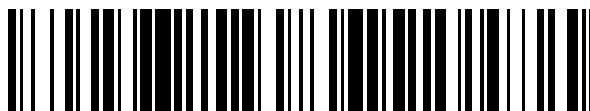


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 660**

51 Int. Cl.:
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04797450 .6**
96 Fecha de presentación: **12.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1684793**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54 Título: **COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE UN ANÁLOGO INSULINOTRÓPICO DE GLP-1 (7-37), INSULINA ASP(B28) Y UN TENSIÓACTIVO.**

30 Prioridad:
13.11.2003 DK 200301689

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.02.2012

73 Titular/es:
**NOVO NORDISK A/S
NOVO ALLÉ
2880 BAGSVÅRD, DK**

72 Inventor/es:
**KNUDSEN, Liselotte Bjerre;
HANSEN, Kristian Tage;
ENGELUND, Dorthe Kot;
LUDVIGSEN, Svend;
HANSEN, Lars;
BONDE, Claude;
JENSEN, Ejvind;
BOVING, Tine Elisabeth Gottschalk y
SCHLEIN, Morten**

74 Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

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).

ES 2 373 660 T3

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que comprende un análogo insulínico de GLP-1(7-37), insulina ASP(B28) y un tensioactivo

5

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de las composiciones farmacéuticas.

Más específicamente, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el péptido insulínico Arg³⁴, Lis²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1 (7-37), el análogo de insulina humana relacionado con la comida AspB28 y un tensioactivo.

10

Antecedentes de la invención

[0002] La diabetes *mellitus* es un trastorno metabólico en el que la capacidad para utilizar glucosa se pierde parcial o completamente. Sobre el 5% de todas las personas padecen diabetes y el trastorno se acerca a proporciones epidémicas. Desde la introducción de la insulina en los años 20, se han hecho esfuerzos continuos para mejorar el tratamiento de la diabetes *mellitus*. Ya que la gente que padece diabetes está sujeta a tratamiento crónico durante varias décadas, hay una necesidad importante de formulaciones de insulina seguras, convenientes y que mejoran la calidad de vida.

15

20

[0003] En el tratamiento de la diabetes *mellitus*, muchas variedades de formulaciones de insulina han sido usadas y sugeridas, como insulina regular, insulina isofánica (designada NPH), suspensiones de insulina zinc (como Semilenta®, Lenta®, y Ultralenta®) e insulina isofánica bifásica. Algunas de las formulaciones de insulina comerciales disponibles se caracterizan por el hecho de una aparición rápida de acción y otras formulaciones tienen una aparición relativamente lenta, pero muestran una acción más o menos prolongada. Las formulaciones de insulina de acción rápida son normalmente soluciones de insulina, mientras que las formulaciones de insulina de acción retardada pueden ser suspensiones con insulina de forma amorfa y/o cristalina precipitada sólo por adición de sales de zinc, o por adición de protamina, o por una combinación de ambas.

25

30

[0004] Normalmente, las formulaciones de insulina se administran por inyección subcutánea. Lo que es importante para el paciente es el perfil de acción de la formulación de insulina, que es la acción de la insulina en el metabolismo de la glucosa en función del tiempo de la inyección. En este perfil, entre otras cosas, el tiempo para la aparición, el valor máximo y la duración total de acción son importantes. Una variedad de formulaciones de insulina con perfiles de acción diferentes se desean y se solicitan por los pacientes.

35

[0005] La insulina humana consiste en dos cadenas de polipéptido, las cadenas denominadas A y B que contienen 21 y 30 residuos de aminoácidos, respectivamente. Las cadenas A y B se interconectan por dos puentes de disulfuro de cistina. La insulina de la mayoría de otras especies tiene una construcción similar, pero puede que no contenga los mismos residuos de aminoácidos en las mismas posiciones. En la última década, varios análogos de insulina humana han sido desarrollados. Se diseñan para perfiles particulares de acción, por ejemplo, acción rápida o prolongada.

40

[0006] Otro péptido previsto a hacerse muy importante en el tratamiento de la diabetes es el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1). El GLP-1 humano es un péptido de 37 residuos de aminoácidos procedentes del preproglucagón que es sintetizado i.a. en las células L en el íleon distal, en el páncreas y en el cerebro. GLP-1 es una hormona intestinal importante con función reguladora en el metabolismo de la glucosa y en la secreción gastrointestinal y en el metabolismo. GLP-1 estimula la secreción de insulina en una manera dependiente de glucosa, estimula la biosíntesis de insulina, promueve el rescate de célula beta, reduce la secreción de glucagón, el vaciado gástrico y la toma alimenticia.

45

Un sistema simple se utiliza para describir fragmentos y análogos de este péptido. Así, por ejemplo, Gli⁸-GLP-1(7-37) designa un análogo de GLP-1 (7-37) formalmente derivado de GLP-1 (7-37) por sustitución del residuo de aminoácido de origen natural en la posición 8 (Ala) por Gly. De forma similar, Lis³⁴(N^ε-tetradecanoil)-GLP-1(7-37) designa GLP-1 (7-37) en el que el residuo del grupo ε-amino del Lys en la posición 34 ha sido tetradecanoilado. Las publicaciones PCT WO 98/08871 y WO 99/43706 revelan derivados estables de análogos de GLP-1, que tienen un sustituyente lipofílico.

50

Estos derivados estables de análogos de GLP-1 tienen un perfil prolongado de acción en comparación con los correspondientes análogos de GLP-1.

55

[0007] A medida que la población con diabetes tipo 2 está aumentando rápidamente en el mundo, hay una necesidad mucho más grande de una administración más simple de fármacos más eficaces. Los efectos combinados de GLP-1 están previstos para dar una reducción muy eficaz y segura de la glucosa en sangre. No obstante, algunos pacientes se pueden beneficiar de una dosis pequeña de insulina extra con las comidas principales. Una formulación combinada que comprende un péptido de insulina y un péptido GLP-1, puede, con una proporción fija de los dos fármacos, ser un tratamiento muy eficaz al igual que uno que requiere menos inyecciones cuando se administra al mismo paciente. Debido a que sólo una dosis baja de insulina se da con la comida y el homólogo GLP-1 de la formulación controla la glucosa para el resto del día y de la noche, y ya que GLP-1 no conduce a hipoglicemia, esto puede también ser un tratamiento muy seguro.

60

65

[0008] Así, hay una gran necesidad de composiciones farmacéuticas estables que comprenden insulina relacionada con la comida y un péptido de GLP 1 en una formulación combinada.

Breve descripción de los dibujos

5

[0009]

Figura 1. Curvas de desaparición media que muestran la desaparición de insulina aspártica radiomarcada.

Figura 2. Niveles de plasma de liraglutida después de inyecciones subcutáneas de las mezclas (escala logarítmica).

10 Figura 3. Niveles de plasma de liraglutida después de inyecciones subcutáneas de las mezclas (escala lineal).

Figura 4. Mediciones turbidimétricas de dos composiciones farmacéuticas con aspártica y liraglutida.

Composición farmacéutica sin poloxámero 188 (X) y con poloxámero 188 (O) (500 ppm)

Figura 5. Mediciones turbidimétricas de dos composiciones farmacéuticas con aspártica y liraglutida.

Composición farmacéutica sin poloxámero 188 (X) y con poloxámero 188 (O) (50 ppm).

15 Figura 6. Todas las muestras contienen: 0,6 mM de insulina aspártica, 0,3 mM de Zn(Ac)₂, 1,2 mM de liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 10 mM de NaCl, pH 7,7.

Poloxámero 188 se añade a dos de las muestras.

Figura 7. Ambas muestras contienen 0,6 mM de insulina aspártica, 0,3 mM de Zn(Ac)₂, 1,2 mM de liraglutida, 40 mM de fenol, 14 mg/ml de propilenglicol, 10 mM de NaCl, pH 7,7.

20 Polisorbato 20 se añade a una muestra.

Figura 8. Todas las muestras contienen 0,6 mM de insulina aspártica, 0,3 mM de Zn(Ac)₂, 1,2 mM de liraglutida, 8 mM de fosfato sódico pH 7,7, 40 mM de fenol, 14 mg/ml de propilenglicol.

Poloxámero 188 se añade a dos muestras.

Figura 9. 0,6 mM de insulina aspártica, 0,3 mM de Zn(Ac)₂, 1,2 mM de liraglutida, 8 mM de fosfato de sodio, 40 mM de fenol, 14 mg/ml de propilenglicol, pH 7,7.

25

Polisorbato 20 se añade a dos de las muestras.

Resumen de la invención

30

[0010] Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica soluble para administración parenteral, que comprende el péptido insulínico Arg³⁴, Lis²⁶(N^E-(γ-Glu(N^Q-hexadecanoil)))-GLP-1 (7-37), el análogo de insulina humana relacionado con la comida Asp^{B28}, un tensioactivo, un conservante farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente de isotonicidad. En una forma de realización de la invención, el pH de dicha composición farmacéutica o de una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de sobre pH 7,0 a sobre pH 9,0.

35

[0011] En otra forma de realización de la invención, el pH de dicha composición farmacéutica o de una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de sobre pH 7,0 a sobre pH 8,0.

40

[0012] Otro objeto de la invención es proporcionar un método para el tratamiento de la hiperglicemia que comprende la administración parenteral de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica soluble que comprende el péptido insulínico, el péptido de insulina relacionada con la comida, un tensioactivo, un conservante farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente de isotonicidad.

Definiciones

45

[0013] Lo siguiente es una definición detallada de los términos usados en la especificación.

[0014] El término "cantidad eficaz", como se utiliza en este caso, significa una dosificación que es suficiente para que el tratamiento del paciente sea eficaz comparado sin tratamiento.

50

[0015] El término "medicamento", como se utiliza en este caso, significa una composición farmacéutica adecuada para la administración de los compuestos farmacéuticamente activos a un paciente.

[0016] El término "composición farmacéutica", como se utiliza en este caso, significa un producto que comprende un compuesto activo o una sal en la que junto con excipientes farmacéuticos, como un tampón, un conservante y un modificador de tonicidad, dicha composición farmacéutica es útil para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad o trastorno por medio de la administración de dicha composición farmacéutica a una persona.

Así, una composición farmacéutica es también conocida en la técnica como una formulación farmacéutica.

60

[0017] El término "composición farmacéutica soluble", como se utiliza en este caso, significa un péptido insulínico que es sustancialmente soluble y un péptido de insulina relacionada con la comida que es sustancialmente soluble en la composición combinada. Así, una composición farmacéutica soluble predisuelta será sustancialmente soluble, y una composición farmacéutica soluble que ha de ser reconstituida será sustancialmente soluble una vez haya sido disuelta en el líquido de reconstitución prescrito. Debe entenderse que el pH de una composición farmacéutica que ha de ser reconstituida es el valor de pH que se mide en la composición reconstituida producido por reconstitución en el líquido de reconstitución prescrito a temperatura ambiente.

65

- [0018] El término "farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en este caso, significa adecuado para aplicaciones farmacéuticas normales, es decir, que no aumenta los efectos adversos en pacientes, etc.
- 5 [0019] El término "tampón", como se utiliza en este caso, se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que reduce la tendencia del pH de la composición a cambiar con el tiempo, como ocurriría de otra manera debido a reacciones químicas. Tampones incluyen productos químicos tales como fosfato sódico, TRIS, glicina y citrato sódico.
- 10 [0020] El término "conservante", como se utiliza en este caso, se refiere a un compuesto químico que se añade a una composición farmacéutica para prevenir o retrasar la actividad microbiana (crecimiento y metabolismo). Ejemplos de conservantes farmacéuticamente aceptables son fenol, m-cresol y una mezcla de fenol y m-cresol.
- 15 [0021] El término "agente de isotonicidad", tal como se usa, se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que sirve para modificar la presión osmótica de la composición farmacéutica, de modo que la presión osmótica se acerca más a la del plasma humano. Agentes de isotonicidad incluyen NaCl, glicerol, manitol, etc.
- 20 [0022] El término "estabilizador", como se utiliza en este caso, se refiere a productos químicos añadidos a un péptido con composiciones farmacéuticas para estabilizar el péptido, es decir, para aumentar el tiempo de conservación y/o en el tiempo debido de tales composiciones. Ejemplos de estabilizadores usados en formulaciones farmacéuticas son L-glicina, L-histidina, arginina, glicol de polietileno y carboximetilcelulosa.
- 25 [0023] El término "tratamiento de una enfermedad", como se utiliza en este caso, significa la gestión y el cuidado de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, condición o trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, condición o trastorno. El tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, condición o trastorno, al igual que para aliviar los síntomas o complicaciones asociados a la enfermedad, condición o trastorno.
- 30 [0024] El término "prevención de una enfermedad", como se utiliza en este caso, se define como la gestión y el cuidado de un individuo con riesgo de desarrollar la enfermedad antes de la aparición clínica de la enfermedad. El propósito de la prevención es combatir el desarrollo de la enfermedad, condición o trastorno, e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir o retardar la aparición de los síntomas o complicaciones y para prevenir o retardar el desarrollo de enfermedades, condiciones o trastornos relacionados.
- 35 [0025] El término "péptido de insulina", como se utiliza en este caso, significa un péptido que es o bien insulina humana o una insulina humana modificada químicamente, como un análogo o un derivado.
- 40 [0026] El término "insulina humana", como se utiliza en este caso, significa la hormona humana cuya estructura y propiedades son conocidas. La insulina humana tiene dos cadenas de polipéptido que se conectan por puentes disulfuro entre residuos de cisteína, llamadas la cadena A y la cadena B. La cadena A es un péptido de 21 aminoácidos y la cadena B es un péptido de 30 aminoácidos, las dos cadenas se conectan por tres puentes disulfuro: uno, entre las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A; el segundo, entre la cisteína en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B; y, el tercero, entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B.
- 45 [0027] El término "análogo", como se utiliza en este caso en referencia a un péptido, se refiere a un péptido modificado en el que uno o más residuos de aminoácidos del péptido han sido sustituidos por otros residuos de aminoácidos y/o en el que uno o más residuos de aminoácidos han sido eliminados del péptido y/o en el que uno o más residuos de aminoácidos han sido añadidos al péptido. Esta adición o deleción de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el N-terminal del péptido y/o en el C-terminal del péptido.
- 50 [0028] El término "derivado", como se utiliza en este caso en relación a un péptido progenitor, significa una proteína progenitora modificada químicamente o un derivado análogo, en el que al menos un sustituyente no está presente en la proteína progenitora o en un derivado análogo, es decir, una proteína progenitora que ha sido modificada de manera covalente. Modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres, PEGilaciones y similares. Ejemplos de derivados de insulina humana son insulina humana metil treonina éster^{B30} e insulina humana N^{B29}-tetradecanoil-des(b30).
- 55 [0029] El término "péptido de insulina relacionado con la comida", como se utiliza en este caso, significa un péptido de insulina que tiene un tiempo de acción inferior a 8 horas en modelos estándar de diabetes. Preferiblemente, la insulina humana relacionada con la comida tiene un tiempo de acción inferior a sobre 5 horas. Preferiblemente, la insulina relacionada con la comida tiene un tiempo de acción en el intervalo de 0 horas a sobre 4 horas. Preferiblemente, la insulina relacionada con la comida tiene un tiempo de acción similar al observado para composiciones farmacéuticas comerciales de Actrapid®, Novolog®, y Humalog®. El término en relación al tiempo de acción de la insulina significa + o - 30 minutos. El término "compuesto de GLP-1", como se utiliza en este caso, significa GLP-1 (7-37) (SEQ ID nº 1),

derivado análogo insulínico y derivados insulínicos de éste. Ejemplos no limitativos de análogos de GLP-1 son GLP-1 (7-36) amida, Arg34 à-glp-1(7-37), Gli8 à-glp-1(7-37), Val8 à-GLP-1(7-36)-amida y Val8 àAsp22 à-glp-1(7-37). Ejemplos no limitativos de derivados de GLP-1 son desamino-His⁷, Arg²⁶, Lis³⁴(N-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1(7-37), desamino-His⁷, Arg²⁶, Lis³⁴(N^ε-octanol)-GLP-1 (7-37), Arg^{26,34}, Lis³⁸(N^ε-(ω-carboxipentadecanoil))-GLP-1 (7-38), Arg^{26,34}, Lis³⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1 (7-36) y Arg³⁴, Lis²⁶((N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1 (7-37). Este último es parte de la composición reivindicada.

[0030] El término "compuesto de GLP-1 estable", como se utiliza en este caso, significa un GLP-1 (7-37) modificado químicamente, es decir, un análogo o un derivado que muestra una vida media de eliminación de plasma de *in vivo* de al menos 10 horas en el hombre, como se determina por el siguiente método. El método para la determinación de la vida media de eliminación de plasma de un péptido en el hombre es: el compuesto es disuelto en un tampón isotónico, pH 7,4, PBS o cualquier otro tampón adecuado. La dosis se inyecta periféricamente, preferiblemente en el abdomen o en la parte superior del muslo. Muestras de sangre para la determinación de un compuesto activo se toman a intervalos frecuentes, y para una duración suficiente para cubrir la parte de eliminación terminal (p. ej. predosis, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24 (día 2), 36 (día 2), 48 (día 3), 60 (día 3), 72 (día 4) y 84 (día 4) horas después de la dosis). La determinación de la concentración de compuesto activo se realiza como se describe en Wilken et al., *Diabetologia* 43(51):A143, 2000. Parámetros farmacocinéticos derivados se calculan de los datos de tiempo de concentración para cada sujeto individual usando métodos no compartimentales, usando el software disponible comercialmente WinNonlin versión 2.1 (Pharsight, Cary, NC, EEUU). El índice de la constante de eliminación terminal se estima por regresión loglineal en la parte terminal loglineal de la curva de tiempo de concentración, y se usa para el cálculo de la vida media de eliminación.

[0031] El término "compuesto de GLP-1 protegido de dipeptidil aminopeptidasa IV", como se utiliza en este caso, significa un compuesto de GLP-1 que es más resistente a la dipeptidil aminopeptidasa IV de peptidasa de plasma (DPP-IV) que el agonista nativo GLP-1, GLP-1 (7-37). La resistencia de un compuesto de GLP-1 a la degradación por dipeptidil aminopeptidasa IV se determina por el siguiente ensayo de degradación:

Partes alícuotas del compuesto de GLP-1 (5 nmol) se incuban a 37 °C con 1 μL de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada correspondiente a una actividad enzimática de 5 mU durante 10-180 minutos en 100 μL de tampón de trietilamina-HCl 0,1 M, pH 7,4. Reacciones enzimáticas se terminan por la adición de 5 μL de ácido trifluoroacético 10%, y los productos de degradación peptídicos se separan y cuantifican usando análisis de HPLC. Un método para realizar este análisis es: las mezclas se aplican sobre una columna de poro ancho de Vydac C18 (30 nm poros, 5 μm partículas) de 250 x 4,6 mm y se eluyen a una velocidad de flujo de 1 ml/min con gradientes lineales graduales de acetonitrilo en ácido trifluoroacético 0,1% (acetonitrilo 0% durante 3 min, acetonitrilo 0-24% durante 17 min, acetonitrilo 24- 48% durante 1 min) según Siegel et al., Regul. Pept. 1999,79:93-102 y Mentlein et al. *Eur.J. Biochem.* 1993,214:829-35. Péptidos y su productos de degradación se pueden monitorear por su absorbencia a 220 nm (enlaces peptídicos) o 280 nm (aminoácidos aromáticos), y se cuantifican por integración de su áreas de valor máximo relacionados con aquellas de los estándares. El índice de hidrólisis de un compuesto de GLP-1 por dipeptidil aminopeptidasa IV se estima a tiempos de incubación que suponen menos que un 10% del compuesto de GLP-1 que es hidrolizado.

[0032] El término "insulínico", como se utiliza en este caso en referencia a un péptido o a un compuesto, significa la capacidad para estimular la secreción de insulina en respuesta a un nivel de glucosa en sangre aumentado. Péptidos y compuestos insulínicos son agonistas del receptor de GLP-1. La propiedad insulínica de un compuesto se puede determinar por ensayos *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica. El siguiente ensayo *in vitro* se puede utilizar para determinar la naturaleza insulínica de un compuesto, como un péptido. Preferiblemente, compuestos insulínicos muestran un valor EC₅₀ por debajo de ensayo inferior a 5 nM, incluso más preferiblemente valores EC₅₀ menores de 500 pM.

[0033] Células de riñón de cría de hámster (BHK) que expresan el receptor humano clonado GLP-1 (BHK 467-12A) se cultivan en medios DMEM con la adición de 100 IU/mL de penicilina, 100 μL/mL de estreptomocina, suero de ternero fetal 10% y 1 mg/mL de geneticina G-418 (Life Technologies). Membranas plasmáticas se preparan por homogenización en el tampón (10 mM de Tris-HCl, 30 mM de NaCl y 1 mM de ditiotretol, pH 7,4, con, además, 5 mg/mL de leupeptina (Sigma), 5 mg/L de pepstatina (Sigma), 100 mg/L de bacitracina (Sigma), y 16 mg/L de aprotinina (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA)). El homogeneizado fue centrifugado encima de una capa de sacarosa 41 % p/v. La banda blanca entre las dos capas fue diluida en el tampón y centrifugada. Las membranas plasmáticas se almacenaron a -80°C hasta su uso. El ensayo funcional del receptor se realiza por medición cAMP como respuesta a una estimulación por el péptido insulínico o compuesto insulínico. Las incubaciones se realizan en placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen total de 140 μL y con las siguientes concentraciones finales: 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EGTA, 1,5 mM de MgSO₄, 1,7 mM de ATP, 20 mM de GTP, 2 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), Tween-20 0,01% p/v, pH 7,4. Los compuestos se disuelven y se diluyen en el tampón. GTP se preparó fresco para cada experimento: 2,5 μg de membrana se añade a cada pocillo y la mezcla se incubaba durante 90 min a temperatura ambiente a oscuras con agitación. La reacción se detiene por la adición de 25 μL de HCl 0,5 M. El cAMP formado se mide por un ensayo de proximidad de centelleo (RPA 542, Amersham, Reino Unido). Una curva de respuesta a la dosis se traza para el compuesto y el valor EC₅₀ se calcula usando software prismático GraphPad.

[0034] El término "profármaco de un compuesto insulínico", como se utiliza en este caso, significa un compuesto modificado químicamente que después de la administración al paciente se convierte en un compuesto insulínico. Estos profármacos son típicamente versiones extendidas de aminoácidos o ésteres de un compuesto insulínico.

5 [0035] El término "compuesto exendin-4" como se utiliza en este caso se define como exendin-4(1-39) (SEC ID n.º. 2), fragmentos insulínicos de éste, derivados insulínicos de éste y análogos insulínicos de éste. Los fragmentos insulínicos de exendin-4 son péptidos insulínicos para los que la secuencia entera se puede encontrar en la secuencia de exendin-4 (SEC ID n.º. 2) y en los que al menos un aminoácido terminal ha sido eliminado. Ejemplos de fragmentos insulínicos de exendin-4(1-39) son exendin-4(1-38) y exendin-4(1-31). La propiedad insulínica de un compuesto se puede determinar por ensayos *in vivo* o *in vitro* bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un animal y controlar la concentración de insulina con el tiempo. Análogos insulínicos de exendin-4(1-39) se refieren a las moléculas respectivas en las que uno o más de los residuos de aminoácidos han sido intercambiados por otros residuos de aminoácidos y/o en las que uno o más residuos de aminoácidos han sido eliminados y/o en las que uno o más residuos de aminoácidos han sido añadidos con la condición de que dicho análogo o bien es insulínico o es un profármaco de un compuesto insulínico. Un ejemplo de un análogo insulínico de exendin-4(1-39) es Ser²Asp³-exendin-4(1-39) en el que los residuos de aminoácidos en la posición 2 y 3 han sido sustituidos con serina y ácido aspártico, respectivamente (este análogo concreto también se conoce en la técnica como exendin-3). Derivados insulínicos de exendin-4(1-39) y análogos de los éstos son los que el experto en la técnica considera como derivados de estos péptidos, es decir, tienen al menos un sustituyente que no está presente en la molécula de péptido progenitora con la condición de que dicho derivado o bien es insulínico o es un profármaco de un compuesto insulínico. Ejemplos de sustituyentes son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, ésteres y sustituyentes lipofílicos. Un ejemplo de un derivado insulínico de exendin-4(1-39) y análogos de éste es Tir³¹-exendin-4(1-31)-amida.

25 [0036] El término "compuesto estable de exendin-4", como se utiliza en este caso, significa un exendin-4(1-39) modificado químicamente, es decir, un análogo o un derivado que muestra una vida media de eliminación de plasma *in vivo* de al menos 10 horas en el hombre, como determina el método descrito bajo la definición de "componente de GLP-1 estable".

30 [0037] El término "compuesto de exidín-4 protegido de dipeptidil aminopeptidasa IV", como se utiliza en este caso, significa un compuesto de exendin-4 que es más resistente hacia la dipeptidil aminopeptidasa IV de peptidasa de plasma (DPP-IV) que exendin-4 (SEC ID n.º. 2), como determina el ensayo descrito bajo la definición de compuesto de GLP-1 protegido de dipeptidil aminopeptidasa IV.

35 [0038] El término "punto isoelectrico", como se utiliza en este caso, significa el valor de pH en el que la carga de red total de una macromolécula como un péptido es cero. En péptidos puede haber varios grupos cargados y al punto isoelectrico la suma de todas estas cargas es cero. A un pH sobre el punto isoelectrico, la carga de red total del péptido será negativa, mientras que a valores de pH por debajo del punto isoelectrico, la carga de red total del péptido será positiva.

40 [0039] El término "reconstituido", como se utiliza en este caso en referencia a una composición farmacéutica, significa una composición acuosa que ha sido formada por la adición de agua a un material sólido que comprende el ingrediente farmacéutico activo. Composiciones farmacéuticas para reconstitución son aplicadas donde no se puede producir una composición líquida con tiempo de conservación aceptable. Un ejemplo de una composición farmacéutica reconstituida es la solución que resulta de la adición de agua a una composición liofilizada. La solución es frecuentemente para administración parenteral y así agua para inyección se usa típicamente para reconstruir el material sólido.

50 [0040] El término "sobre", como se utiliza en este caso en relación a la concentración de un péptido en una composición farmacéutica, significa más o menos 10%. Por lo tanto, la concentración "sobre 5 mg/mL de insulina" significa una concentración de 4,5 mg/mL de insulina a 5,5 mg/mL de insulina.

Descripción de la invención

55 [0041] En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica para administración parenteral, que comprende el péptido insulínico Arg³⁴, Lis²⁶(Nε-(γ-Glu(Nα-hexadecanoil)))-GLP-1 (7-37), el análogo de insulina humana relacionado con la comida Asp^{B28}, un tensioactivo, un conservante farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente de isotonicidad.

En la forma de realización de la invención, el pH de dicha composición farmacéutica o de una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 7,0 a pH 9,0.

60 En la forma de realización de la invención, el pH de dicha composición farmacéutica o de una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 7,0 a pH 8,0.

En otra forma de realización de la invención, la composición es una solución.

En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica es un sólido.

65 En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica debe ser reconstituida con una solución acuosa como un tampón o agua para inyección.

- [0042] En una forma de realización, el tensioactivo es un poloxámero.
 En otra forma de realización, el tensioactivo es un poloxámero 188.
 En otra forma de realización, el tensioactivo es seleccionado del grupo que consiste en poloxámero 407, poloxámero 124, poloxámero 181, poloxámero 182, poloxámero 237, poloxámero 331 y poloxámero 338.
- 5 En otra forma de realización, el tensioactivo es seleccionado del grupo polisorbato 20 (Tween-20).
 En otra forma de realización, la concentración de dicho tensioactivo es de sobre 5 mg/L a sobre 3000 mg/L.
 En otra forma de realización, la concentración de dicho tensioactivo es de sobre 10 mg/L a sobre 500 mg/L.
 En otra forma de realización, la concentración de dicho tensioactivo es de sobre 20 mg/L a sobre 300 mg/L.
 En otra forma de realización, la concentración de dicho tensioactivo es de sobre 50 mg/L a sobre 200 mg/L.
- 10 En otra forma de realización, la composición farmacéutica comprende dos tensioactivos diferentes.
 En otra forma de realización, la composición farmacéutica comprende poloxámero 188 y polisorbato 20 (Tween-20).
 En otra forma de realización de la invención, el tensioactivo se selecciona de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitán, poloxámeros, como poloxámero 188 y poloxámero 407, ésteres de ácido graso de sorbitán de polioxietileno, derivados de polioxietileno, como derivados alcoxlados y alquilados (tweens, por ejemplo Tween-20, o Tween-80), monoglicéridos o derivados etoxilados de éstos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de éstos, glicerol, ácido cólico o derivados de éste, lecitinas, alcoholes y fosfolípidos, glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas, serina de fosfatidilo), gliceroglicolípidos (galactopiranosas), esfingofosfolípidos (esfingomielina), y esfingoglicolípidos (ceramidas; gangliósidos), DSS (docusato de sodio, registro del CAS nº [577-11-7]), docusato de calcio, registro del CAS nº [128-49-4]), docusato de potasio, registro del CAS nº [7491-09-0]), SDS (sulfato dodecil de sodio o lauril sulfato de sodio), ácido dipalmitoil fosfatídico, caprilato de sodio, ácidos biliares y sales derivadas y glicina o conjugados de taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, deoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-Hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos aniónicos monovalentes (alquil-aril-sulfonatos), palmitoil lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (p. ej. 1-acil-sn-glicero-3- ésteres de fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina), alquilo, alcoilo (éster alquílico), alcoxi (alquilo éter)- derivados de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo, lauroilo y derivados de miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, que es colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y el positivamente cargado DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, tensioactivos bipolares (p. ej., N-alquil-N propanosulfonatos de n-dimetilamonio-1-, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, dodecilsulfocolina, lisofosfatidilcolina de miristoilo, lisolecitina de huevo de gallina), tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternarias) (p. ej. cetil-trimetilamonio bromuro, cloruro de cetilpiridinio) tensioactivos no iónicos, óxido de polietileno/óxido de polipropileno copolímeros en bloque (Pluronic/Tetronic, Tritón X-100, dodecil β-D-glucopiranosido) o tensioactivos poliméricos (Tween-40; Tween-80 Brij-35), derivados de ácido fusídico (p. ej. tauro-dihidrofusidato de sodio, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales derivadas C6-C12 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, N^o-acilado derivados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, N^o-acilado derivados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutral o acídico, N^o-acilado derivado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutral y dos aminoácidos cargados, o el tensioactivo puede ser seleccionado del grupo de derivados de imidazolina, o mezclas derivadas. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.
- 40 En otra forma de realización de la invención, el tensioactivo es un polisorbato, como polisorbato-20. En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un tensioactivo en una concentración de sobre 1 ppm a sobre 500 ppm, preferiblemente de sobre 10 ppm a sobre 120 ppm.
- [0043] En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica es conveniente para administración por inyección o infusión. En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica es conveniente para administración subcutánea. En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica es conveniente para administración intramuscular. En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica es conveniente para administración intravenosa.
- 50 [0044] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica en la que el péptido de insulina relacionado con la comida tiene un tiempo de acción inferior a 4 horas.
- [0045] En otra forma de realización de la invención, la concentración de dicho péptido de insulina relacionada con la comida en dicha composición farmacéutica se sitúa en el intervalo de sobre 1,6 mg/mL a sobre 5,6 mg/mL, o de sobre 2,6 mg/mL a sobre 4,6 mg/mL, o de sobre 3,2 mg/mL a sobre 4,0 mg/mL, o de sobre 3,2 mg/mL a sobre 4,0 mg/mL. En otra forma de realización de la invención, la concentración de dicho péptido de insulina relacionada con la comida en dicha composición farmacéutica se sitúa en el intervalo de sobre 1 mg/mL a sobre 10 mg/mL, o de sobre 2,5 mg/mL a sobre 8,75 mg/mL, o de sobre 3,5 mg/mL a sobre 8,75 mg/mL, o de sobre 5 mg/mL a sobre 8,75 mg/mL.
- 60 [0046] En otra forma de realización de la invención, la concentración de dicho péptido insulínico en dicha composición farmacéutica es de sobre 1 mg/mL a sobre 25 mg/mL, de sobre 2 mg/mL a sobre 15 mg/mL, de sobre 5 mg/mL a sobre 12 mg/mL, o de sobre 8 mg/mL a sobre 11 mg/mL. En otra forma de realización de la invención, la concentración de dicho péptido insulínico en dicha composición farmacéutica es de sobre 5 mg/mL a sobre 7,5 mg/mL.
- 65

[0047] En otra forma de realización de la invención, la concentración de dicho péptido insulínico en dicha composición farmacéutica es de sobre 5 µg/ml a sobre 10 mg/mL, de sobre 5 µg/mL a sobre 5 mg/mL, de sobre 0,1 mg/mL a sobre 3 mg/mL, o de sobre 0,2 mg/mL a sobre 1 mg/mL.

5 [0048] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica en la que el punto isoeléctrico de dicho péptido insulínico es de 3,0 a 7,0, de 4,0 a 6,0, preferible de 4,2 a 5,5, incluso más preferible de 4,3 a 5,2.

10 [0049] En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende además zinc. En una forma de realización de la invención, la proporción molar de zinc a péptido de insulina es de 1/6 a 1/2 mol/mol, preferible de 3/12 a 5/12 mol/mol.

15 [0050] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, en la que dicho péptido de insulina relacionada con la comida es insulina humana y dicho péptido insulínico es Arg³⁴, Lis²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1 (7-37). En una forma de realización de la invención, la concentración de Arg³⁴, Lis²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) se sitúa en el intervalo de sobre 1 mg/mL a sobre 25 mg/mL y la concentración de insulina humana se sitúa en el intervalo de sobre 3,2 mg/mL a sobre 4,0 mg/mL. En otra forma de realización de la invención, la concentración de Arg³⁴, Lis²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1 (7-37) se sitúa en el intervalo de sobre 5 mg/mL a sobre 15 mg/mL y la concentración de insulina humana se sitúa en el intervalo de sobre 3,2 mg/mL a sobre 4,0 mg/mL.

20 [0051] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, en la que dicho péptido de insulina es insulina humana Asp^{B28} y dicho péptido insulínico es Arg³⁴, Lis²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37).

25 En una forma de realización de la invención, la concentración de Arg³⁴, Lis²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) se sitúa en el intervalo de sobre 1 mg/mL a sobre 25 mg/mL y la concentración de insulina humana Asp^{B28} se sitúa en el intervalo de sobre 3,2 mg/mL a sobre 4,0 mg/mL.

En otra forma de realización de la invención, la concentración de Arg³⁴, Lis²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1 (7-37) se sitúa en el intervalo de sobre 5 mg/mL a sobre 15 mg/mL y la concentración de insulina humana Asp^{B28} se sitúa en el intervalo de sobre 3,2 mg/mL a sobre 4,0 mg/mL.

30 En otra forma de realización de la invención, la concentración de Arg³⁴, Lis²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1 (7-37) se sitúa en el intervalo de sobre 1 mg/mL a sobre 25 mg/mL y la concentración de insulina humana Asp^{B28} se sitúa en el intervalo de sobre 3,4 mg/mL a sobre 3,8 mg/mL.

35 En otra forma de realización de la invención, la concentración de Arg³⁴, Lis²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) se sitúa en el intervalo de sobre 5 mg/mL a sobre 15 mg/mL y la concentración de insulina humana Asp^{B28} se sitúa en el intervalo de sobre 3,4 mg/mL a sobre 3,8 mg/mL.

[0052] En otra forma de realización de la presente invención, el conservante es fenol, m-cresol o una mezcla de éstos.

En otro aspecto de la presente invención, la composición farmacéutica comprende un tampón.

En una forma de realización de la invención, dicho tampón es fosfato, TRIS, HEPES, glicina, n-glicilglicina, citrato o mezclas de éstos.

40 En otro aspecto de la presente invención, la composición farmacéutica comprende un agente de isotonicidad.

En una forma de realización, el agente de isotonicidad no es una sal.

En otra forma de realización, el agente de isotonicidad se selecciona de manitol, sorbitol, glicerol, propilenglicol o una mezcla de éstos.

45 [0053] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica soluble para administración parenteral, que comprende el péptido insulínico, el péptido de insulina relacionada con la comida, un tensioactivo, un conservante farmacéuticamente aceptable, un estabilizador y opcionalmente un agente de isotonicidad. En una forma de realización de la invención dicho estabilizador es seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, imidazol y L-arginina. En otra forma de realización de la invención, dicho estabilizador es un polietilenglicol.

50 [0054] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica soluble que comprende el péptido insulínico, el péptido de insulina relacionada con la comida, un tensioactivo, un conservante farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente de isotonicidad.

55 [0055] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de la hiperglicemia que comprende administración parenteral de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, que comprende el péptido insulínico, el péptido de insulina relacionada con la comida, un tensioactivo, un conservante farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente de isotonicidad. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento del síndrome del atracón o la bulimia que comprende administración parenteral de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, que comprende el péptido insulínico, el péptido de insulina relacionada con la comida, un tensioactivo, un conservante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un agente de isotonicidad. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o la prevención

60 de diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía coronaria y otros trastornos cardiovasculares, derrame cerebral, enfermedad inflamatoria intestinal, dispepsia y úlceras gástricas que comprenden la administración parenteral de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, que comprende el péptido insulínico, el péptido de

insulina relacionada con la comida, un tensioactivo, un conservante farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente de isotonicidad. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para retardar o prevenir el progreso de la enfermedad en la diabetes tipo 2 que comprende la administración parenteral de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, que comprende el péptido insulínico, el péptido de insulina relacionada con la comida, un tensioactivo, un conservante farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente de isotonicidad.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para disminuir la toma de alimento, disminuir la apoptosis de las células β , aumentar la función de las células β y la masa de las células β , y/o para restaurar la sensibilidad de la glucosa a las células β que comprende la administración parenteral de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, que comprende el péptido insulínico, el péptido de insulina relacionada con la comida, un tensioactivo, un conservante farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente de isotonicidad. Cuando las composiciones farmacéuticas según la presente invención se administran por inyección, por ejemplo, por medio de una pluma o una jeringa, se administra típicamente 3 veces al día, preferiblemente antes de las comidas. Se prefiere que cada administración comprenda menos de sobre 500 μL , o menos de sobre 200 μL , ya que volúmenes de inyección mayores son desagradables para el paciente. Cuando las composiciones farmacéuticas según la presente invención se administran por una bomba, se administran típicamente de forma continua o discontinua por medio de al menos 10 administraciones o más al día. En una forma de realización de la invención, el método del tratamiento comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que es de sobre 30 $\mu\text{l/día}$ a sobre 600 $\mu\text{l/día}$, como de sobre 60 $\mu\text{l/día}$ a sobre 360 $\mu\text{l/día}$. En otra forma de realización de la invención, el método comprende una composición farmacéutica para administración por inyección subcutánea. En otra forma de realización de la invención, el método comprende una composición farmacéutica para administración por una bomba. En otra forma de realización de la invención, el método comprende administración por una bomba que entrega una cantidad discontinua de dicha composición farmacéutica. En otra forma de realización de la invención, el método comprende administración por una bomba que entrega una cantidad discontinua de dicha composición farmacéutica en la que dicha administración discontinua de dicha composición farmacéutica es por una dosificación por pulsos para un periodo temporal que es inferior al periodo entre pulsos.

[0056] En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del péptido insulínico y el péptido de insulina relacionada con la comida para la producción de una composición farmacéutica para administración parenteral, esta composición comprende el péptido insulínico, el péptido de insulina relacionada con la comida, un tensioactivo, un conservante farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente de isotonicidad. En una forma de realización de la invención, el uso comprende una composición farmacéutica para administración por inyección subcutánea. En otra forma de realización de la invención, el uso comprende una composición farmacéutica para administración por una bomba. En otra forma de realización de la invención, el uso comprende administración por una bomba que entrega una cantidad discontinua de dicha composición farmacéutica. En otra forma de realización de la invención, el uso comprende administración por una bomba que entrega una cantidad discontinua de dicha composición farmacéutica en la que dicha administración discontinua de dicha composición farmacéutica es por una dosificación por pulsos para un periodo temporal que es inferior al periodo entre pulsos.

[0057] En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del péptido insulínico y el péptido de insulina relacionada con la comida para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de hiperglicemia por administración parenteral, esta composición también comprende un tensioactivo, un tampón farmacéuticamente aceptable, un conservante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un agente de isotonicidad.

Ejemplos

Ejemplo 1. Datos de cerdo in vivo de mezclas

[0058] Dos mezclas de insulina asparta (insulina humana Asp^{B28}) y liraglutida (Arg³⁴Lis²⁶N^ε(γ -Glu(N^α-hexadecanoil)) GLP-1 (7-37)), con insulina asparta marcado en Tyr A14 con ¹²⁵I, se prepararon para administración subcutánea a cerdos. El diseño del estudio fue una medición simultánea de desaparición de insulina asparta del lugar de la inyección por cuenta de gamma externa y control del curso de tiempo de la concentración de plasma de liraglutida para hasta 72 horas.

Formulación de asparta (referencia)

[0059] 600 μM de asparta (con trazador), 300 μM de Zn(Ac)₂, pH 7,4, 30 mM de fenol, glicerol 1,6 %.

Formulación de mezcla de asparta:liraglutida, 1:1

[0060] 600 μM de asparta (con trazador), 600 μM de liraglutida, 300 μM de Zn(Ac)₂, pH 7,4, 30 mM de fenol, glicerol 1,6 %.

Formulación de mezcla de asparta:liraglutida, 1:5

[0061] 600 μM de asparta (con trazador), 3000 μM de liraglutida, 300 μM de Zn(Ac)₂, pH 7,4, 30 mM de fenol, glicerol 1,6 %.

[0062] Seis cerdos saludables y normales (Dansk Landrace, LDY) con una masa corporal de 80 kg a 100 kg se incluyeron en el estudio. A cada cerdo se le administró 100 µL de formulación de insulina asparta (referencia) a un lado del cuello y 100 µL de formulación de mezcla de asparta/liraglutida al lado opuesto. Cursos de desaparición de insulina asparta radiomarcada fueron medidos en ambos sitios de inyección en 6 cerdos para insulina asparta referencia y en 3 cerdos para cada mezcla 1:1 y 1:5. Simultáneamente, muestras de sangre se recogieron durante un periodo de 72 horas para controlar el curso del tiempo de concentración de plasma de liraglutida.

Curvas de desaparición media con desviaciones estándar

[0063] Las curvas de desaparición media se muestran en la figura 1. La desaparición frente a tiempo de insulina asparta del tejido subcutáneo después de la administración de la mezcla 1:5 fue un poco más lenta que para referencia y la mezcla 1:1. El punto de tiempo (SD) medio para 75%, 50% y 25% de la radioactividad restante después de la inyección, se calcularon, véase la tabla 1 de debajo.

Tabla 1. Resumen del estudio de desaparición

	Insulina asparta referencia (n=6)	Mezcla 1:1 (n=3)	Mezcla 1:5 (n=3)
T75% (h)	0,75 ± 0,05	0,79 ± 0,07	0,83 ± 0,03
T50% (h)	1,60 ± 0,11	1,70 ± 0,13	1,78 ± 0,05
T25% (h)	2,79 ± 0,26	2,96 ± 0,23	3,14 ± 0,18

Farmacocinéticas de liraglutida

[0064] Farmacocinéticas fueron calculadas en los datos de tiempo de concentración de plasma. Basado en AUC, se concluyó que la absorción de liraglutida fue independiente de la mezcla aplicada, ya que la formulación de liraglutida del 1:5 da lugar a un aumento de pliegue de 5 en AUC, así, confirma la relativa biodisponibilidad invariada de la liraglutida. Basada en los parámetros PK de arriba, una simulación se realizó que ilustra coadministración (con asparta) de 0,2 nmol/kg, liraglutida a horas de comer (desayuno, almuerzo y cena). Aprox. 0,2 nmol/kg de liraglutida a la hora de la comida proporciona una concentración plasmática de liraglutida satisfactoria que indica que 1:1 es la relación asparta:liraglutida más probable.

[0065] La figuras 2 y 3 muestran los niveles de plasma de liraglutida después de inyecciones subcutáneas de las mezclas anteriormente descritas.

Tabla 2 liraglutida PK parámetros n=3

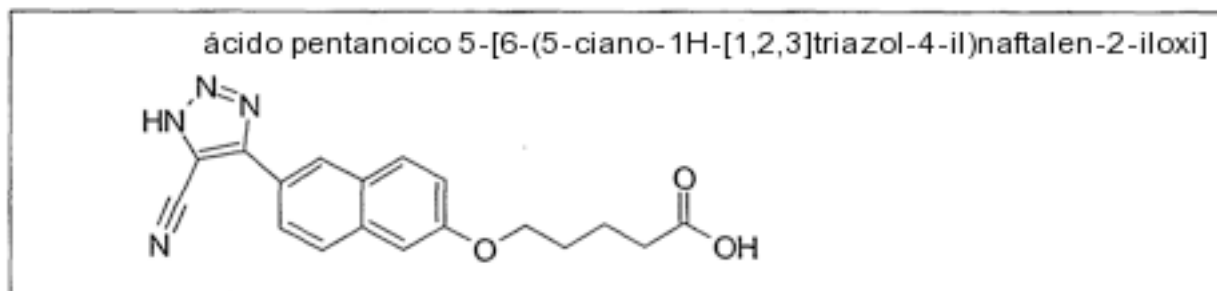
	t_{max} (hr)	C_{max} (pmol/L)	$t_{1/2}$ (hr)	AUC (hr*pmol/L)	Extr (%)
2) 1:1					
Media	12,0	2180	26,2	123488	18
SD	10,4	209	5,7	34562	6
Media armónica	8,0	2166	25,5	117918	17
3) 1:5					
Media	8,0	21187	19,2	665435	9
SD	4,0	8751	2,8	59264	3
Medio armónica	6,5	19230	18,9	661980	8

Ejemplo 2

[0066] Dos composiciones farmacéuticas fueron preparadas según la descripción de la presente invención. Ambas composiciones farmacéuticas comprendían la insulina relacionada con la comida insulina humana Asp^{B28} (asparta) y el péptido insulínico Arg³⁴, Lis²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1 (7-37) (liraglutida). En ambas composiciones farmacéuticas la concentración de asparta es 0,6 mM y la concentración de liraglutida es 1,2 mM. Además, ambas composiciones contenían 10 mM de NaCl, 8 mM de tampón de fosfato, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol. Mediciones turbidimétricas de composiciones sin poloxámero 188 (X) y con poloxámero 188 (O) (500 ppm) se muestran durante 8 y 7 días, respectivamente (Figura 4).

Ejemplo 3

[0067] Dos composiciones farmacéuticas fueron preparadas según la descripción de la presente invención. Ambas composiciones farmacéuticas comprendían la insulina relacionada con la comida insulina humana (asparta) Asp^{B28} y el péptido insulínico Arg³⁴, Lis²⁶(N^E-(γ-Glu(N^Q-hexadecanoil))-GLP-1 (7-37) (liraglutida). En ambas composiciones farmacéuticas la concentración de asparta es 0,6 mM y la concentración de liraglutida es 1,2 mM. Además, ambas composiciones contenían 0,35 mM de ácido pentanoico 5-[6-(5-Ciano-1H-[1,2,3]triazol-4-yl)naftalen-2-iloxi], 10 mM de tampón de bicina, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol. Mediciones turbidimétricas de composiciones farmacéuticas sin poloxámero 188 (X) y con poloxámero 188 (O) (50 ppm) se realizaron durante 13 días (Figura 5).

**Ejemplo 4**

[0068] Las siguientes composiciones farmacéuticas son preparadas:

F1. 1.2 mM de liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 3 Zn/hex, asparta 0,6 mM, 8 mM de bicina, 50 poloxámero de ppm 188, pH 7,7.

F2. 1.2 mM de liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 3 Zn/hex, asparta 0,6 mM, 8 mM de bicina, pH 7,7.

[0069] La estabilidad física de las composiciones farmacéuticas se evalúa mediante una prueba de resistencia acelerada. La prueba de resistencia se realiza como una prueba de rotación. 50μL de aire se añade a 5 cartuchos (ampollas de cristal) de cada formulación. Los cartuchos se rotan con una frecuencia de 30 rotaciones por minuto durante 4 horas al día. La prueba se detiene después de 22 días de rotación. La inspección de los cartuchos es seguida diario o según sea necesario. La turbidez de la formulación se caracteriza por la medición nefelométrica de la turbidez en un turbidímetro HACH 2100AN. La medición de turbidez de un líquido se especifica en "Unidades de Turbidez Nefelométricas" (NTU). La inestabilidad física de la proteína se caracteriza por mediciones de turbidez altas.

[0070] Los experimentos muestran que las mediciones NTU aumentan mucho más rápidamente en la composición F2 en comparación con el rastro NTU de la composición F1.

Ejemplo 5**Ensayo de fibrilación de tioflavina T (ThT): principio y ejemplos**

[0071] Estabilidad baja física de un péptido puede llevar a formación de fibrilla amiloide, que se observa como estructuras macromoleculares tipo hebra bien ordenadas en la muestra finalmente dan como resultado la formación de gel. Esto ha sido medido generalmente por inspección visual de la muestra. No obstante, este tipo de medición es muy subjetiva y depende de los observadores. Por lo tanto, la aplicación de una pequeña sonda indicadora de molécula es mucho más ventajosa. La tioflavina T (ThT) es una sonda y tiene una firma de fluorescencia diferente cuando se une a fibrillas [Naiki et al. (1989) *Anal. Biochem.* 177 249; LeVine (1999) *Methods. Enzymol.* 309, 274-284].

[0072] El curso de tiempo para la formación de fibrilla puede ser descrito por una curva sigmoide con la siguiente expresión [Nielsen et al. (2001) *Biochemistry* 40, 6036-6046]:

$$F = f_i + m_i t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-[(t-t_0)/\tau]}} \quad \text{Eq.(1)}$$

[0073] Aquí, F es la fluorescencia de ThT al tiempo t. La constante t₀ es el tiempo necesitado para alcanzar 50% de fluorescencia máxima. Los dos parámetros importantes que describen la formación de fibrilla son el tiempo de retardo calculado por t₀ - 2τ y la constante de índice aparente k_{app} = 1/τ.

5 [0074] La formación de un intermedio parcialmente plegado del péptido se sugiere como un mecanismo de inicio general para fibrilación. Unos pocos de esos productos intermedios forman núcleo para formar un molde sobre el que otros productos intermedios pueden montarse y proceder la fibrilación. El tiempo de retardo corresponde al intervalo en el que la masa crítica de núcleo se incrementa y la constante de índice aparente es el índice con el cual la fibrilla en sí misma es formada.

Preparación de la muestra

10 [0075] Se prepararon muestras frescas antes cada ensayo. Cada composición de muestra se describe en las leyendas. El pH de la muestra fue ajustado al valor deseado usando cantidades apropiadas de concentrado de NaOH y HClO₄. Tioflavina T se añadió a las muestras de una solución madre en H₂O a una concentración final de 1 µM.

15 [0076] Partes alícuotas de muestra de 200 µl fueron colocadas en una placa de 96 pocillos de microtitulación (Packard Opti-Plate™-96, poliestireno blanco). Normalmente, ocho réplicas de cada muestra (correspondiente a una condición de prueba) se colocaron en una columna de pocillos. La placa fue sellada con Scotch Pad (Qiagen).

Incubación y medición de fluorescencia

20 [0077] Incubación a temperatura dada, agitación y medición de la emisión de fluorescencia de ThT se hicieron en un lector de placas de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystems). La temperatura se ajustó a 37°C. La agitación orbital fue ajustada a 960 r.p.m. Con una amplitud de 1 mm en todos los datos presentados. La medición de fluorescencia se hizo por medio de excitación a través de un filtro 444 nm y medición de emisión a través de un filtro 485 nm.

25 [0078] Cada serie se inició por incubación de la placa a la temperatura de ensayo durante 10 min. La placa se midió cada 20 minutos para típicamente 45 horas. Entre cada medición, la placa fue agitada y calentada como se describe.

Manipulación de datos

30 [0079] Los puntos de medición se guardaron en formato Microsoft Excel para además procesar y dibujar la curva, y el ajuste se realizó usando GraphPad Prism. La emisión de fondo de ThT en ausencia de fibrillas fue insignificante. Los puntos de datos son típicamente una media de ocho muestras y se muestran con barras de error de desviación típica. Sólo datos obtenidos en el mismo experimento (es decir, muestras en la misma placa) se presentan en el mismo gráfico que asegura una medida relativa de fibrilación entre experimentos.

35 [0080] El conjunto de datos se puede ajustar a Eq. (1). No obstante, ya que curvas sigmoidales completas en este caso no se consiguen siempre durante el tiempo de medición, el grado de fibrilación se expresa como fluorescencia de ThT tabulada como la media de las ocho muestras y se muestra con la desviación típica a varios puntos de tiempo.

40 Ejemplo 6

[0081] Una formulación de insulina asparta y liraglutida en una proporción de mezcla 1:2 en el agua ajustada a pH 7,7 es altamente inestable físicamente como se ha visto en la figura 6. La señal de fluorescencia de ThT aumenta instantáneamente y alcanza una meseta antes 10 horas de tiempo de ensayo. No obstante, la adición de poloxámero 188 estabiliza esta formulación. A poloxámero 188 ambos de 50 ppm y de 200 ppm, la formulación de la mezcla de insulina asparta - liraglutida no muestra ningún aumento en la fluorescencia de ThT sobre niveles de fondo, por lo tanto, estas muestras son completamente estables físicamente y no fibrilan.

50 Ejemplo 7

[0082] También el polisorbato 20 es capaz de estabilizar una mezcla de insulina asparta - liraglutida 1:2 formulada en agua, ver figura 7. La presencia de polisorbato 20 de 200 ppm suprime completamente la fibrilación.

55 Ejemplo 8

[0083] Cuando se formula la mezcla con proporción 1:2 de insulina asparta y liraglutida en el tampón de fosfato sódico, la muestra es altamente inestable físicamente, ver figura 8. La presencia de poloxámero 188 de 50 ppm o de 200 ppm prolonga el tiempo de retardo antes del comienzo de la fibrilación: desde la fibrilación instantánea en ausencia de poloxámero 188, es más de 15 horas en presencia de poloxámero o bien de 50 ppm o de 200 ppm. La muestra con la concentración más alta de poloxámero 188 muestra la señal de ThT más baja después de 40 horas de tiempo de ensayo.

60 Ejemplo 9

65 [0084] El polisorbato 20 también estabiliza la mezclas 1:2 de insulina asparta - liraglutida formuladas en el tampón de fosfato sódico, ver figura 9. La presencia de polisorbato 20 de 100 ppm aumenta el tiempo de retardo más de 5 horas

en comparación con la muestra sin polisorbato 20. La presencia de polisorbato 20 de 200 ppm suprime completamente la fibrilación de la muestra.

Ejemplo 10

5 [0085] Formulaciones en las que insulina asparta y liraglutida se mezclan en una proporción 1:5 son también altamente inestables físicamente. Estas formulaciones se estabilizan por la presencia de poloxámero 188 de 100 ppm o de polisorbato 20 de 200 ppm. Esto se observa como una prolongación del tiempo de retardo antes del comienzo de la fibrilación en presencia de o bien poloxámero 188 o polisorbato 20 comparado con una formulación similar sin poloxámero 188 o polisorbato 20.

Listado de secuencias

15 [0086]
 <110> Novo Nordisk A/S
 <120> Composición farmacéutica con insulina y péptido insulínico
 20 <130> 6618
 <160> 3
 <170> Versión de patentIn 3.1
 25 <210> 1
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 1
 <210> 2
 <211> 39
 35 <212> PRT
 <213> Glia monster
 <220>
 <221> MOD_RES
 40 <222> (39) .. (39)
 <223> La serina en la posición 39 es amidada
 <400> 2
 45 <210> 3
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Constructo sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (44) .. (44)
 <223> La lisina en la posición 44 es amidada
 <400> 3
 60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica soluble para administración parenteral, comprendiendo un péptido insulínico, un péptido de insulina relacionada con la comida, un conservante farmacéuticamente aceptable, un tensioactivo y opcionalmente un agente de isotonicidad, caracterizada por el hecho de que el péptido insulínico es Arg³⁴, Lis²⁶ (N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) y caracterizada por el hecho de que el péptido de insulina relacionada con la comida es insulina humana Asp^{B28}.
- 10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por el hecho de que el pH de dicha composición farmacéutica o de una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 7,0 a pH 9,0.
- 15 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por el hecho de que el pH de dicha composición farmacéutica o de una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 7,0 a pH 8,0.
4. Composición farmacéutica según todas las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el hecho de que la concentración de dicho péptido de insulina relacionada con la comida se sitúa en el intervalo de 1,6 mg/mL a 5,6 mg/mL,
- 20 5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por el hecho de que la concentración de dicho péptido de insulina relacionada con la comida se sitúa en el intervalo de 1 mg/mL a 10 mg/mL.
6. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el hecho de que la concentración de dicho péptido insulínico es de 1 mg/mL a 25 mg/mL.
- 25 7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por el hecho de que la concentración de dicho péptido insulínico es de 5 µg/mL a 10 mg/mL.
- 30 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por el hecho de que la concentración de Arg³⁴, Lis²⁶ (N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) se sitúa en el intervalo de 5 mg/mL a 15 mg/mL y la concentración de insulina humana Asp^{B28} se sitúa en el intervalo de 3,2 mg/mL a 4,0 mg/mL.
9. Composición farmacéutica según todas las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el hecho de que dicho tensioactivo es un poloxámero.
- 35 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, caracterizada por el hecho de que dicho tensioactivo es un poloxámero 188.
11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, caracterizada por el hecho de que la concentración de dicho tensioactivo es de 5 mg/L a 3000 mg/L.
- 40 12. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, caracterizada por el hecho de que la concentración de dicho tensioactivo es de 10 mg/L a 500 mg/L.
- 45 13. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, caracterizada por el hecho de que la concentración de dicho tensioactivo es de 20 mg/L a 300 mg/L.
14. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, caracterizada por el hecho de que la concentración de dicho tensioactivo es de 50 mg/L a 200 mg/L.
- 50 15. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, comprendiendo dos tensioactivos diferentes.
16. Composición farmacéutica según la reivindicación 16, comprendiendo poloxámero 188 y polisorbato 20 (Tween-20).

Figura 1

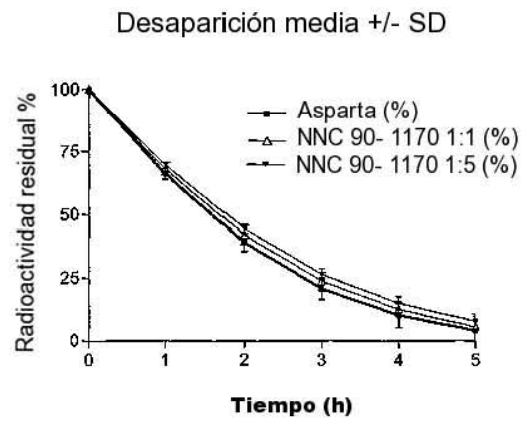


Figura 2

**Insulina asparta:liraglutida
1:1 y 1:5**

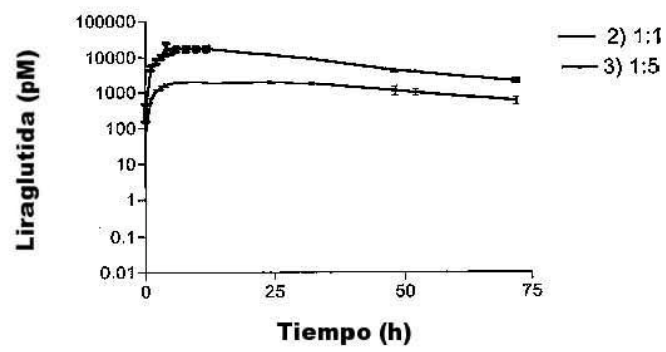


Figura 3

**Insulina asparta:liraglutida
1:1 y 1:5**

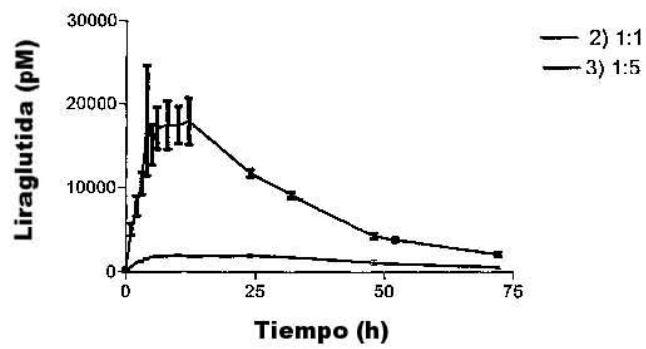


Figura 4

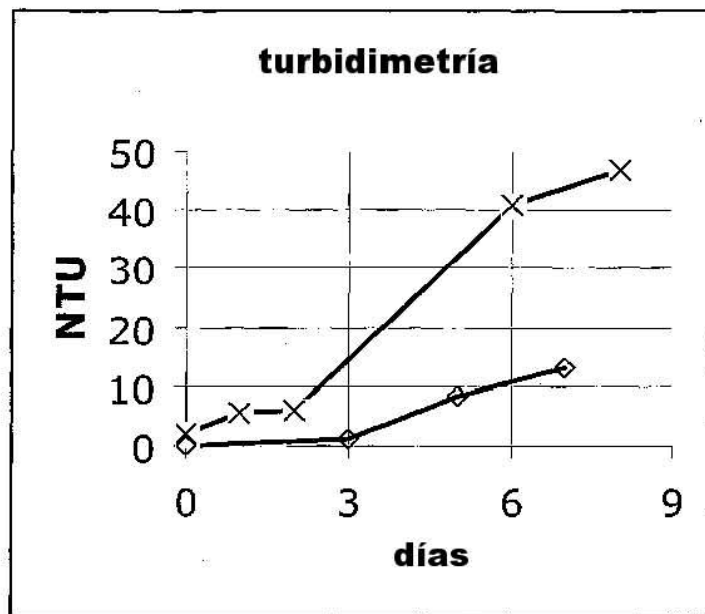


Figura 5

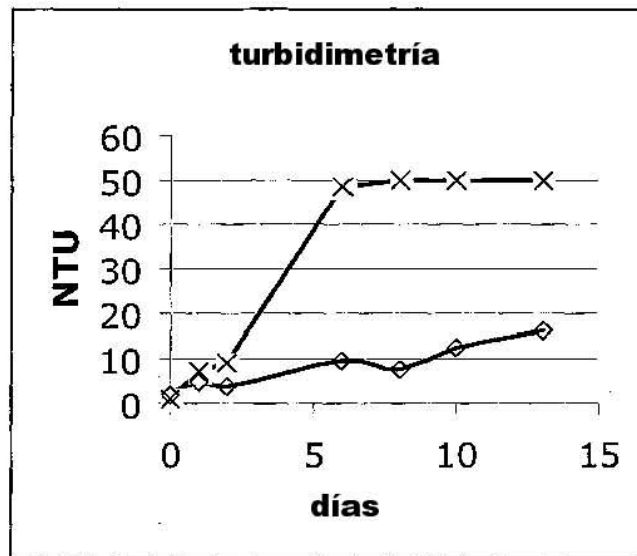


Figura 6

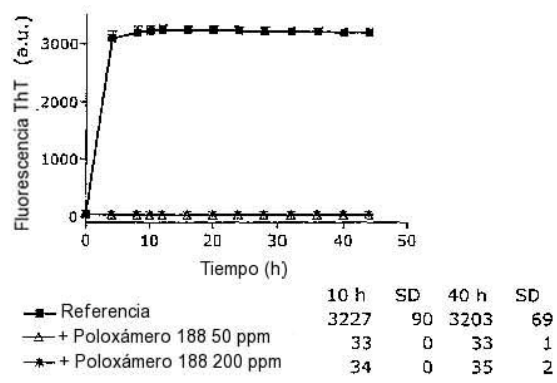


Figura 7

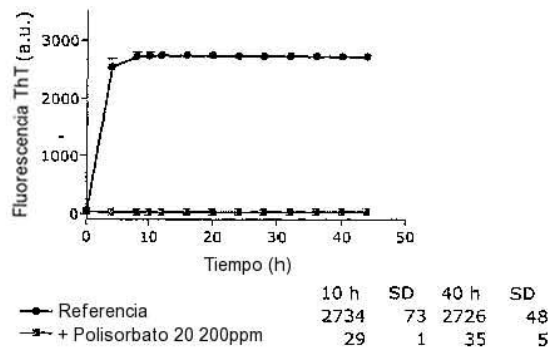
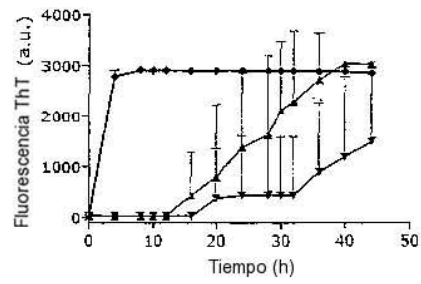


Figura 8



	10 h	SD	30 h	SD	40 h	SD
Referencia	2909	74	2900	71	2880	92
+ Poloxámero 188 50ppm	30	0	2118	1365	3038	66
+ Poloxámero 188 200 ppm	30	0	439	1155	1185	1594

Figura 9

