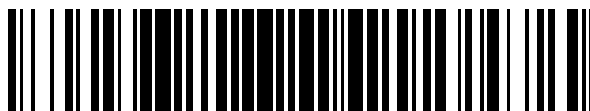


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 776**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/28** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05825231 .3**  
96 Fecha de presentación: **21.11.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1817049**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.08.2007**

54 Título: **Formulaciones solubles, estables conteniendo insulina con una sal de protamina**

30 Prioridad:  
**22.11.2004 DK 200401807**  
**08.06.2005 EP 05104998**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.11.2012**

73 Titular/es:  
**NOVO NORDISK A/S (100.0%)**  
**CORPORATE PATENTS NOVO ALLE P.O. BOX**  
**3000**  
**DK-2880 BAGSVAERD, DK**

72 Inventor/es:  
**OLSEN, HELLE, BIRK;**  
**KAARSHOLM, NIELS, CHRISTIAN y**  
**BALSCHMIDT, PER**

74 Agente/Representante:  
**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 391 776 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Formulaciones solubles, estables conteniendo insulina con una sal de protamina.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden insulina y una sal de protamina, a métodos de preparación de tales formulaciones, y a usos de tales formulaciones en el tratamiento de enfermedades y condiciones para las que se indica el uso de la insulina contenida en tales formulaciones. La presente invención además se refiere a métodos para aumentar la estabilidad y/o solubilidad de insulina en formulaciones con insulina a un pH inferior a 7,0 añadiendo una sal de protamina a las formulaciones conteniendo insulina.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Diabetes mellitus es un trastorno metabólico en el que la capacidad para utilizar glucosa es más o menos completamente perdida. Aproximadamente el 2% de todas las personas sufren de diabetes.

[0003] Desde el descubrimiento de la insulina en los años 20, se han hecho progresos continuos para mejorar el tratamiento de la diabetes mellitus. Para ayudar a evitar niveles de glucosa extremos, pacientes diabéticos practican frecuentemente la terapia de sustitución de insulina, por la cual se administra insulina por inyección.

[0004] En el tratamiento de la diabetes mellitus, muchas variedades de composiciones de insulina han sido usadas y sugeridas, incluyendo insulina regular, insulina Semilente®, insulina isófana, suspensiones de insulina-cinc, insulina de cinc protamínica, e insulina Ultralente®. Como los pacientes diabéticos se tratan típicamente con insulina durante varias décadas, hay una mayor necesidad de composiciones de insulina de mejora de calidad de vida y segura. Algunas de las composiciones de insulina disponibles comercialmente se caracterizan por el hecho de una aparición rápida de acción, mientras otras composiciones tienen una aparición relativamente lenta pero muestran una acción más o menos prolongada. Composiciones de insulina de actuación rápida son normalmente soluciones de insulina, mientras que composiciones de insulina de acción retardada pueden ser suspensiones con insulina en forma amorfa y/o cristalina precipitada por adición de sales de zinc solas o por adición de protamina o por una combinación de ambas. Además, algunos pacientes usan composiciones tanto con una aparición rápida de acción como con una acción más prolongada. Tal composición puede ser una solución de insulina donde cristales de insulina protamínica son suspendidos. Algunos pacientes preparan la composición final ellos mismos mediante la mezcla de una solución de insulina con una composición de suspensión en la proporción deseada.

[0005] Insulina humana consiste en dos cadenas de polipéptido, las denominadas cadenas 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 y un tercer puente de disulfuro es intra cadena A. Insulina de la mayoría de otras especies tiene una construcción similar, pero puede no contener los mismos residuos de aminoácidos en posiciones correspondientes.

[0006] El desarrollo de ingeniería genética ha hecho posible preparar fácilmente una gran variedad de compuestos de insulina análogos a insulina humana. En estos análogos de insulina, uno o más de los residuos de aminoácidos han sido sustituidos con otros residuos de aminoácidos que se pueden codificar por las secuencias de nucleótidos. Dado que insulina humana, como explicado anteriormente, contiene 51 residuos de aminoácidos, es obvio que un gran número de análogos de insulina es posible, y una gran variedad de análogos con propiedades interesantes ha sido preparada. En soluciones de insulina humana con una concentración de interés para composiciones inyectables, la molécula de insulina está presente en la forma asociada como un hexámero (Brange et al. Diabetes Care 13; (1990), 923 - 954). Después de inyección subcutánea, se cree que el índice de absorción por el flujo sanguíneo depende del tamaño de la molécula, y se ha descubierto que análogos de insulina con sustituciones de residuos de aminoácidos que contrarrestan o inhiben esta formación de hexámero tienen una aparición inusualmente rápida de acción (Brange et al.: Ibid). Esto puede ser de gran valor terapéutico para el paciente diabético.

[0007] Una encuesta general de composiciones farmacéuticas conteniendo insulina se da por Brange et al. en Galenics of Insulin, Springer-Verlag (Berlín, 1987).

[0008] Scott y Fisher (1936) revelan suspensiones de insulina con 1mM de sulfato de protamina y 0,15 mM de insulina a pH 7,2.

[0009] Composiciones farmacéuticas que se basan en análogos de insulina humana por ejemplo han sido presentadas por Heinemann et al., Lutterman et al. y Wiefels et al. en el simposio internacional "Frontiers in Insulin Pharmacology" en Hamburgo, 1992.

[0010] US 5 474 978 (Eli Lilly) divulga una formulación parenteral de rápida actuación que comprende un complejo de hexámero de análogos de insulina humana que consiste en seis análogos de insulina monoméricos, iones de zinc y al menos tres moléculas de un derivado fenólico.

5 [0011] Normalmente, composiciones de insulina se administran por inyección subcutánea. Lo que es importante para el paciente es el perfil de acción de la composición de insulina, es decir la acción de insulina en el metabolismo de glucosa como función del tiempo desde la inyección, incluyendo el tiempo para la aparición de acción de insulina, el valor máximo y la duración total de acción. Una variedad de composiciones de insulina con perfiles diferentes de acción es requerida por los pacientes. Un paciente individual puede así en el mismo día usar composiciones de insulina con perfiles muy diferentes de acción. El perfil de acción requerido por cualquier paciente dado en cualquier tiempo dado depende de diferentes factores, por ejemplo la hora del día y la cantidad y composición de cualquier comida ingerida por el paciente.

10 [0012] También es importante para el paciente la estabilidad química de las composiciones de insulina, especialmente debido al uso abundante de dispositivos de inyección con forma de pluma tales como los dispositivos que contienen cartuchos Penfill®, en los que una composición de insulina se almacena hasta que el cartucho entero está vacío. Este puede durar 1 a 2 semanas o más para dispositivos con un cartucho de 1,5 o 3,0 ml. Durante almacenamiento, ocurren cambios químicos covalentes en la estructura de insulina. Esto puede conducir a la formación de moléculas que son menos activas y potencialmente inmunogénicas tal como productos de desamidación y productos de transformación de peso molecular más alto (dímeros, polímeros, etc.). Un estudio comprensivo en la estabilidad química de insulina se da por Jens Brange en "Stability of Insulin", Kluwer Academic Publishers, 1994.

20 [0013] Composiciones que comprenden insulina y análogos de insulina son generalmente formulados usando varios aditivos, por ejemplo fosfato sódico (tampón),  $Zn^{2+}$ , (estabilizador) fenol/m-cresol (conservante y estabilizador), cloruro de sodio (agente de isotonicidad y estabilizador), y glicerol/manitol (agentes de isotonicidad).

25 [0014] La vida útil de productos de insulina está principalmente comprometida por la formación de agregados solubles (dímeros y polímeros) a través del tiempo, a pesar del hecho de que insulina es típicamente almacenada a una temperatura baja de no más de aproximadamente 5°C, lo que mejora la vida útil considerablemente en comparación con el almacenamiento por ejemplo a temperatura ambiente. Además, productos de insulina están sujetos a la formación de agregados insolubles (fibrillas) como resultado de agitación, por ejemplo cuando se llevan en el bolsillo de un paciente o durante el transporte. Es esencial para la calidad de un producto de insulina que la tendencia para formar tales agregados insolubles y solubles como resultado de influencias físicas o químicas se reduzca a un mínimo absoluto.

30 [0015] Acta Pharmaceutica Nordica 4(4), 1992, págs. 149-158 divulga composiciones de insulina con una concentración de cloruro sódico en el intervalo de 0 a 250 mM. La mayor parte de las composiciones, incluyendo aquellas que adicionalmente comprenden glicerol, contienen una cantidad bastante alta de cloruro sódico, es decir 0,7%, correspondiendo aproximadamente a una concentración de 120 mM.

35 [0016] La Patente US n°. 5, 66, 38 (Novo Nordisk) divulga composiciones de insulina con estabilidad química mejorada, las composiciones comprendiendo insulina humana o un análogo o derivado de ello, glicerol y/o manitol y 5-100 mM de un halogenuro, por ejemplo cloruro sódico.

40 [0017] La Patente US n°. 6, 174, 56 (Novo Nordisk) divulga composiciones estabilizadas acuosas que comprenden insulina humana o un análogo o derivado de ello, un tampón seleccionado de glicil-glicina, citrato o TRIS e iones metálicos, en particular, calcio o iones de magnesio.

45 [0018] La Patente US n°. 6, 51, 62 (Novo Nordisk) divulga agregados solubles en agua de actuación prolongada de derivados de insulina humana.

[0019] La Patente US n°. 6, 51, 92 (Eli Lilly) divulga formulaciones de análogos monoméricos de insulina estabilizadas contra la agregación en las que el agente tampón es bien TRIS o arginina.

50 [0020] La Patente US n°. 5, 47, 42 (Eli Lilly) divulga formulaciones farmacéuticas parenterales que comprenden un análogo monomérico de insulina, zinc, protamina y un derivado fenólico.

55 [0021] La Patente US n°. 6, 65, 26 (Eli Lilly) divulga composiciones insolubles que comprenden un análogo de insulina acilada o insulina acialtada complejoado con zinc, protamina y un compuesto fenólico de manera que el microcristal resultante es análogo a la forma de cristal de insulina de protamina neutral Hagedorn (NPH).

#### Resumen de la invención

60 [0022] La presente solicitud divulga que formulaciones con determinadas sales de protamina a concentraciones determinadas permiten preparaciones estables solubles de insulina para ser formuladas a pHs debajo de 7,0. Las presentes formulaciones son también físicamente y químicamente estables a un pH debajo de 7,0 y muestran un perfil prolongado de acción así volviéndose adecuadas y estables en almacenamiento para medios de administración invasiva (p. ej. inyección, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o infusión) así como no invasiva (p. ej. nasal, oral, pulmonar, transdérmica o transmucosa por ejemplo bucal).

65 [0023] La presente invención por lo tanto se refiere a una fórmula farmacéutica con un contenido más alto de insulina

disuelta que comprende insulina humana y acetato de protamina y donde la concentración del acetato de protamina es mayor de 0,25mM y donde dicha formulación tiene un pH de 4,5 a 6,0.

5 [0024] Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden contener además al menos uno de los siguientes componentes: un conservante, un ión de metal bivalente tal como cobalto de zinc, magnesio o calcio o combinaciones de estos iones, un agente de isotonicidad, un tampón y un tensioactivo.

10 [0025] Las formulaciones se administran en una cantidad eficaz para combatir la enfermedad, condición, o trastorno para los cuales se indica la administración del péptido de insulina contenido en la formulación y se usan en el tratamiento de diabetes tipo 1 y tipo 2.

[0026] La estabilidad física y química de la formulación conteniendo insulina, se obtiene añadiendo sal de protamina a una concentración de al menos 0,25 mM.

15 [0027] Un método para preparar formulaciones de la invención comprende:  
 a) preparar una solución disolviendo un ión metálico bivalente en agua o tampón;  
 b) preparar una solución disolviendo el conservante en agua o tampón;  
 c) preparar una solución disolviendo el agente de isotonicidad en agua o tampón;  
 d) preparar una solución disolviendo el tensioactivo en agua o tampón;  
 20 e) preparar una solución disolviendo la insulina, análogo de insulina, derivado de insulina o una mezcla de los anteriores en agua o tampón;  
 f) preparar una solución disolviendo una sal de protamina en tampón o agua;  
 g) mezclar la solución e) y una o más de las soluciones a), b), c), y d);  
 h) mezclar la solución g) con la solución f); y  
 25 i) ajustar el pH de la mezcla en h) hasta el pH deseado inferior a 7,0.

Breve descripción de las figuras

30 [0028]  
 Las Figuras 1 A y 1B muestran el aumento en el contenido (en el porcentaje de contenido de insulina total) de productos de desamidación (B3Asp, B3isoAsp, A21Asp) y productos hidrofóbicos (principalmente agregados covalentes) después de 14 días a 37°C a varios pHs en comparación con el inicio para preparaciones de insulina sin acetato de protamina (Figura 1A; 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, pH=3,5, 4,7 y 7,4) y con acetato de protamina (Figura 1B; 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 1,6mM de acetato de protamina, pH=5,0 y pH=5,5)  
 35 Las Figuras 2 A-C muestran los efectos de diferentes concentraciones de sal de protamina y zinc en la dependencia de pH de solubilidad de insulina en las preparaciones de insulina humana, donde en las tres figuras (es decir figuras 2A-2C), la referencia de insulina humana es 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol.  
 40 La Figura 2A muestra la dependencia de pH de preparaciones de insulina humana con 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol y bien 0,7mM de sulfato de protamina o 0,7; 1,2; 1,6 o 2,0mM de acetato de protamina;  
 La Figura 2B muestra la dependencia de pH de preparaciones de insulina humana con 0,6mM de insulina humana, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 1,2mM de acetato de protamina, y 0,3; 0,4 o 0,6mM de Zn<sup>2+</sup>; y  
 45 La Figura 2C muestra la dependencia de pH de preparaciones de 0,6mM de insulina humana, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 2,0mM de acetato de protamina, y 0,0; 0,2; 0,4 y 0,6mM de Zn<sup>2+</sup>.  
 La Figura 3 muestra el cambio en el nivel de glucosa en el plasma (% de línea base) (media +/-SEM de N cerdos) después de inyección subcutánea a 0 horas de las siguientes preparaciones de insulina humana: 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 1,0mM de acetato de protamina, pH=5,0 (N=6), y 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 2,0mM de acetato de protamina, pH=5,0 (N=6).  
 50 La Figura 4 muestra el cambio en el nivel de glucosa en el plasma (% de línea base) (media +/-SEM de N cerdos) después de inyección subcutánea a 0 horas de las siguientes preparaciones de insulina humana: 0,6mM de insulina humana, 0,6mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 1,0mM de acetato de protamina, pH=5,0 (N=6), y 0,6mM de insulina humana, 0,6mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 2,0mM de acetato de protamina, pH=5,0 (N=5).  
 55 La Figura 5 muestra el efecto de acetato de protamina en la solubilidad de preparaciones de insulina humana. Las preparaciones son 0,6mM de insulina humana, 30mM de fenol, y 1,6% de glicerol ("insulina humana") con adición de 2,0 mM de acetato de protamina ("insulina humana, 2,0 mM de acetato de protamina") o 2,0 mM de acetato de protamina y 0,4 mM de Zn<sup>2+</sup> ("insulina humana, 0,4 mM de Zn<sup>2+</sup>, 2,0 mM de acetato de protamina").  
 La Figura 6 muestra el efecto de acetato de protamina en la solubilidad de preparaciones de insulina humana y de insulina humana B28D. Las preparaciones son 0,6mM de insulina humana, 30mM de fenol y 1,6% de glicerol con adición de 0,3 mM de Zn<sup>2+</sup> ("insulina humana") o 0,6mM de insulina humana B28D, 30mM de fenol y 1,6% de glicerol con adición de 1,6 mM de acetato de protamina ("insulina B28D, 1,6 mM de acetato de protamina") o 1,6 mM de acetato de protamina y 0,3 mM de Zn<sup>2+</sup> a ("insulina B28D, 0,3 mM de Zn<sup>2+</sup> a, 1,6 mM de acetato de protamina").  
 60 La Figura 7 muestra el efecto de acetato de protamina en la solubilidad de preparaciones de insulina humana y de insulina humana B28K, B29P. Las preparaciones son 0,6mM de insulina humana, 30mM de fenol y 1,6% de glicerol con adición de 0,3 mM de Zn<sup>2+</sup> ("insulina humana") o 0,6mM de insulina humana B28K, B29P, 30mM de fenol y 1,6% de

glicerol con adición de 1,6 mM de acetato de protamina ("insulina B28K, B29P, 1,6 mM de acetato de protamina") o 1,6 mM de acetato de protamina y 0,3 mM de  $Zn^{2+}$  ("insulina B28K, B29P, 0,3 mM de  $Zn^{2+}$ , 1,6 mM de acetato de protamina").

5 La Figura 8 muestra el efecto de acetato de protamina en la solubilidad de preparaciones de insulina humana y de insulina humana B3K,B29E. Las preparaciones son 0,6mM de insulina humana, 30mM de fenol y 1,6% de glicerol con adición de 0,3 mM de  $Zn^{2+}$  ("insulina humana") o 0,6mM de insulina humana B3K,B29E, 30mM de fenol y 1,6% de glicerol con adición de 1,6 mM de acetato de protamina ("insulina B3K,B29E, 1,6 mM acetato de protamina") o 1,6 mM de acetato de protamina y 0,3 mM de  $Zn^{2+}$  ("insulina B3K,B29E, 0,3 mM de  $Zn^{2+}$ , 1,6 mM de acetato de protamina").

10 La Figura 9 es una compilación de los datos de las figuras 5-8 que muestra el efecto del acetato de protamina en la solubilidad de insulina humana, insulina humana B28D, insulina humana B28K,B29P e insulina humana B3K,B29E. Las preparaciones son 0,6mM de insulina humana, 30mM de fenol y 1,6% de glicerol ("insulina humana") o 0,6mM de insulina humana B28D, insulina humana B28K,B29P o insulina humana B3K,B29E, 30mM de fenol y 1,6% de glicerol con adición de 1,6 mM de acetato de protamina.

15 La Figura 10 muestra la solubilidad de preparaciones de insulina humana a varios pHs donde las preparaciones contienen 100 U de insulina, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol y 2,0mM de la sal de protamina específica mostrada en la figura para cada curva. La "referencia" es una preparación de insulina que tiene la composición mencionada excepto que no contiene sal de protamina.

20 La Figura 11 muestra la solubilidad de preparaciones de insulina humana a varios pHs donde las preparaciones contienen 100 U de insulina, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol y 2,0mM de la sal de protamina específica mostrada en la figura para cada curva (para la mezcla de acetato / caproato, es 0,5mM de caproato y 1,5 mM de acetato). La "referencia" es una preparación de insulina que tiene la composición mencionada excepto que no contiene sal de protamina.

25 La Figura 12 muestra la solubilidad de preparaciones de insulina humana a varios pHs donde las preparaciones contienen 100 U de insulina, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol y 2,0mM de la sal de protamina específica mostrada en la figura para cada curva. La "referencia" es una preparación de insulina que tiene la composición mencionada excepto que no contiene sal de protamina.

30 La Figura 13 muestra la solubilidad de insulina frente a pH en una preparación de 0,6mM de insulina humana, 1,6mM de acetato de protamina, 60mM de fenol, 1,6% de glicerol después de almacenamiento a temperaturas y tiempos como se indican en la figura. "Referencia" es 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol almacenado a temperatura ambiente durante 4 días.

35 La Figura 14 muestra la solubilidad de insulina vs. pH en una preparación de 2,0mM de insulina humana, 4,0mM de acetato de protamina, 60mM de fenol, 1,6% de glicerol después de almacenamiento a temperaturas e intervalos de tiempo como se indican en la figura. "Referencia" es 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol almacenado a temperatura ambiente durante 4 días.

40 La Figura 15 muestra la solubilidad de insulina frente a pH en una preparación de 0,6mM de insulina humana, 2,0mM de acetato de protamina, 40mM de fenol, 1,6% de glicerol después de almacenamiento a temperaturas e intervalos de tiempo como se indican en la figura. "Referencia" es 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol almacenado a temperatura ambiente durante 4 días.

45 La Figura 16 muestra la solubilidad de insulina vs. pH en una preparación de 2,0mM de insulina humana, 4,0mM de acetato de protamina, 25mM de m-cresol, 1,6% de glicerol después de almacenamiento a temperaturas e intervalos de tiempo como se indican en la figura. "Referencia" es 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol almacenado a temperatura ambiente durante 4 días.

50 La Figura 17 muestra la solubilidad de insulina vs. pH en una preparación de 0,6mM de insulina humana, 2,0mM de acetato de protamina, 60mM de fenol, 1,6% de glicerol después almacenamiento a temperaturas e intervalos de tiempo como se indican en las leyendas. Referencia es 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol almacenado a temperatura ambiente durante 4 días.

55 La Figura 18 muestra utilización de glucosa por cerdos después de inyección subcutánea con bien 216nmol de NPH regular (Insulatard) (7 cerdos, datos mostrados en gris) o con 216 nmol de una preparación de 0,6mM de insulina humana, 1,0mM de acetato de protamina, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, pH=5,0. El índice de infusión de glucosa (GIR) se expresa como medios  $\pm$  SE.

60 Las Figuras 19 y 20 muestran la solubilidad de insulina B28D en presencia de 1,6mM a 4,0mM de concentraciones de acetato de protamina. En cada figura una curva de insulina B28D sin sal de protamina está presente demostrando la zona de precipitación de insulina B28D en el rango de pH entre pH-3,8 y ~6,5.

65 Las Figuras 21-23 muestran la solubilidad de insulina humana a tres concentraciones diferentes en presencia de concentraciones variables de acetato de protamina. La solubilidad es medida tras la incubación de muestras durante 14 días a 37°C.

La Figura 24 muestra la solubilidad de insulina humana en presencia de 1,0mM y 2,0mM de concentraciones de sal de acetato de protamina de tres especies diferentes, trucha arco iris (iridina), atún (tinnina) y arenque atlántico (clupeina). Las sales de protamina usadas en las figuras 1-23 son todas obtenidas de salmón.

Descripción de la invención

[0029] Las formulaciones farmacéuticas de la invención comprenden insulina y una sal de protamina donde la sal de protamina es acetato de protamina y está presente en una concentración de al menos 0,25mM y el pH de la formulación es de 4,5 a 6,0.

- 5 [0030] Las formulaciones farmacéuticas de la invención son químicamente estables y tienen un contenido más alto de insulina humana disuelta a pHs de 4,5 a 6,0. Por "soluble a un pH determinado" se entiende que la insulina contenida en la formulación de la invención es completamente disuelta al pH de la formulación donde se conocen métodos para determinar si la insulina contenida en la formulación de la invención es disuelta en la técnica.
- 10 [0031] En una forma de realización, la formulación farmacéutica se puede someter a centrifugado durante 20 minutos a 30.000 g y luego la concentración de insulina en el sobrenadante se puede determinar por RP-HPLC. Si esta concentración es igual dentro de error experimental a la concentración de insulina originalmente usada para hacer la formulación, entonces la insulina es completamente soluble en la formulación de la invención.
- 15 [0032] En otra forma de realización, la solubilidad del/de los péptido(s) de insulina en una formulación de la invención puede ser simplemente determinada examinando a ojo el recipiente en el que la formulación es contenida. Insulina es soluble si la solución se ve clara y ninguna materia granulosa es suspendida o precipitada en los lados/fondo del recipiente.
- 20 [0033] Por supuesto, debe entenderse por el experto en la materia que la solubilidad de insulina en una formulación de la invención puede ser afectada no sólo por la composición de la formulación y su pH sino también por la temperatura y tiempo en el que la formulación es almacenada antes de la medición de solubilidad (véase ejemplo 6). Por ejemplo, mientras el almacenamiento de las formulaciones de la invención a una temperatura de 45°C puede estrechar el intervalo de valores pH donde solubilidad es observada, cualquier precipitación de insulina de las formulaciones de la invención observada a 45°C se puede invertir reduciendo la temperatura de la formulación (ver, por ejemplo, figuras 13 y 15). Así, por ejemplo, si una formulación es una solución clara (es decir soluble) a 4°C a un pH dado entre pH 5-6 pero comienza a precipitar cuando se almacena a 45°C, este precipitado será resolvatado cuando la formulación sea almacenada a 4°C después.
- 25 [0034] En las formulaciones de la invención se entiende que insulina significa insulina humana, con la secuencia de aminoácidos mostrada en DSHW Nicol y LF Smith: Nature, (1960) 4736:483-485.
- 30 [0035] En una forma de realización, las formulaciones de la invención contienen insulina en una concentración de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 5,0mM.
- [0036] En otra forma de realización, las formulaciones de la invención contienen insulina en una concentración de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 4,0mM.
- 35 [0037] En otra forma de realización, las formulaciones de la invención contienen insulina en una concentración de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 3,0mM.
- [0038] En otra forma de realización, las formulaciones de la invención contienen insulina en una concentración de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 1,5mM.
- 40 [0039] En otra forma de realización, las formulaciones de la invención contienen insulina en una concentración de 0,4 mM, de 0,8 mM o de 1,3 mM.
- 45 [0040] "Protamina" como se utiliza en este caso se refiere al nombre genérico de un grupo de proteínas fuertemente básicas presentes en células de esperma en la combinación tipo sal con ácidos nucleicos. Normalmente, protaminas para ser usadas junto con insulina se obtienen de por ejemplo salmón (salmina), trucha arco iris (iridina), arenque (clupeina), esturión (esturina), caballa o atún (tinina) y una amplia variedad de sales de protaminas están disponibles comercialmente. Por supuesto, se entiende que la composición peptídica de una protamina específica puede variar dependiendo de qué familia, género o especie de pescado se obtiene. Protamina contiene normalmente cuatro componentes mayores, es decir péptidos monocatenarios con aproximadamente 30-32 residuos de los cuales aproximadamente 21-22 son argininas. El N-terminal es prolina para cada uno de los cuatro componentes principales, y ya que ningunos otros grupos amino están presentes en la secuencia, modificación química de protamina por una sal particular está prevista para ser homogénea en este contexto.
- 50 [0041] En una forma de realización, las sales de protamina usadas en la presente invención son de salmón.
- [0042] En otra forma de realización, las sales de protamina usadas en la presente invención son de arenque.
- [0043] En otra forma de realización, las sales de protamina usadas en la presente invención son de trucha de arco iris.
- 60 [0044] En otra forma de realización, las sales de protamina usadas en la presente invención son de atún.
- [0045] La sal de protamina es una sal de acetato de protamina.
- 65 [0046] En una forma de realización, la proporción molar de sal de protamina a insulina en las formulaciones de la invención es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100.

- [0047] En otra forma de realización, la proporción molar de sal de protamina a insulina en las formulaciones de la invención es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10.
- 5 [0048] En otra forma de realización, la proporción molar de sal de protamina a insulina en las formulaciones de la invención es de aproximadamente 0,5 a 5.
- [0049] En otra forma de realización, la proporción molar de sal de protamina a insulina en las formulaciones de la invención es de aproximadamente 1 a 3.
- 10 [0050] La formulación tiene un pH en el intervalo de 4,5 a 6,0.
- [0051] Se ha observado que el pH de las formulaciones de la invención es bastante estable en cuanto a que sólo se han observado migraciones pH muy menores en las formulaciones de la invención que ocurren en el tiempo (datos no mostrados) y que estas variaciones son típicamente el pHmetro para variaciones de pHmetro que son normalmente observadas en la medición del pH de las formulaciones.
- 15 [0052] En otra forma de realización de la invención, las formulaciones contienen, además de una insulina y una sal de protamina, al menos uno de los siguientes componentes: un conservante, un ión metálico bivalente tal como zinc, y un agente de isotonicidad.
- 20 [0053] En otra forma de realización de la invención, las formulaciones contienen, además de una insulina y una sal de protamina, al menos dos de los siguientes componentes: un conservante, un ión metálico bivalente tal como zinc, y un agente de isotonicidad.
- 25 [0054] En otra forma de realización de la invención, las formulaciones contienen, además de una insulina y una sal de protamina, los tres siguientes componentes: un conservante, un ión metálico bivalente tal como zinc, y un agente de isotonicidad.
- 30 [0055] En otra forma de realización de la invención, la formulación no contiene ión metálico bivalente.
- [0056] Cuando un conservante aceptable farmacéuticamente debe ser incluido en las formulaciones de la invención, el conservante es seleccionado del grupo que consiste en fenol, m-cresol, metil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato, 2-fenoxietanol, butil p-hidroxibenzoato, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol, y tiomerosal, o mezclas derivadas. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. En una forma de realización preferida de la invención el conservante es fenol o m-cresol. En otra forma de realización preferida de la invención el conservante es m-cresol.
- 35 [0057] En otra forma de realización de la invención el conservante está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, más preferiblemente en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, y de la forma más preferible en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml.
- 40 [0058] El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Para conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, edición 19, 1995.
- 45 [0059] Donde un ión metálico bivalente debe ser incluido en las formulaciones de la invención, el ión metálico bivalente puede ser calcio, magnesio o zinc o una combinación de los mismos.
- 50 [0060] En una forma de realización, el ión de metal bivalente es zinc.
- [0061] En otra forma de realización, la concentración de zinc en las formulaciones de la invención es inferior a una proporción molar de  $3 \text{ Zn}^{2+}$  por insulina.
- 55 [0062] En otra forma de realización, la concentración de zinc en las formulaciones de la invención es inferior a una proporción molar de  $2 \text{ Zn}^{2+}$  por insulina.
- [0063] En otra forma de realización, la concentración de zinc en las formulaciones de la invención es inferior a una proporción molar de  $1 \text{ Zn}^{2+}$  por insulina.
- 60 [0064] Cuando un agente de isotonicidad aceptable farmacéuticamente debe ser incluido en las formulaciones de la invención, el agente de isotonicidad puede ser seleccionado del grupo que consiste en glicerol, manitol, propilenoglicol, dimetil sulfona, metil sulfonil metano, trehalosa, sacarosa, sorbitol, sacarosa y/o lactosa o mezclas de los mismos. En una forma de realización preferida de la invención el agente de isotonicidad es glicerol.
- 65

[0065] En otra forma de realización de la invención el agente de isotonicidad está presente en una concentración de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 3%, más preferiblemente en una concentración de aproximadamente 1% a aproximadamente 2%, y de la forma más preferible en una concentración de aproximadamente 1,6%.

5 [0066] El uso de un agente de isotonicidad en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

[0067] En otra forma de realización de la invención, un tampón se puede incluir en las formulaciones de la invención.

10 [0068] Cuando un tampón debe ser incluido en las formulaciones de la invención, el tampón es seleccionado del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato de sodio, citrato, glicil-glicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio, fosfato sódico, y tris(hidroximetil)-aminometano, o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. En una forma de realización preferida de la invención el tampón es glicil-glicina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio, fosfato sódico o mezclas de los mismos. Por supuesto, debe entenderse que cuando acetato de protamina es la sal de protamina incluida en las formulaciones de la invención, entonces el acetato de protamina puede hacer de tampón. Por ejemplo, si 1,0 mM de acetato de protamina se añade a las formulaciones de la invención, la concentración de acetato es aproximadamente 20 mM.

20 [0069] En otra forma de realización de la invención la formulación puede comprender además un estabilizador seleccionado del grupo de los polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular donde tales estabilizadores incluyen, pero de forma no limitativa, glicol de polietileno (p. ej. PEG 3350), polivinilalcohol (PVA), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, sales diferentes (p. ej. cloruro sódico), L-glicina, L-histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos. Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. En una forma de realización preferida de la invención el estabilizador es seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, imidazol y arginina.

30 [0070] En otra forma de realización de la invención el polímero de alto peso molecular está presente en una concentración de 0,1mg/ml a 50mg/ml. En otra forma de realización de la invención el polímero de alto peso molecular está presente en una concentración de 0,1mg/ml a 5mg/ml. En otra forma de realización de la invención el polímero de alto peso molecular está presente en una concentración de 5mg/ml a 10mg/ml. En otra forma de realización de la invención el polímero de alto peso molecular está presente en una concentración de 0mg/ml a 20mg/ml. En otra forma de realización de la invención el polímero de alto peso molecular está presente en una concentración de 20mg/ml a 30mg/ml. En otra forma de realización de la invención el polímero de alto peso molecular está presente en una concentración de 30mg/ml a 50mg/ml.

40 [0071] En otra forma de realización de la invención el compuesto de bajo peso molecular está presente en una concentración de 0,1mg/ml a 50mg/ml. En otra forma de realización de la invención el compuesto de bajo peso molecular está presente en una concentración de 0,1mg/ml a 5mg/ml.

45 [0072] En otra forma de realización de la invención el compuesto de bajo peso molecular está presente en una concentración de 5mg/ml a 10mg/ml. En otra forma de realización de la invención el compuesto de bajo peso molecular está presente en una concentración de 10mg/ml a 20mg/ml. En otra forma de realización de la invención el compuesto de bajo peso molecular está presente en una concentración de 20mg/ml a 30mg/ml. En otra forma de realización de la invención el compuesto de bajo peso molecular está presente en una concentración de 30mg/ml a 50mg/ml.

[0073] El uso de un estabilizador en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

50 [0074] En otra forma de realización de la invención la formulación de la invención puede comprender además un tensioactivo donde un tensioactivo se puede seleccionar de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitán, polisorbato, tal como polisorbato-20, copolímeros en bloque como copolímeros en bloque de óxido de polietileno/óxido de polipropileno tal como poloxámeros, poloxámero 188 y poloxámero 407, Brij® 35, Brij® 56, Brij® 72, Brij® 76, Brij® 92V, Brij® 97, Brij® 58P, Cremophor® EL, glicol de decaetileno monododecil éter, N-decanoil-N-metilglucamina, n-Dodecanoil-N-metilglucamida, poliglucósidos de alquilo, aceite de ricino etoxilado, glicol de heptaetileno monododecil éter, glicol de heptaetileno monododecil éter, glicol de heptaetileno monotetradecil éter, glicol de hexaetileno monododecil éter, glicol de hexaetileno monohexadecil éter, glicol de hexaetileno monooctadecil éter, glicol de hexaetileno monotetradecil éter, Igepal CA-630, Igepal CA-630, Metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-beta-D-glucopiranosido, glicol de nonaetileno monododecil éter, N-Nonanoil-N-metilglucamina, N-Nonanoil-N-metilglucamina, glicol de octaetileno monododecil éter, glicol de octaetileno monododecil éter, glicol de octaetileno monohexadecil éter, glicol de octaetileno monooctadecil éter, glicol de octaetileno monotetradecil éter, Octil-β-D-glucopiranosido, glicol de pentaetileno monododecil éter, glicol de pentaetileno monododecil éter, glicol de pentaetileno monohexadecil éter, glicol de pentaetileno monohexil éter, glicol de pentaetileno monooctadecil éter, glicol de pentaetileno monoocil éter, polietilenglicol diglicidil éter, polietilenglicol éter W-1, polioxietileno 10 tridecil éter, estearato de polioxietileno 100, polioxietileno 20 isohexadecil éter, polioxietileno 20 oleil éter, estearato de polioxietileno 40, estearato de polioxietileno 50, estearato de polioxietileno 8, polioxietileno bis



(imidazolil carbonilo), estearato de propilenglicol polioxietileno 25, saponina de corteza Quillaja, Span® 20, Span® 40, Span® 60, Span® 65, Span® 80, Span® 85, Tergitol, tipo 15-S-12, Tergitol, tipo 15-S-30, Tergitol, tipo 15-S-5, Tergitol, tipo 15-S-7, Tergitol, tipo 15-S-9, Tergitol, tipo NP-10, Tergitol, tipo NP-4, Tergitol, tipo NP-40, Tergitol, tipo NP-7, Tergitol, tipo NP-9, Tetradecil- $\beta$ -D-maltósido, tetraetilenglicol monodecil éter, tetraetilenglicol monododecil éter, tetraetilenglicol monotetradecil éter, trietilenglicol monodecil éter, trietilenglicol monododecil éter, trietilenglicol monohexadecil éter, trietilenglicol monoocil éter, trietilenglicol monotetradecil éter, Tritón CF-21, Tritón CF-32, Tritón DF-12, Tritón DF-16, Tritón GR-5M, Tritón QS- 15, Tritón QS-44, Tritón X-100, Tritón X-102, Tritón X-15, Tritón X-151, Tritón X-200, Tritón X-207, Triton® X-1 00, Triton® X-114, solución de Triton® X-165, solución de Triton® X-305, Triton® X-405, Triton® X-45, Triton® X-705-70, TWEEN® 20, TWEEN® 40, TWEEN® 60, TWEEN® 6, TWEEN® 65, TWEEN® 80, TWEEN® 81, TWEEN® 85, Tiloxapol" glicerol, ácido cólico o derivados de lo mismo, lecitinas, alcoholes y fosfolípidos, fosfolípidos de glicerol (lecitinas, cefalinas, serina de fosfatidilo), glicolípidos de glicerol (galacto-piranósido), esfingofosfolípidos (esfingomielina), y esfingoglicolípidos (ceramidas, gangliósidos), DSS (docusato de sodio, docusato de calcio, docusato de potasio, SDS (dodecil sulfato 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, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-Hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), palmitoil lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (p. ej. ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato etanolamina, colina, serina o treonina), alquilo, alcoxilo (alquil éster), alcoxi (alquil éter)- derivados de lisofosfatidil y fosfateidilcolinas, por ejemplo derivados de lauroil y miristoil de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo principal polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y los positivamente cargados DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, tensioactivos zwitteriónicos (p. ej. N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, dodecilsulfocolina, miristoil isofosfatidilcolina, lisolecitina de huevo de gallina), tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternarias) (p. ej. bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos, copolímeros de bloque de óxido de polietileno/óxido de polipropileno (Plurónicos/Tetrónicos, Tritón X-100, dodecil  $\beta$ -D- glucopiranósido) o tensioactivos poliméricos (TWEEN® 40, TWEEN® 80; Brij-35), derivados de ácido fusídico (p. ej. taurodihidrofusidato de sodio etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos C6-C12 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N <sup>$\alpha$</sup> -acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, derivados N <sup>$\alpha$</sup> -acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N <sup>$\alpha$</sup> -acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro 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. En una forma de realización preferida de la invención el tensioactivo es poloxámero 188 o TWEEN® 20. En otra forma de realización preferida de la invención el tensioactivo es poloxámero 188. En otra forma de realización preferida de la invención el tensioactivo es TWEEN® 20.

[0075] En otra forma de realización de la invención el tensioactivo está presente en una cantidad inferior a 200ppm, más preferiblemente en una cantidad inferior a 100ppm, y de la forma más preferible en una cantidad inferior a 50ppm.

[0076] El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

[0077] Las formulaciones de la invención se pueden preparar por técnicas convencionales, por ejemplo como se describe en Pharmaceutical Sciences de Remington, 1985 o en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995, donde tales técnicas convencionales de la industria farmacéutica implican disolución y mezcla de los ingredientes según sea apropiado para dar el producto final deseado.

[0078] Un método para preparar formulaciones de la invención comprende:

- preparar una solución disolviendo un ión metálico bivalente en agua o tampón;
- preparar una solución disolviendo el conservante en agua o tampón;
- preparar una solución disolviendo el agente de isotonicidad en agua y tampón o;
- preparar una solución disolviendo el tensioactivo en agua o tampón;
- preparar una solución disolviendo la insulina, análogo de insulina, derivado de insulina o una mezcla de los anteriores en agua o tampón;
- preparar una solución disolviendo una sal de protamina en tampón o agua;
- mezclar solución e) y una o más soluciones a), b), c), y d);
- mezclar solución g) con solución f); y
- ajustar el pH de la mezcla en h) al pH deseado inferior a 7,0.

[0079] En otra forma de realización, una solución con insulina y opcionalmente un conservante, un agente de isotonicidad y/o un ión metálico bivalente en agua o un tampón a un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, preferiblemente a aproximadamente pH neutro, puede mezclarse con una solución de sal de protamina, y luego el pH de la solución mezclada se puede ajustar al pH deseado final inferior a 7,0.

[0080] Por supuesto, debe entenderse que los componentes de la formulación final pueden ser mezclados juntos en otros órdenes que aquellos expuestos anteriormente con tal de que la formulación final alcance el mismo estado de equilibrio al final de la mezcla.

5 [0081] La presente invención además se refiere a métodos de tratamiento que usan las formulaciones farmacéuticas de la invención donde las composiciones se administran en una cantidad eficaz para combatir la enfermedad, condición, o trastorno para el que se indica la administración del péptido de insulina contenido en la formulación.

10 [0082] En una forma de realización, las formulaciones de la invención se pueden usar en el tratamiento de diabetes tipo 1 y tipo 2.

15 [0083] La dosis, forma de administración, y número de administraciones al día de una formulación de la invención será determinado por un médico teniendo en cuenta factores tales como los objetivos terapéuticos, la naturaleza y causa de la enfermedad del paciente, otros fármacos o medicaciones que el paciente puede estar tomando, el sexo del paciente y peso, nivel de ejercicio y hábitos de comida al igual que otros factores que pueden ser conocidos por el médico.

20 [0084] En un intervalo amplio, la dosis diaria de insulina que debe ser administrada a un paciente en las formulaciones de la invención es de aproximadamente 0,1 unidades de insulina/kg de peso corporal para aproximadamente 1 unidad de insulina/kg de peso corporal.

25 [0085] En otra forma de realización, la dosis diaria de insulina que debe ser administrada a un paciente en las formulaciones de la invención es de aproximadamente 0,2 unidades de insulina/kg de peso corporal para aproximadamente 0,6 unidades de insulina/kg de peso corporal. Por supuesto, el médico experto en el tratamiento de diabetes entendería que los intervalos de concentración de insulina usados para tratar a un paciente diabético pueden variar dependiendo de si, por ejemplo, el paciente que debe ser tratado es un niño con diabetes tipo 1 o un adulto con diabetes tipo 2 fuertemente resistente a insulina. El médico experto en el tratamiento de diabetes también será capaz de seleccionar el método más ventajoso terapéuticamente para administrar las formulaciones de la invención.

30 [0086] En una forma de realización, las formulaciones se pueden administrar parenteralmente donde vías típicas de administración parenteral son subcutáneas e intramusculares. En otra forma de realización, las formulaciones se pueden administrar parenteralmente donde la vía es subcutánea.

35 [0087] En otra forma de realización, las formulaciones pueden ser administradas por vía nasal, bucal, pulmonar u ocular. En otra forma de realización, las formulaciones se pueden administrar por vía nasal. En otra forma de realización, las formulaciones se pueden administrar por vía pulmonar.

40 [0088] En una forma de realización las formulaciones de la invención se usan en relación con bombas de insulina. Las bombas de insulina pueden ser precargadas y desechables, o las formulaciones de insulina se pueden suministrar desde un depósito que es desmontable. Las bombas de insulina se pueden montar o soportar en la piel, y el trayecto de la preparación de insulina del compartimento de almacenamiento de la bomba al paciente puede ser más o menos tortuoso. Ejemplos no limitativos de bombas de insulina son descritas en US 5,957,895, US 5,858,001, US 4,468,221, US 4,468,221, US 5,957,895, US 5,858,001, US 6,074,369, US 5,858,001, US 5,527,288, y US 6,074,369.

45 [0089] En otra forma de realización las formulaciones de la invención se usan en relación con dispositivos de inyección con forma de pluma, que pueden ser precargables y desechables, o las formulaciones de insulina se pueden suministrar desde un depósito que es desmontable. Ejemplos no limitativos de dispositivos de inyección con forma de pluma son FlexPen®, InnoLet®, InDuo™, Innovo®.

50 [0090] En otra forma de realización, las formulaciones de la invención se usan en relación con dispositivos para administración pulmonar de formulaciones de insulina acuosas, un ejemplo no limitativo de ello es el dispositivo AerX®.

[0091] La invención además se refiere a tratamiento de un paciente en el que las formulaciones farmacéuticas de la invención se combinan con otra forma de tratamiento.

55 [0092] En un aspecto de la invención, el tratamiento de un paciente con las formulaciones farmacéuticas de la invención se combina con dieta y/o ejercicio.

60 [0093] En otro aspecto de la invención las formulaciones farmacéuticas de la invención se administran en combinación con una o más sustancias activas adicionales en cualquier proporción adecuada donde "en combinación con" según se utiliza en conexión con las formulaciones farmacéuticas de la invención y una o más sustancias activas adicionales significa que una o más sustancias activas adicionales se pueden incluir en la formulación de la invención o que pueden estar contenidas en la(s) formulación(es) separada(s) de la formulación de la invención. Tales sustancias activas adicionales pueden por ejemplo ser seleccionadas de agentes antiobesidad, antidiabéticos, agentes antihipertensivos, agentes para el tratamiento de complicaciones que resultan de o se asocian a diabetes y agentes para el tratamiento de complicaciones y trastornos que resultan de o se asocian a la obesidad.

65

[0094] Así, en otro aspecto de la invención las formulaciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en combinación con uno o más agentes antiobesidad o agentes de regulación de apetito.

5 [0095] Tales agentes pueden ser seleccionados del grupo que consiste en agonistas de CART (transcripción regulada de cocaína y anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptidos Y), agonistas de MC4 (melanocortina 4), agonistas de MC3 (melanocortina 3), antagonistas de orexina, agonistas de TNF (factores de necrosis tumoral), agonistas de CRF (factores de liberación de corticotropina), antagonistas de CRF BP (proteína de unión a factor de liberación de coticotropina), agonistas de urocortina, agonistas adrenérgicos  $\beta$  3 tal como CL-316243, AJ-9677, GW-0604, LY362884, LY377267 o AZ-40140, agonistas de MSH (hormona estimulante de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentrante de melanocitos), agonistas de CCK (colecistoquinina), inhibidores de reabsorción de serotonina tal como fluoxetina, seroxat o citalopram, inhibidores de reabsorción de serotonina y noradrenalina, serotonina mezclada y compuestos noradrenérgicos, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona de crecimiento, factores de crecimiento tal como prolactina o lactógeno de placenta, compuestos de liberación de hormona de crecimiento, agonistas de TRH (hormona de liberación de tireotropina), moduladores UCP 2 o 3 (proteína desacoplante 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasa/amilasa, moduladores de PPAR (receptor activado por proliferador de peroxisoma), moduladores de RX (receptores de retinoide X), agonistas de TR $\beta$ , inhibidores de AGRP (proteína relacionada con Agouti), antagonistas de de histamina H3, antagonistas opioides (tales como naltrexona), exendina-4, GLP-1, análogos de glp-1 o derivados de ellos y factor neurotrófico ciliar.

20 [0096] En una forma de realización de la invención el agente antiobesidad es leptina.

[0097] En otra forma de realización el agente antiobesidad es dexamfetamina o anfetamina.

25 [0098] En otra forma de realización el agente antiobesidad es fenfluramina o dexfenfluramina.

[0099] En todavía otra forma de realización el agente antiobesidad es sibutramina.

30 [0100] En otra forma de realización el agente antiobesidad es orlistat.

[0101] En otra forma de realización el agente antiobesidad es mazindol o fentermina.

[0102] En todavía otra forma de realización el agente antiobesidad es fendimetracina, dietilpropión, fluoxetina, bupropión, topiramato o ecopipam.

35 [0103] Los agentes hipoglucémicos activos por vía oral comprenden imidazolinias, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, oxadiazolidinedionas, tiazolidinadionas, sensibilizantes de insulina, secretagogos de insulina tal como glimepirida, inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, agentes que actúan sobre el canal de potasio ATP-dependiente de las células  $\beta$  por ejemplo abridores de canal de potasio tales como aquellos descritos en WO 97/26265, WO 99/03861 y WO 40 00/37474 (Novo Nordisk A/S) que son incorporados aquí por referencia, o mitiglinida, o un bloqueador de canal de potasio, tal como BTS-67582, nateglinida, antagonistas de glucagón tales como aquellos descritos en WO 99/01423 y WO 00/39088 (Novo Nordisk A/S y Agouron Pharmaceuticals, Inc.), que se incorporan aquí por referencia, agonistas de GLP-1 tales como aquellos descritos en WO 00/42026 (Novo Nordisk A/S y Agouron Pharmaceuticals, Inc.), que son incorporados aquí por referencia, inhibidores de DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV), inhibidores de PTPasa (proteína tirosina fosfatasa), inhibidores de enzimas hepáticas implicadas en la estimulación de gluconeogénesis y/o glucogenólisis, moduladores de absorción de glucosa, inhibidores de GSK-3 (glucógeno-sintasa quinasa-3), compuestos que modifican el metabolismo lípido tales como agentes antilipidémicos, compuestos reductores de la ingesta de alimentos, agonistas de PPAR (receptor activado por proliferador de peroxisoma) y RXR (receptores de retinoide X), tales como ALRT-268, LG-1268 o LG- 1069.

50 [0104] En otra forma de realización de la invención las formulaciones farmacéuticas de la invención se administran en combinación con una sulfonilurea por ejemplo tolbutamida, cloropropamida, tolazamida, glibenclamida, glipizida, glimepirida, glicazida o gliburida.

55 [0105] En otra forma de realización de la invención las formulaciones farmacéuticas de la invención se administran en combinación con una biguanida, por ejemplo metformina.

[0106] En otra forma de realización de la invención las formulaciones farmacéuticas de la invención se administran en combinación con una meglitinida por ejemplo repaglinida o nateglinida.

60 [0107] En todavía otra forma de realización de la invención las formulaciones farmacéuticas de la invención se administran en combinación con un sensibilizador de insulina de tiazolidinadionas, por ejemplo troglitazona, ciglitazona, pioglitazona, rosiglitazona, isaglitazona, darglitazona, englitazona, CS-011/CI-1037 o T 174 o los compuestos descritos en WO 97/41097, WO 97/41119, WO 97/41120, WO 00/41121 y WO 98/45292 (Dr. Reddy's Research Foundation), que es incorporado aquí por referencia.

65

- 5 [0108] En todavía otra forma de realización de la invención las formulaciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en combinación con un sensibilizador de insulina, por ejemplo tal como GI 262570, YM-440, MCC-555, JTT-501, AR-H039242, KRP-297, GW-409544, CRE-16336, AR-H049020, LY510929, MBX-102, CLX-0940, GW-501516 o los compuestos descritos en WO 99/19313, WO 00/50414, WO 00/63191, WO 00/63192, WO 00/63193 (Dr. Reddy's Research Foundation) y WO 00/23425, WO 00/23415, WO 00/23451, WO 00/23445, WO 00/23417, WO 00/23416, WO 00/63153, WO 00/63196, WO 00/63209, WO 00/63190 y WO 00/63189 (Novo Nordisk A/S), que es incorporado aquí por referencia.
- 10 [0109] En otra forma de realización de la invención las formulaciones farmacéuticas de la invención se administran en combinación con un inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasa, por ejemplo voglibosa, emigliato, miglitol o acarbosa.
- 15 [0110] En otra forma de realización de la invención las formulaciones farmacéuticas de la invención se administran en combinación con un agente que actúa sobre el canal de potasio ATP-dependiente de las  $\beta$ -células, por ejemplo tolbutamida, glibenclamida, glipizida, glicazida, BTS-67582 o repaglinida.
- [0111] En otra forma de realización de la invención las formulaciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en combinación con nateglinida.
- 20 [0112] En todavía otra forma de realización de la invención las formulaciones farmacéuticas de la invención se administran en combinación con un agente antilipídico, por ejemplo colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol o dextrotiroxina.
- 25 [0113] En otro aspecto de la invención, las formulaciones farmacéuticas de la invención se administran en combinación con más de uno de los compuestos arriba mencionados, por ejemplo en combinación con metformina y una sulfonilurea tal como gliburida; una sulfonilurea y acarbosa; nateglinida y metformina; acarbosa y metformina; una sulfonilurea, metformina y troglitazona; metformina y una sulfonilurea; etc.
- 30 [0114] Además, las formulaciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en combinación con uno o más agentes antihipertensivos. Ejemplos de agentes antihipertensivos son  $\beta$ -bloqueantes tal como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, ECA (enzima de conversión de angiotensina) inhibidores tales como benazeprilo, captoprilo, enalaprilo, fosinoprilo, lisinoprilo, quinaprilo y ramiprilo, bloqueantes de canal de calcio tal como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamil, y  $\alpha$ -bloqueantes tales como doxazosin, urapidil, prazosin y terazosina. El producto farmacéutico de la invención puede también ser combinado con inhibidores NEP tal como candoxatrilol.
- 35 [0115] Se puede hacer referencia adicional a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>a</sup> edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.
- 40 [0116] Se debe entender que cualquier combinación adecuada de los compuestos según la invención con dieta y/o ejercicio, uno o más de los compuestos arriba mencionados y opcionalmente una o varias otras sustancias activas se consideran dentro del alcance de la presente invención.

## 45 EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### Estabilidad química de formulaciones de insulina conteniendo acetato de protamina

- 50 [0117] La estabilidad química a varios pHs de preparaciones de insulina humana sin (Figura 1A 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, pH=3,5, 4,7 y 7,4) o con (Figura 1B 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 1,6mM de acetato de protamina, pH=5,0 y pH=5,5) acetato de protamina fue evaluada por medición del aumento en el contenido (en el porcentaje de contenido de insulina total) de productos de desamidación (B3Asp, B3isoAsp, A21Asp) y productos hidrofóbicos (principalmente agregados covalentes) después de 14 días a 37°C en comparación al inicio (14 días a 37°C siendo comparable a 2 años a 4°C). Las preparaciones fueron analizadas por HPLC en fase inversa en una columna Kromasil C4, 150 x 4,6mm ID, tamaño de partícula de 5 micras, eluido a 1 ml/minuto a 35°C. Los compuestos de insulina monoméricos se eluyen isocráticamente con un tampón de fosfato, pH3,4 con sulfato de sodio y aproximadamente 30% (v/v) de acetonitrilo seguido de una fase de gradiente con concentración de acetonitrilo aumentada para elución de los compuestos más hidrofóbicos.
- 60

### Ejemplo 2

#### Solubilidad de equilibrio de formulaciones de insulina conteniendo acetato de protamina

65

[0118] Para perfiles de solubilidad-pH, 0,6 mM de soluciones madre de insulina humana con 0,0-0,6 mM de  $Zn^{2+}$ , 30 mM de fenol, 1,6% de glicerol y 0,7mM de sulfato de protamina o 0,0-2,0mM de acetato de protamina fueron preparados y el pH fue ajustado al valor deseado correspondiente al resultado alcalino del perfil de solubilidad-pH. De estas soluciones madre fueron retiradas muestras, el pH se ajustó al valor deseado en el intervalo de pH 3-8 , y 0,3 ml de muestras fueron incubados a 23°C durante al menos 4 días. Después de centrifugado (20.000 g durante 20 minutos a 23 C) de cada muestra, el pH fue medido y la solubilidad fue determinada por cuantificación de contenidos de insulina en el sobrenadante por SEC HPLC análisis similar al descrito en ejemplo 1.

[0119] El efecto de diferentes concentraciones de sal de protamina y zinc en la dependencia de pH de solubilidad de insulina en varias preparaciones de insulina se muestra en las figuras 2A-2C.

[0120] En la figura 2A la dependencia de pH de varias formulaciones de insulina humana con 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, y 0,7mM de sulfato de protamina o 0,7-2,0mM de acetato de protamina es mostrada. En la figura 2B, la dependencia de pH de varias formulaciones de insulina humana con 0,6mM de insulina humana, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 1,2mM de acetato de protamina, y 0,3-0,6mM de  $Zn^{2+}$  es mostrada. En la figura 2C, la dependencia de pH de varias formulaciones de insulina humana con 0,6mM de insulina humana, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 2,0mM de acetato de protamina, y 0,0-0,6mM de  $Zn^{2+}$  es mostrada. En las Figuras 2A-2C, la referencia de insulina humana es 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol.

### Ejemplo 3

#### Análisis de insulina con formulaciones en cerdos

[0121] Estudios farmacodinámicos (PD) que usan las siguientes formulaciones de insulina fueron realizadas en cerdas domésticas, cruzadas con LYD, pesando entre 55 y 110 kg:

- 1) 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 1,0mM de acetato de protamina, pH=5,0
- 2) 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 2,0mM de acetato de protamina, pH=5,0
- 3) 0,6mM de insulina humana, 0,6mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 1,0mM de acetato de protamina, pH=5,0 y
- 4) 0,6mM de insulina humana, 0,6mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 2,0mM de acetato de protamina, pH=5,0.

[0122] Las cerdas fueron cateterizadas en la vena yugular a través de una vena auricular al menos 2 días antes del inicio del estudio. La última comida antes del inicio del estudio fue servida a los animales aproximadamente 18 horas antes de la inyección de la formulación de insulina, y los animales tuvieron libre acceso a agua en todo el tiempo durante el periodo de ayuno y el periodo de prueba.

[0123] En el tiempo 0 horas la formulación de insulina fue dada subcutáneamente a 0,2 unidades de insulina/kg en el lado lateral del cuello. A intervalos de tiempo regulares fueron extraídas muestras de sangre del catéter y tomadas en 1,5 ml de tubos de vidrio previamente revestidos con heparina. Las muestras de sangre se mantuvieron en agua helada hasta la separación de plasma por centrifugado durante 10 minutos a 3000 r.p.m. a 4°C, que fue hecho en los primeros 30 minutos. Las muestras de plasma fueron almacenadas a 4°C durante poco tiempo (2-3 horas) o a -18°C para almacenamiento de término largo y fueron analizadas para glucosa en COBAS MIRA. Estimación de nivel de inicio de glucosa en la sangre fue hecha en 4 muestras tomadas 1 hora, media hora, 20 minutos e inmediatamente antes de la inyección.

[0124] La Figura 3 muestra el cambio en el nivel de glucosa en el plasma (% de línea base) (media +/-SEM de N cerdas) después de inyección subcutánea a 0 horas de las siguientes preparaciones de insulina humana: 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 1,0mM de acetato de protamina, pH=5,0 (N=6), y 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 2,0mM de acetato de protamina, pH=5,0 (N=6).

[0125] La Figura 4 muestra el cambio en el nivel de glucosa en el plasma (% de línea base) (media +/-SEM de N cerdas) después de inyección subcutánea a 0 horas de las siguientes preparaciones de insulina humana: 0,6mM de insulina humana, 0,6mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 1,0mM de acetato de protamina, pH=5,0 (N=6), y 0,6mM de insulina humana, 0,6mM de  $Zn^{2+}$ , 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 2,0mM de acetato de protamina, pH=5,0 (N=5).

### Ejemplo 4

#### Análisis de la solubilidad frente a perfiles de pH de insulinas comercializadas en presencia de acetato de protamina

[0126] Las Figuras 5-9 muestran la solubilidad de insulinas comercializadas (insulina humana, insulina humana B28D (Aspart), insulina humana B28K,B29P (LisPro) e insulina humana B3K, B29E (Glulisine) en presencia de 1,6 mM de acetato de protamina. En cada figura una curva de referencia de insulina humana sin sal de protamina está presente

demonstrando la zona de precipitación de insulina humana en el rango de pH entre ~4,5 y ~6,5. Los datos en las Figuras 5-9 muestran que el acetato de protamina solubiliza insulina humana (Figura 5) e insulina LysPro (Figura 7) al grado más alto de las insulinas evaluadas.

#### 5 Ejemplo 5

##### Análisis de la solubilidad frente a perfiles de pH de insulina humana en presencia de 15 sales de protamina diferentes

10 [0127] Las Figuras 10-12 muestran la solubilidad de insulina humana en presencia de sales de protamina diferentes. En cada figura una curva de referencia de insulina humana sin sal de protamina está presente demostrando la zona de precipitación de insulina humana en el rango de pH entre ~4,5 y ~6,5.

15 [0128] De las sales evaluadas, propionato, lactato, formiato, nitrato y acetato dan la mejor solubilidad de insulina humana en el rango de pH de ~4,5 a ~6,0.

#### Ejemplo 6

##### Efectos de temperatura y tiempo de almacenamiento en la solubilidad de varias preparaciones de insulina humana a diferentes pHs

20 [0129] Las Figuras 13-17 muestran que la temperatura de almacenamiento en aumento restringe el intervalo de valores de pH donde la solubilidad de las preparaciones de insulina es observada pero que cualquier precipitación de insulina observada a temperaturas más altas se puede invertir reduciendo la temperatura a la que las preparaciones son almacenadas.

25

#### Ejemplo 7

##### Utilización de glucosa de preparaciones de insulina humana

30 [0130] El efecto de utilización de glucosa después de una inyección subcutánea de las preparaciones de insulina de la presente invención fueron caracterizadas usando un modelo de grapa de cerdo como se describe en Kurtzhals & Ribbel, Diabetes 44, 1381-1385; (1995).

35 [0131] La Figura 18 compara la utilización de glucosa en cerdos después de la inyección subcutánea con bien una preparación de insulina NPH o una preparación de 0,6mM de insulina humana, 1,0mM de acetato de protamina, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, pH=5,0 y muestra que una utilización de glucosa aumentada se observa en la inyección de la última preparación.

#### Ejemplo 8

40

##### Preparación de acetato de protamina por precipitación de sulfato de bario

45 [0132] 10 gramos de sulfato de protamina fueron disueltos por agitación en 1 litro de agua destilada calentada a 60°C. 4,8 gramos de acetato de bario fue luego disuelto en ello y la suspensión resultante fue dejada durante 16 horas a 4°C con agitación suave. La suspensión fue centrifugada a 6000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de 0,22 µm y liofilizado. Rendimiento: 9,3 gramos de acetato de protamina.

#### Ejemplo 9

##### Preparación de acetato de protamina por intercambio de aniones

50 [0133] 10 gramos de sulfato de protamina fueron disueltos por agitación en 1 litro de agua destilada calentada a 60°C y enfriada a temperatura ambiente. Una columna 1,6 x 20 cm de intercambiador de aniones de resina AG 1X8 (100-200 malla, forma de acetato (BioRad Inc., cat. no. 140-1443) fue embalado y enjuagado con 120 ml de agua destilada. La solución de sulfato de protamina se condujo luego a través de la columna a un flujo de 60 ml por hora y se recogió el eluato. La columna fue finalmente eluida con 100 ml de agua destilada y los eluatos recogidos fueron filtrados a través de un filtro de 0,22 µm y liofilizados. Rendimiento: 9,4 gramos de acetato de protamina.

60 [0134] Sería entendido por un experto en la materia que los métodos descritos en los ejemplos 8 y 9 podrían ser usados para convertir sulfato de protamina a cualquier forma de sal de elección por uso de sal de bario apropiada (ejemplo 8) o forma de resina de intercambio de aniones (Ejemplo 9)

#### Ejemplo 10

65 Análisis de la solubilidad frente a pH de insulina B28D en presencia de concentraciones más altas de acetato de

protamina.

5 [0135] Las Figuras 19 y 20 muestran la solubilidad de insulina B28D en presencia de 1,6mM a 4,0mM de concentraciones de acetato de protamina. En cada figura una curva de insulina B28D sin sal de protamina está presente demostrando la zona de precipitación de insulina B28D en el rango de pH entre pH-3,8 y ~6,5.

10 [0136] Los datos demuestran que la insulina B28D se solubiliza por acetato de protamina en el rango de pH hasta ~5,3 con una concentración de acetato de protamina alta en relación a la concentración necesitada para solubilizar insulina humana o insulina B28K,B29P en el mismo rango de pH.

[0137] Composiciones de preparaciones en la figura 19 son 1,3mM de insulina B28D, 25mM de m-cresol, 1,6% de glicerol, 40 ppm de TWEEN® 20 con concentraciones de acetato de protamina 1,6-2,4-4,0 mM. Referencia de insulina B28D es 0,6mM de insulina B28D, 0,3mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol.

15 [0138] Composiciones de preparaciones en la figura 20 son 0,6mM de insulina B28D, 30mM de fenol, 1,6% de glicerol, 40 ppm, 1,6mM de acetato de protamina y 0,6mM de insulina B28D, 25mM de m-cresol, 1,6% de glicerol, 40 ppm de TWEEN® 20 con concentraciones de acetato de protamina 1,6-2,4-4,0mM. Referencia de insulina B28D es 0,6mM de insulina B28D, 0,3mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol.

20 **Ejemplo 11**

Análisis de la solubilidad frente a pH de 0,4/0,8/1,3mM de insulina humana en presencia de concentraciones variables de acetato de protamina.

25 [0139] Las Figuras 21-23 muestran la solubilidad de insulina humana a tres concentraciones diferentes en presencia de concentraciones variables de acetato de protamina. La solubilidad es medida tras la incubación de muestras durante 14 días a 37°C.

30 [0140] Composiciones de preparaciones en las figuras 21-23 son 0,4-0,8-1,3mM de insulina humana, 25mM de m-cresol, 1,6% de glicerol, 40ppm de TWEEN® 20 con proporción de concentraciones de insulina humana a acetato de protamina según lo designado.

35 [0141] Los datos demuestran que la concentración relativa de acetato de protamina a insulina humana necesitada para solubilizar insulina humana en el rango de pH entre 4,5 y -6,0 depende de la concentración absoluta de insulina humana.

**Ejemplo 12**

Análisis de la solubilidad frente a pH de insulina humana en presencia de acetato de protamina de distintas especies.

40 [0142] La Figura 24 muestra la solubilidad de insulina humana en presencia de 1,0mM y 2,0mM de concentraciones de la sal de acetato de protamina de tres especies diferentes.

45 [0143] Composiciones de preparaciones en la figura 24 son 0,6mM de insulina humana, 25mM de m-cresol, 1,6% de glicerol con concentraciones de acetato de protamina 1,0mM y 2,0mM. Referencia de insulina humana es 0,6mM de insulina humana, 0,3mM de Zn<sup>2+</sup>, 30mM de fenol.

50 [0144] Los datos demuestran que además de la sal de acetato de protamina derivada de salmón también la sal de acetato de protamina derivada de trucha arco iris (iridina), atún (tinnina) y arenque atlántico (clupeina) solubiliza la insulina humana en el rango de pH entre 4,5 y 6,0.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Formulaci3n farmac3utica con un contenido m3s alto de insulina disuelta que comprende insulina humana y acetato de protamina y donde la concentraci3n del acetato de protamina es mayor de 0,25mM y donde dicha formulaci3n tiene un pH de 4,5 a 6,0.
2. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, donde la proporci3n molar de acetato de protamina a insulina es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100.
- 10 3. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, donde la proporci3n molar de acetato de protamina a insulina es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10.
4. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, donde la proporci3n molar de acetato de protamina a insulina es de aproximadamente 0,5 a 5.
- 15 5. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende adem3s un conservante.
6. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 5, donde el conservante es m-cresol.
- 20 7. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende adem3s un agente de isotonicidad.
8. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 7, donde el agente de isotonicidad es glicerol.
9. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende adem3s un i3n de metal bivalente.
- 25 10. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 9, donde el i3n de metal bivalente es zinc.
11. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende adem3s un tensioactivo.
- 30 12. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 11, donde el tensioactivo es TWEEN® 20.



Figura 1A

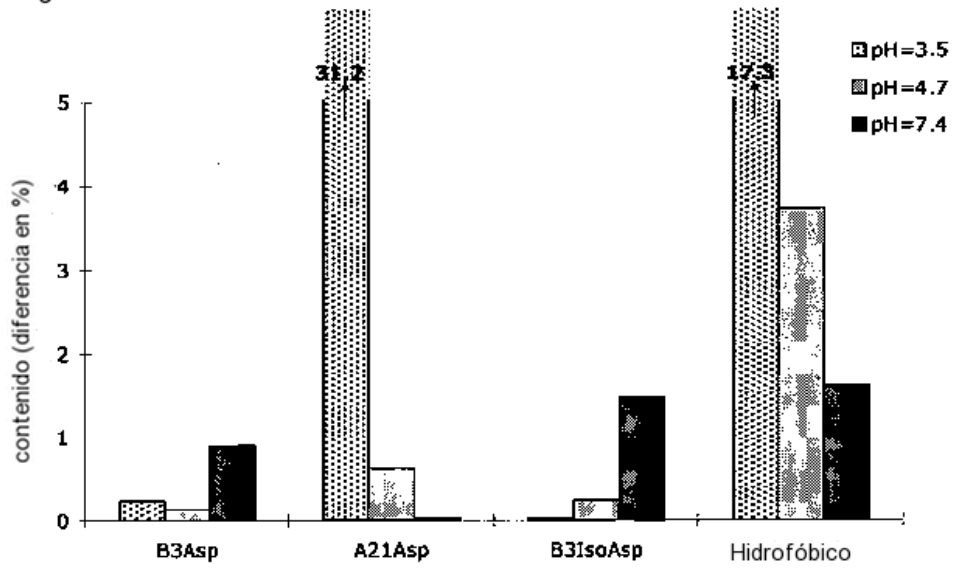


Figura 1B

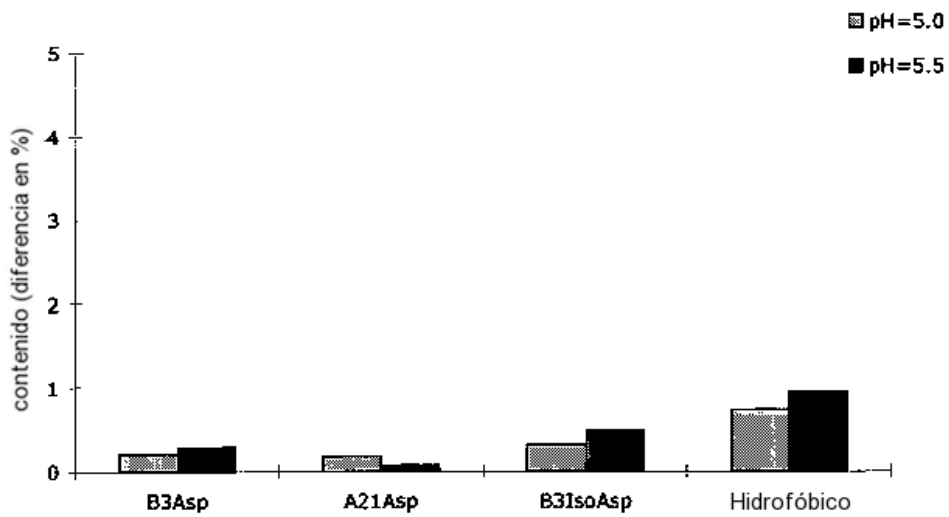


Figura 2A

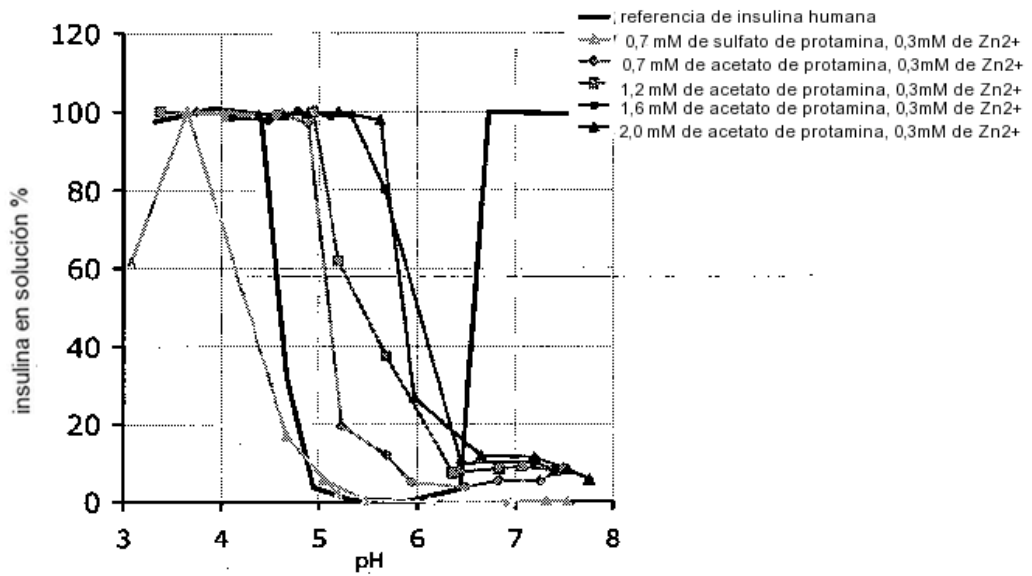


Figura 2B

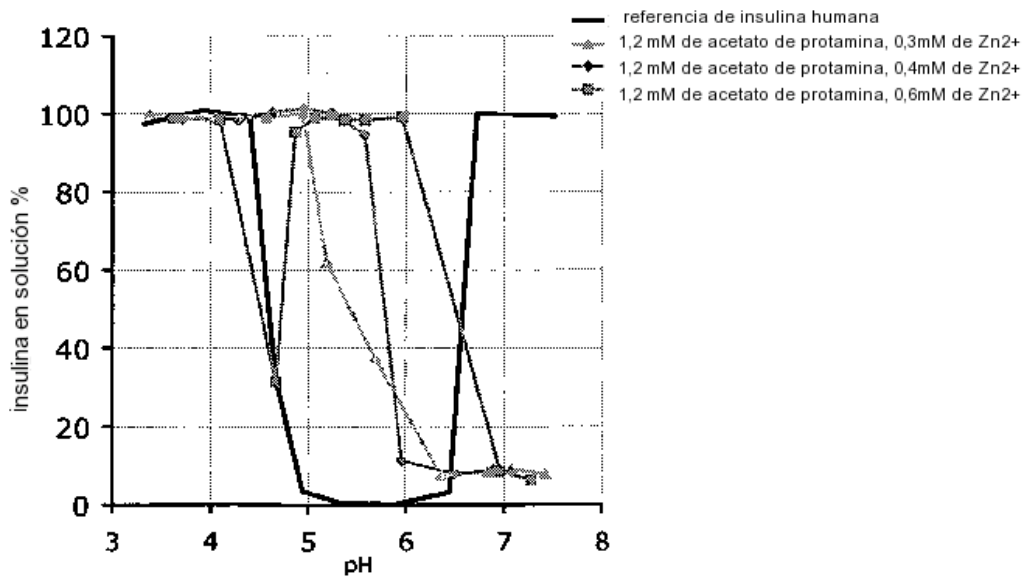


Figura 2C

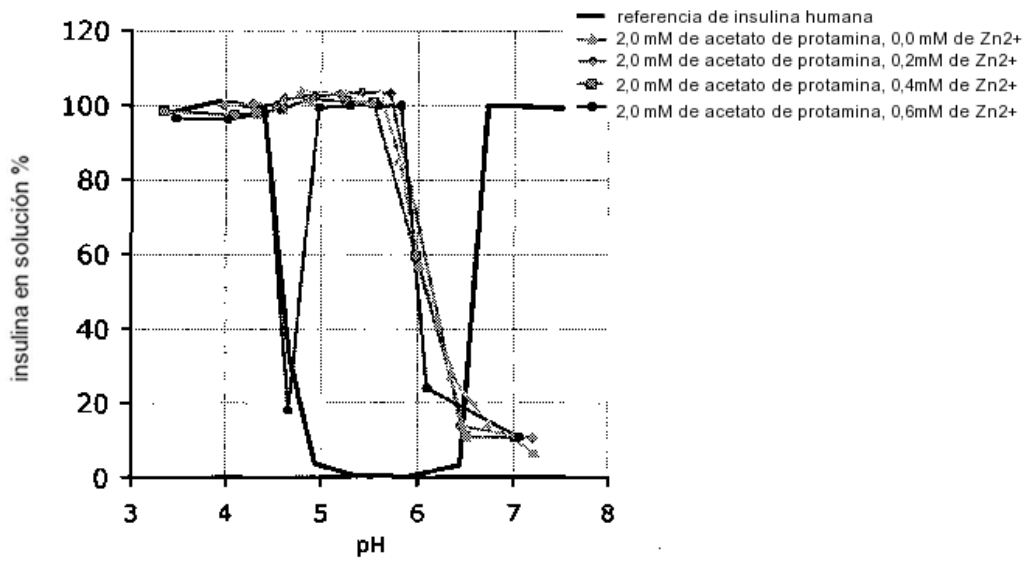


Figura 3

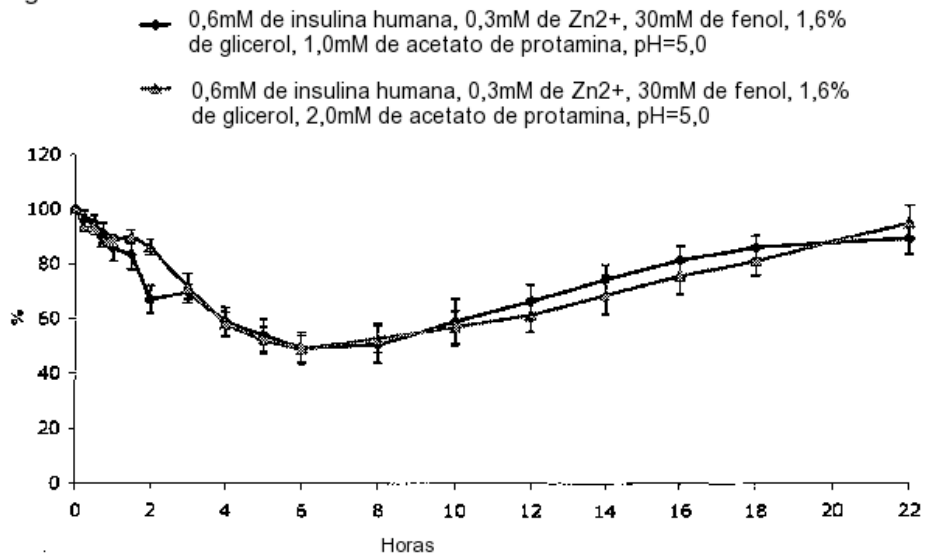


Figura 4

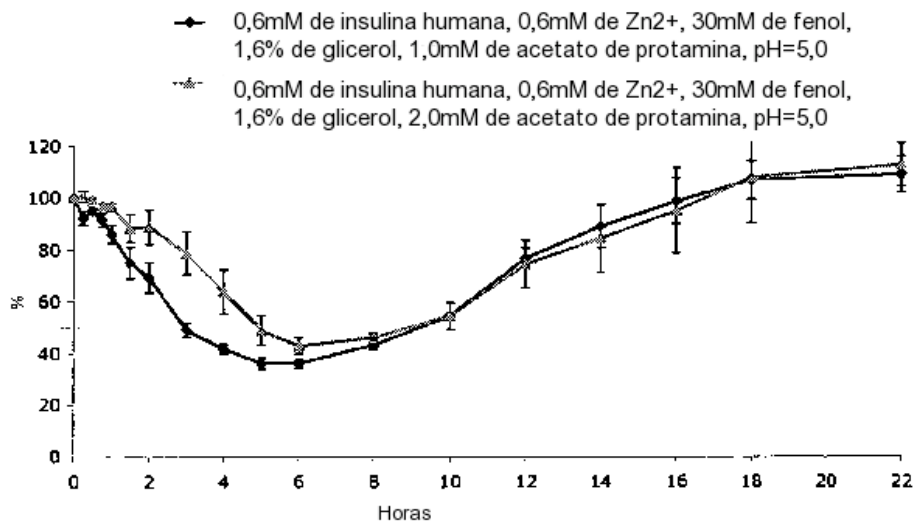


Figura 5

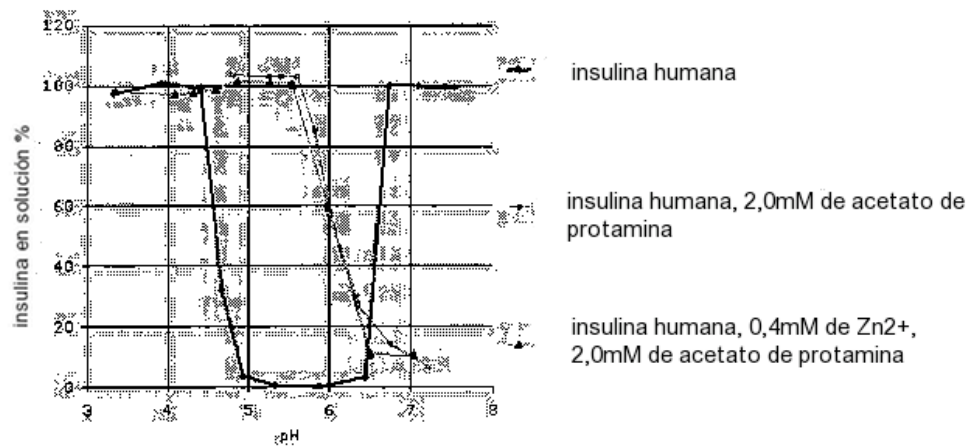


Figura 6

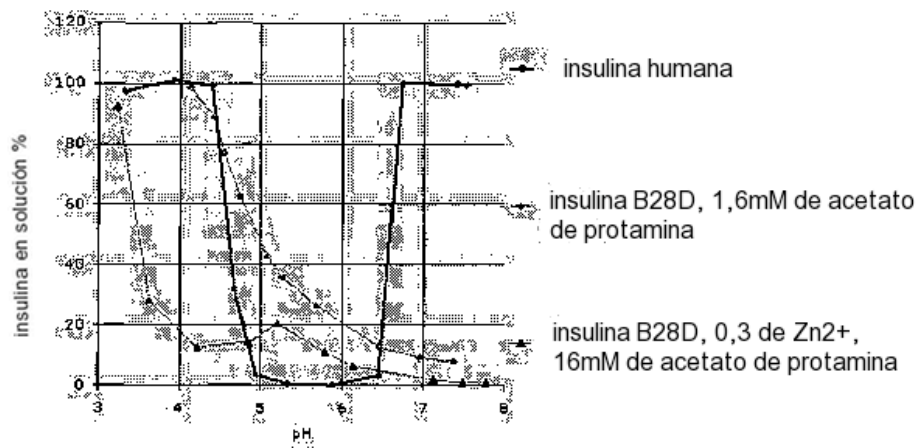


Figura 7

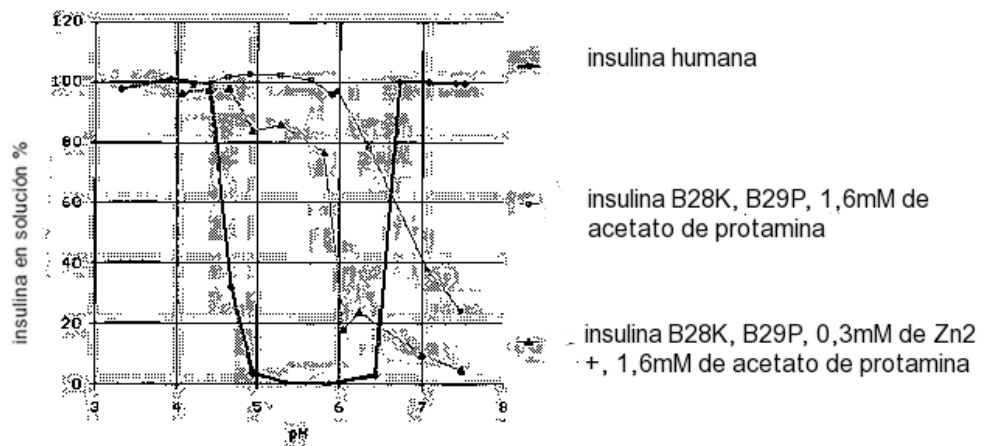


Figura 8

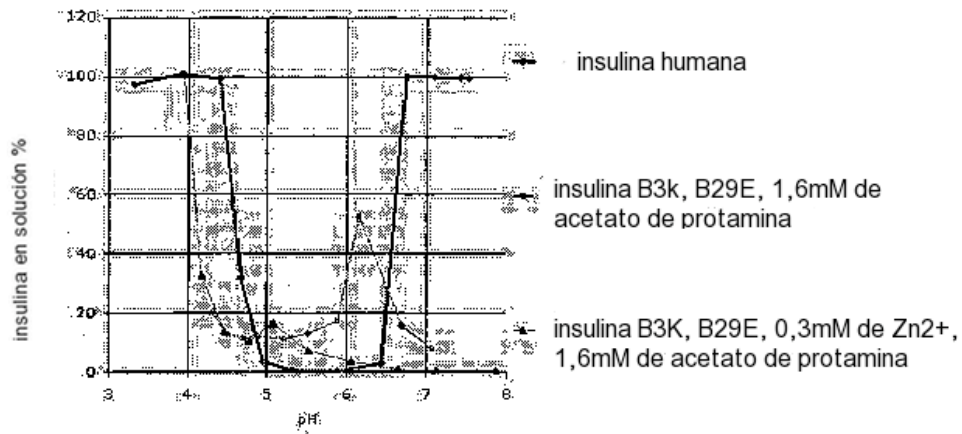


Figura 9

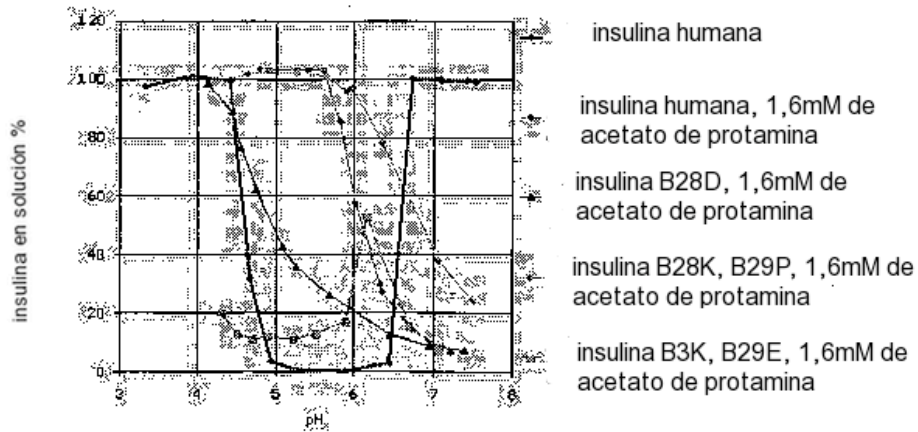


Figura 10

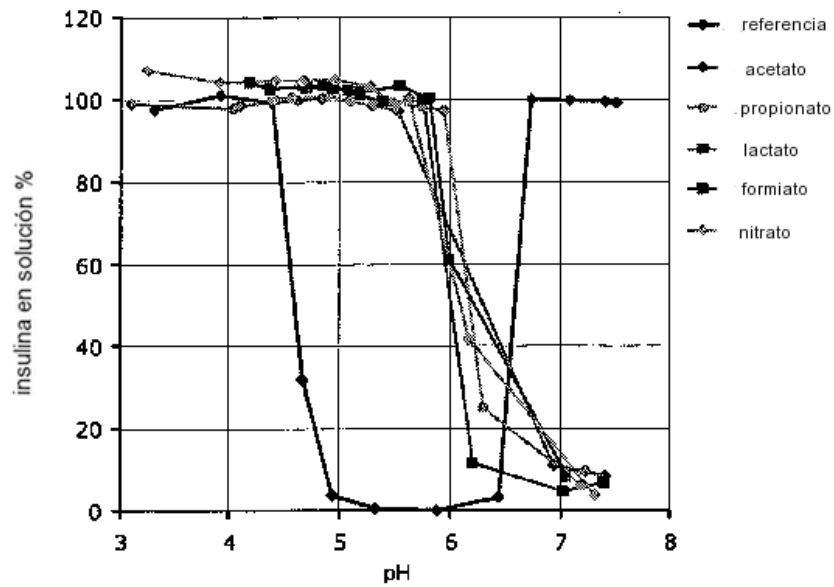


Figura 11

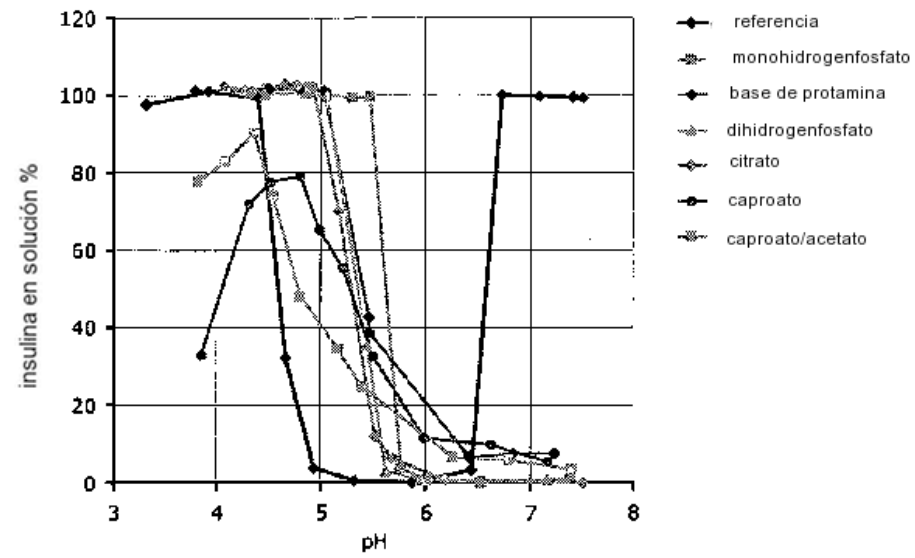


Figura 12

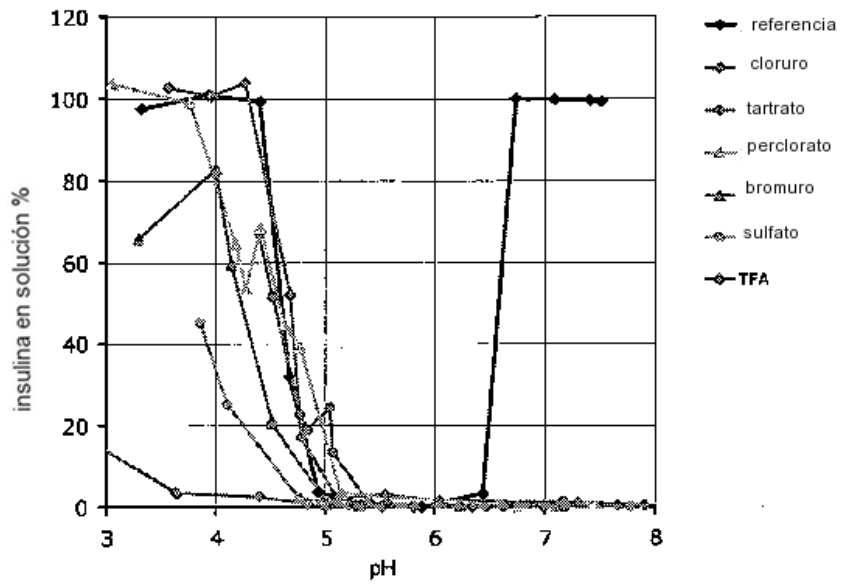


Figura 13

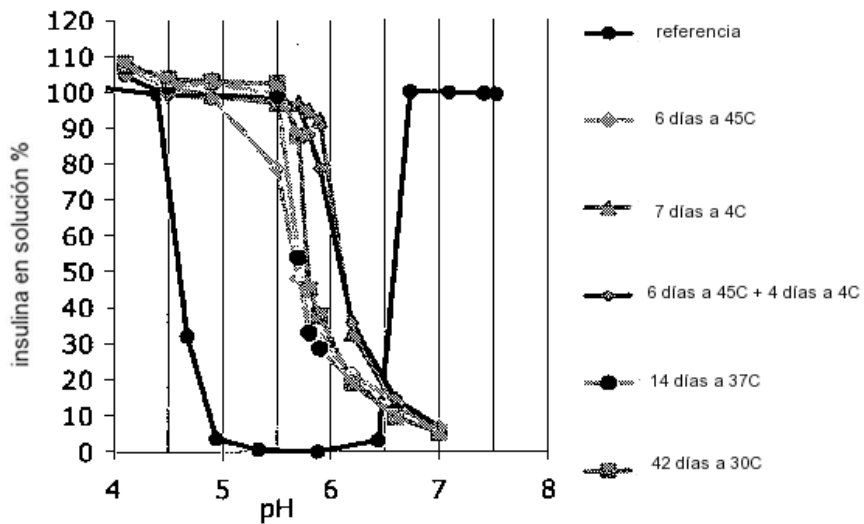




Figura 14

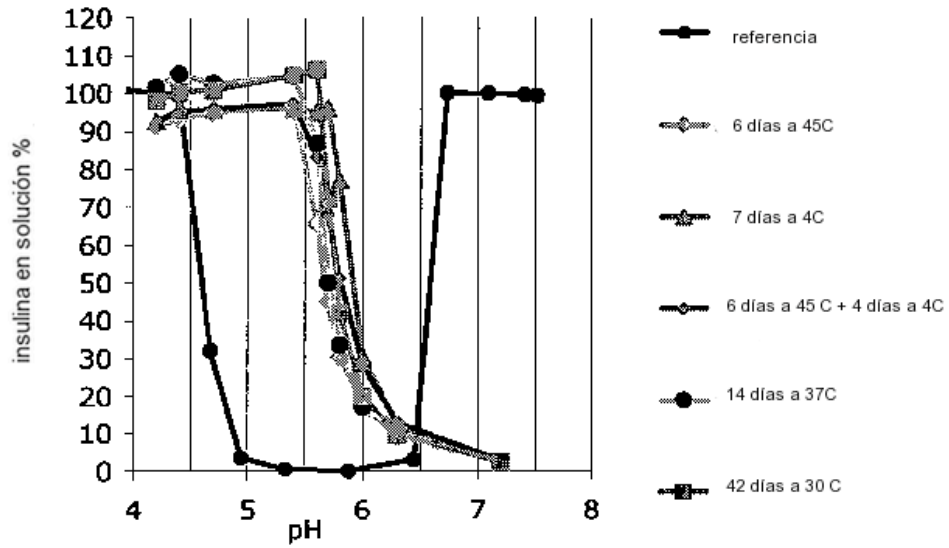


Figura 15

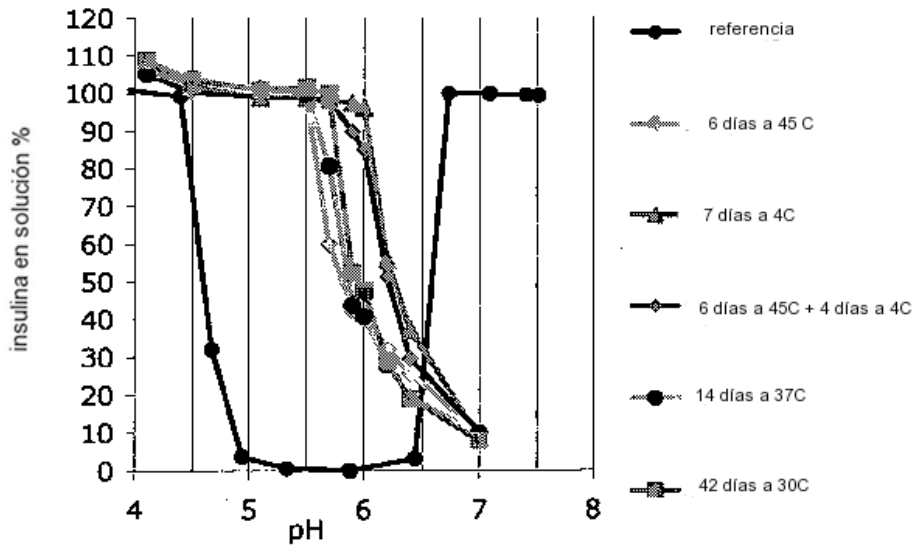


Figura 16

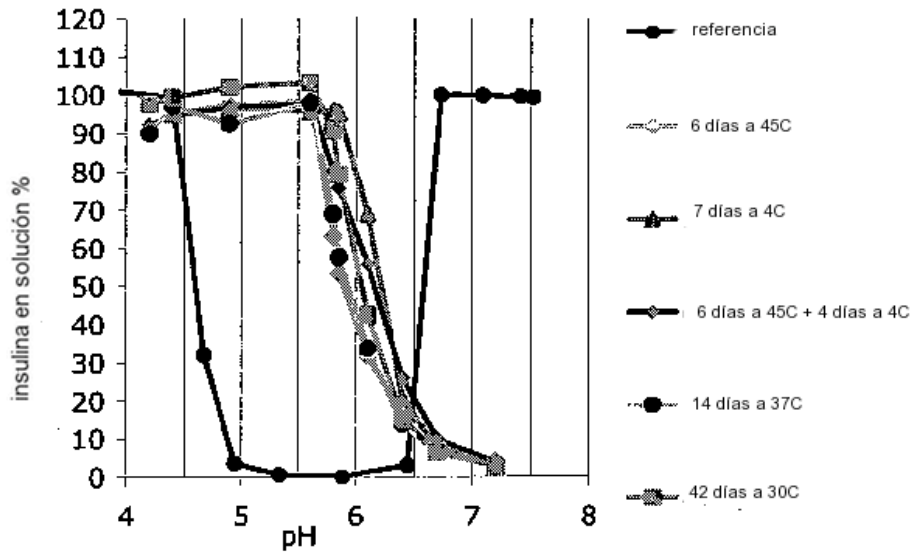


Figura 17

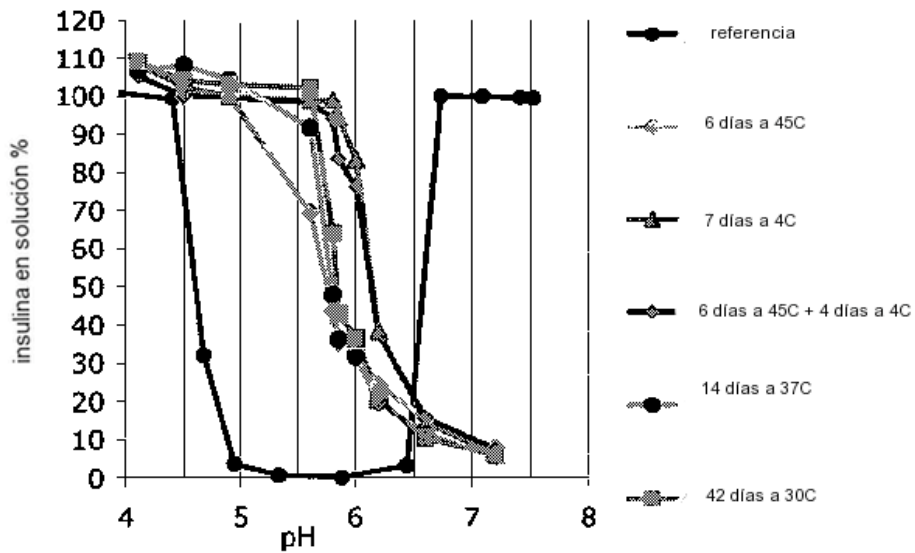


Figura 18

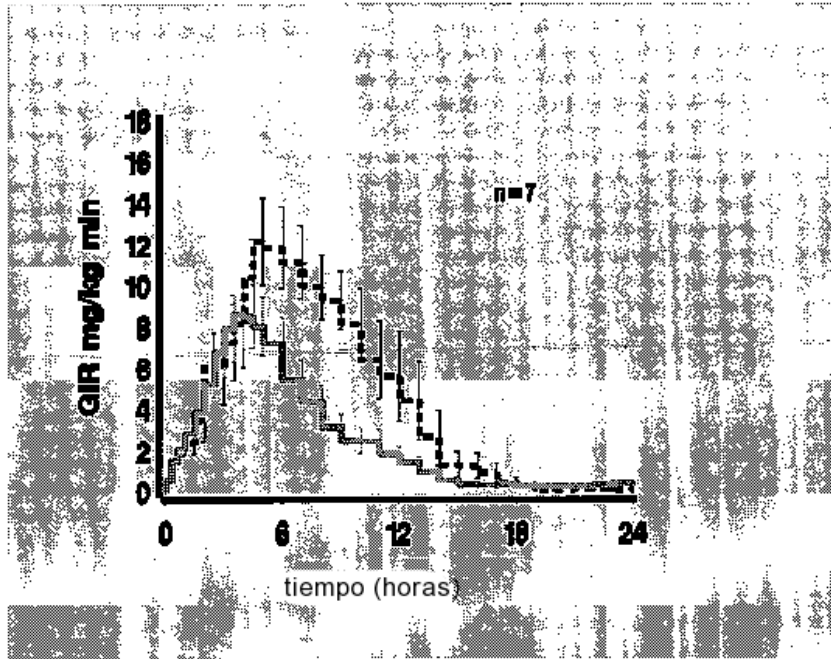


Figura 19

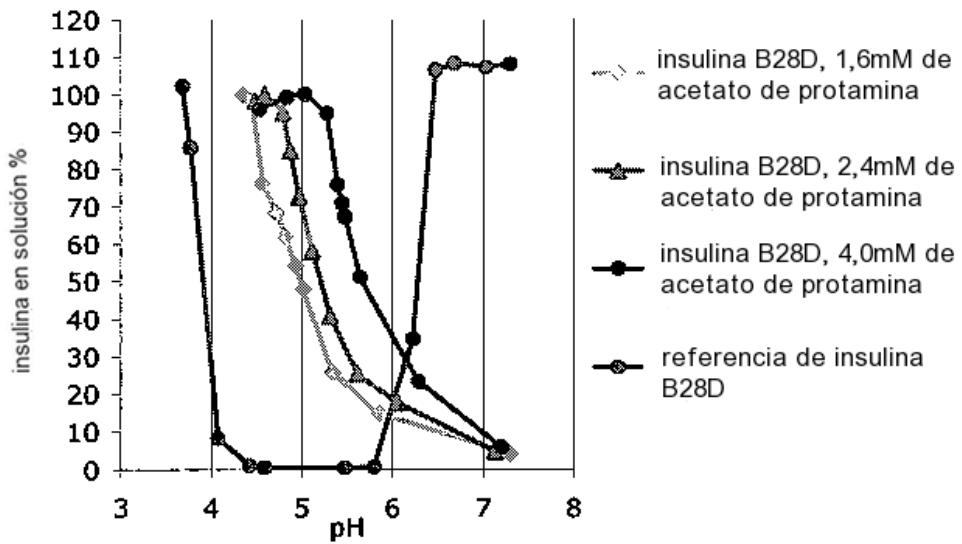


Figura 20

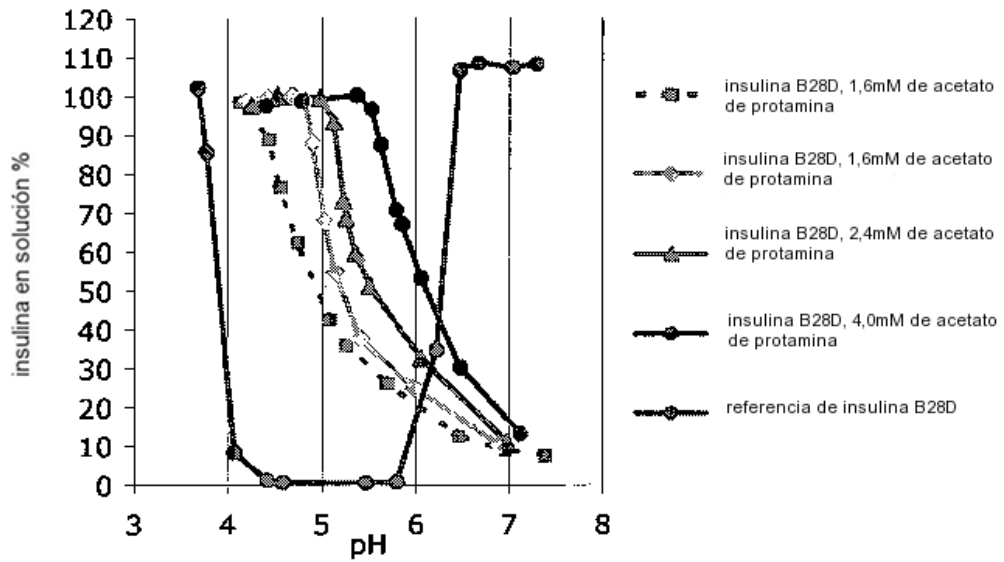


Figura 21

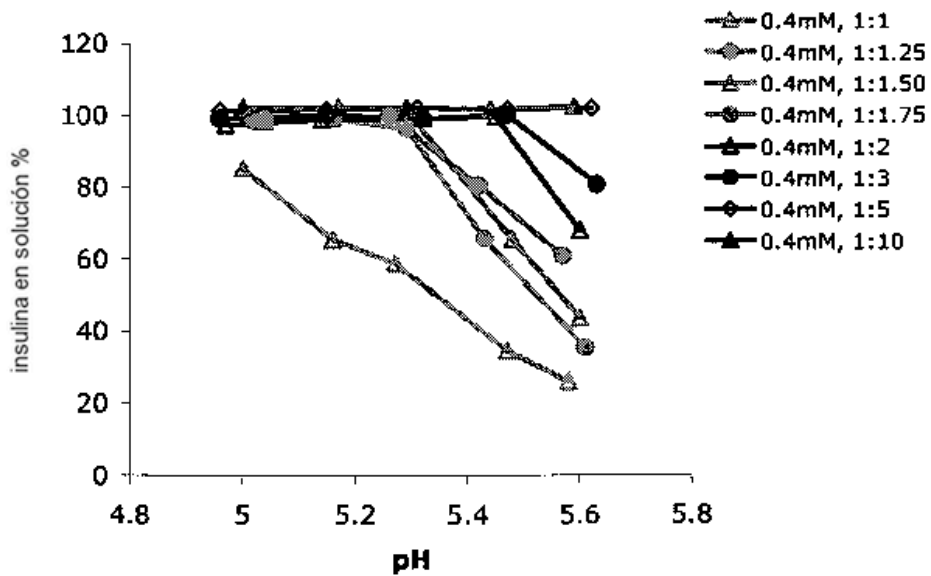


Figura 22

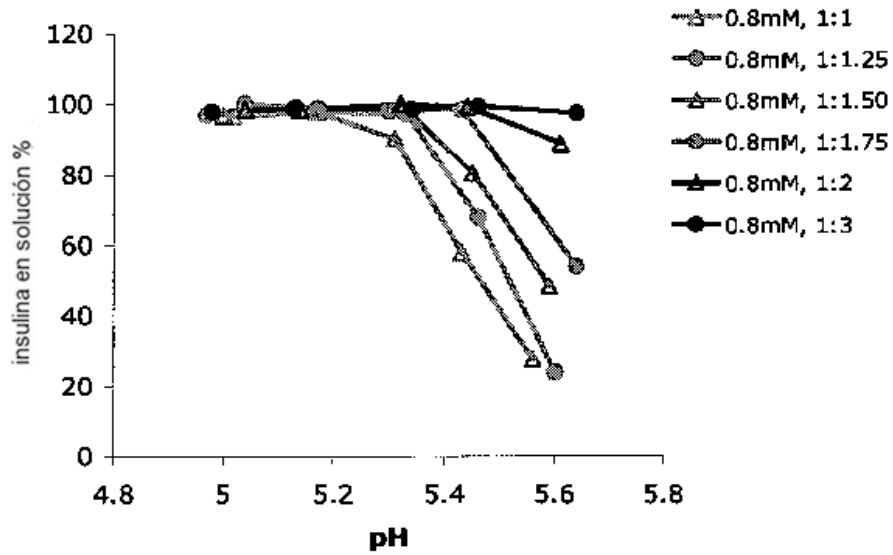


Figura 23

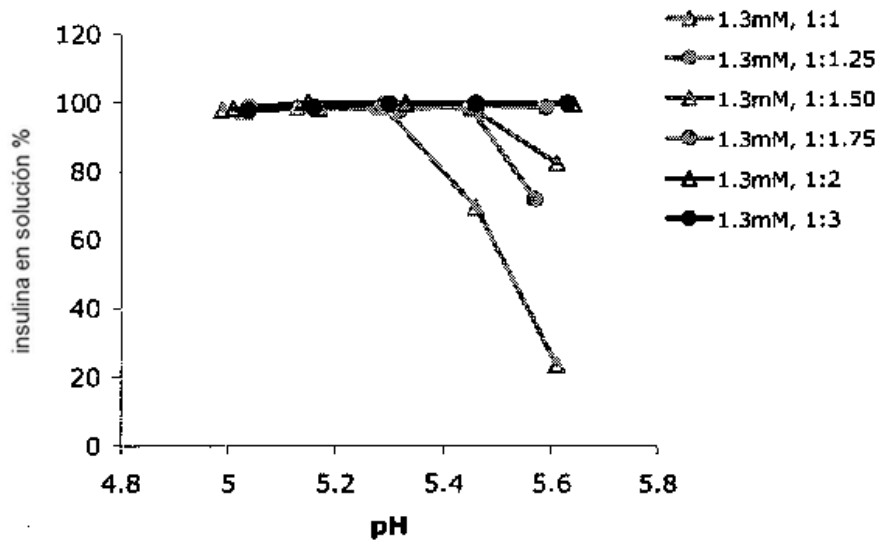


Figura 24

