 25 a) En una solución acuosa que, en la formulación final contiene 3,3 mg/ml de fenol, 5 mg/ml de NaCl y 6 mg/ml de trometamol, se disuelve HMR1964 libre de cinc (calculada de forma que en la formulación terminada alcance una concentración de 3,5 mg/ml), y se ajusta el valor de pH con ácido clorhídrico 1N/NaOH 1N a 7,2 - 7,4 (medido a temperatura ambiente). La solución se enrasa hasta el volumen final con agua y se filtra bajo condiciones estériles por medio de un filtro de 0,2 µm. Finalmente, se envasa en viales de inyección de 5 ml y se cierra con un tapón.
- b) De manera idéntica, se prepara una solución de comparación, aunque antes de enrasarla con agua, se agrega una cantidad correspondiente a una solución madre al 0,1% de poloxámero 171 (por ejemplo, Genapol®), de modo que en la formulación terminada se alcance un contenido de 10 µg/ml.
- 30 c) Se prepara una solución de comparación adicional de la forma descrita en a), aunque en lugar de poloxámero se agrega a la solución, antes de enrasarla con agua, una cantidad correspondiente a una solución madre de al 0,1%

de cloruro de cinc, de manera que en la formulación terminada se alcance una concentración de 15 µg/ml de cinc.

Adición	Ensayo de agitación, Turbiedad (FNU) después de				
	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Ninguna	0,39	0,70	4,46	8,74	14,11
0,01 mg/ml de poloxámero	0,36	0,57	0,52	1,59	0,89
0,015 mg/ml de Zn	1,02	0,68	0,70	0,56	0,86

Tanto la adición de cinc como la de poloxámero evitan la aparición de turbiedades en el ensayo de agitación.

Ejemplo 6: Estabilización de HMR1964 por la adición de poloxámero en el ensayo de rotación

- 5 a) En una solución acuosa que, en la formulación final contiene 3,3 mg/ml de fenol, 5 mg/ml de NaCl y 6 mg/ml de trometamol, se disuelve HMR1964 libre de cinc (calculada de forma que en la formulación terminada alcance una concentración de 3,5 mg/ml), y se ajusta el valor de pH con ácido clorhídrico 1N/NaOH 1N a 7,2 - 7,4 (medido a temperatura ambiente). La solución se enrasa hasta el volumen final con agua y se filtra bajo condiciones estériles por medio de un filtro de 0,2 µm. Finalmente, se envasa en viales de inyección de 5 ml y se cierra con un tapón.
- 10 b) De manera idéntica, se prepara una solución de comparación, aunque antes de enrasarla con agua, se agrega una cantidad correspondiente a una solución madre al 0,1% de poloxámero 171 (por ejemplo, Genapol®), de modo que en la formulación terminada se obtenga una concentración de 100 µg/ml.

A continuación, se someten al ensayo de rotación 5 muestras de cada una de estas soluciones, y se determina la turbiedad después de diferentes intervalos de tiempo. Los resultados se muestran en la Tabla siguiente.

Descripción	Número de muestras de ensayo con turbiedad > 18 FNU después de					
	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h
HMR1964 sin aditivo	0	5	-	-	-	-
HMR1964 + 0,10 mg/ml de poloxámero 171	0	0	0	0	1	5

- 15 También la adición de 100 µg/ml de poloxámero estabiliza de manera muy evidente la preparación de HMR1964.

REIVINDICACIONES

- 1.- Formulación farmacéutica acuosa que contiene insulina humana Lys(B3), Glu(B29);
un tensioactivo o combinaciones de múltiples tensioactivos, en donde el tensioactivo representa ésteres y éteres parciales y de ácidos grasos de alcoholes polivalentes, del glicerol y sorbitol,
5 en donde la formulación farmacéutica contiene menos de 0,2 por ciento en peso de cinc en relación con el contenido en insulina de la preparación.
- 2.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en donde los ésteres y éteres parciales y de ácidos grasos de alcoholes polivalentes, de glicerol y sorbitol se seleccionan de un grupo que contiene polisorbato.
- 10 3.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 2, en donde el polisorbato se selecciona de un grupo que contiene polisorbato 20 y polisorbato 80.
- 4.- Formulación farmacéutica según una de las reivindicaciones 1 a 3, que contiene un conservante seleccionado de un grupo que contiene fenol, cresol, cloro-cresol, alcohol bencílico, parabenos.
- 5.- Formulación farmacéutica según una de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene un agente isotónico seleccionado de un grupo que contiene manitol, sorbitol, lactosa, dextrosa, trehalosa, cloruro sódico, glicerol.
- 15 6.- Formulación farmacéutica según una de las reivindicaciones 1 a 5, que contiene un aditivo seleccionado de un grupo que contiene sustancias tamponantes tales como, por ejemplo, TRIS, fosfato, citrato, acetato, glicil-glicina u otras sustancias tales como ácidos, álcalis, sales, protamina, arginina.
- 7.- Formulación farmacéutica según una de las reivindicaciones anteriores, en la que la insulina humana Lys(B3), Glu(B29) está presente en una concentración de 60 - 6000 nmol/ml.
- 20 8.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 7, en la que la insulina humana Lys(B3), Glu(B29) está presente en una concentración de 240 - 3000 nmol/ml.
- 9.- Formulación farmacéutica según una de las reivindicaciones anteriores, en la que el tensioactivo está presente en una concentración de 0,1 -10000 µg/ml.
- 25 10.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 9, en la que el tensioactivo está presente en una concentración de 1 -1000 µg/ml.
- 11.- Formulación farmacéutica según una de las reivindicaciones anteriores, en la que el glicerol y/o manitol están presentes en una concentración de 100 - 250 mM.
- 12.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 11, en la que el cloruro está presente en una concentración de hasta 150 mM.
- 30 13.- Formulación farmacéutica según una de las reivindicaciones anteriores, en la que hay presente una sustancia tamponante en una concentración de 5 - 250 mM.
- 14.- Formulación farmacéutica según la reivindicación 1, que contiene:
3,15 mg/ml de cresol,
3,5 mg/ml de HMR1964,
35 6,0 mg/ml de trometamol,
5,0 mg/ml de NaCl, y
0,01 mg/ml de polisorbato 20.
- 15.- Procedimiento para preparar una formulación farmacéutica según una o varias de las reivindicaciones anteriores, en la que los componentes se agregan en forma de soluciones acuosas, seguidamente se ajusta al valor de pH deseado, y se enrasa con agua hasta el volumen final.
- 40