

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 659**

51 Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2007 E 07726938 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012 EP 1996224**

54 Título: **Mezclas de amilina e insulina**

30 Prioridad:

15.03.2006 EP 06111170

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

08.03.2013

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)
UNDER ELMENE 16, 4. TV.
DK-2300 COPENHAGEN S, DK**

72 Inventor/es:

**SCHLEIN, MORTEN;
HANSEN, THOMAS KRUSE;
LAU, JESPER y
LUDVIGSEN, SVEND**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 397 659 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

Mezclas de amilina e insulina

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de las composiciones farmacéuticas. Más específicamente, la invención pertenece a las composiciones farmacéuticas que comprenden dos péptidos diferentes farmacéuticamente activos.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Diabetes mellitus es un trastorno metabólico en el que la capacidad para utilizar glucosa es parcialmente o completamente perdida. Aproximadamente el 5% de todas las personas sufren de diabetes y la enfermedad se acerca a proporciones epidémicas. Desde la introducción de la insulina en los años 20, esfuerzos continuos se han hecho para mejorar el tratamiento de diabetes mellitus. Ya que la gente que sufre de diabetes está sujeta a tratamiento crónico durante diferentes décadas, hay mayor necesidad de formulaciones de insulina seguras, adecuadas y que mejoren la calidad de vida.

[0003] En el tratamiento de diabetes mellitus, muchas variedades de formulaciones de insulina han sido usadas y sugeridas, tal como insulina regular, insulina isofánica (designada NPH), suspensiones de zinc de insulina (tal como Semilente[®], Lente[®] y Ultralente[®]) e insulina isofano bifásica. Algunas de las formulaciones de insulina comercial disponibles se caracterizan por 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 en forma amorfa y/o cristalina precipitadas por adición de sales de zinc solo o por adición de protamina o por una combinación de ambos.

[0004] Normalmente, las formulaciones de insulina se administran por inyección subcutánea. Lo 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 glucosa como función del tiempo desde la inyección. En este perfil, entre otras cosas, el tiempo para la aparición, el valor máximo y la duración total de la acción son importantes. Una variedad de formulaciones de insulina con diferentes perfiles de acción es deseada y solicitada por los pacientes.

[0005] La insulina humana consiste en dos cadenas de polipéptidos, 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 las demás especies tiene una construcción similar, pero puede no contener los mismos residuos de aminoácidos en las mismas posiciones. En la última década varios análogos de insulina humana han sido desarrollados. Ellos están diseñados para perfiles de acción particulares, es decir de acción rápida o acción prolongada.

[0006] Otro péptido de interés en el tratamiento de diabetes es amilina. La amilina humana es un péptido de 37 aminoácidos de longitud que tiene propiedades físico químicas que hacen problemático su uso como un fármaco. En particular, tiene una tendencia a fibrilar ex-vivo y a hacerse inefectivo debido a la precipitación. Hay actualmente en el mercado un producto de fármaco llamado Symlin que contiene un análogo de amilina humana (pramlintida) donde los tres aminoácidos en posiciones 25, 28 y 29 son sustituidos por prolina. Esto mejora sustancialmente la tendencia de fibrilación. No obstante, incluso la pramlintida es difícil dejar en solución con pH neutro y es por lo tanto proporcionada en una solución ácida, es decir Symlin.

[0007] Las acciones de la amilina en relación con la diabetes son: reducción de ingesta de alimentos conduciendo a peso corporal inferior, vaciado gástrico más lento, suavizado de perfiles de glucosa postprandial y reducción de la liberación excesiva de glucagón diabético (A. Young, Amylin: Physiology and Pharmacology, Academic Press (2005)). En general, las acciones de amilina son mediadas vía receptores del sistema nervioso central (CNS, por su sigla en inglés) identificados mejor que directamente en los órganos de objetivo.

[0008] Symlin se aprueba como un fármaco de complemento con insulina. Ensayos clínicos han revelado mejorado HbA1c en el orden de 0,3-0,6, un perfil de glucosa en sangre postprandial más suavizado y menos profundo y una reducción del peso corporal a diferencia del tratamiento con insulina solo. Symlin es habitualmente administrado como una inyección separada en un sitio de inyección separado tres veces al día. Si el paciente también usa tres inyecciones de insulina al día, este tendrá un total de seis inyecciones diarias.

[0009] La terapia de Symlin está limitada por las náuseas como un efecto secundario. Las náuseas se relacionan con la dosis pero tienen una tendencia a disminuir con el tiempo. El perfil farmacocinético de Symlin lleva a variaciones más bien grandes en los niveles de plasma a lo largo del día. Symlin tarda aproximadamente 20 minutos después de una inyección subcutánea en alcanzar C_{max} y plasma $t_{1/2}$ alrededor de 20 minutos. En última instancia esto lleva a una necesidad de tres o más inyecciones diarias de Symlin para mantener la concentración plasmática

farmacológica sin efectos secundarios sustanciales. Incluso con tres inyecciones diarias Symlin no imita el perfil de liberación natural de amilina muy bien. Amilina se libera como picos relacionados con la comida con una duración cerca de 3-6 horas a diferencia de la duración de hora 1-1½ de un perfil de Symlin inyectado. La amilina también tiene un nivel sustancial basal que es no imitado por Symlin (A. Young, Amylin: Physiology and Pharmacology, Academic Press (2005)).

[0010] Sería útil proporcionar una composición farmacéutica que combine un péptido de amilina y un péptido de insulina relacionada con la comida en una solución estable con el objetivo de ser capaz de imitar mejor el perfil fisiológico de los péptidos en un paciente en respuesta al metabolismo de glucosa y limitar el número de inyecciones diarias.

Breve descripción de los dibujos

[0011]

Figura 1 ilustra la solubilidad de una mezcla de la pramlintida análoga de amilina (^{25,28,29}Pro- h-amilina) y insulina^{A21G, B28D, desB30} contra pH.

Figura 2 ilustra la estabilidad física de una mezcla que contiene insulina^{A21G, B28D, desB30} y pramlintida (^{25,28,29}Pro- h-amilina) usando un Ensayo de fibrilación de ThT.

Figura 3 ilustra la solubilidad de una mezcla de pramlintida análoga de amilina (^{25,28,29}Pro- h-amilina) e insulina^{A21G, B28E, desB30} contra pH.

Figura 4 ilustra la estabilidad física de una mezcla de insulina^{A21G, B28E, desB30} y la pramlintida análoga de amilina (^{25,28,29}Pro- h-amilina) usando un ensayo de fibrilación de ThT.

Figura 5 ilustra la solubilidad de una mezcla de 0,6 mM insulina^{B28D}, 0,2 mM Zn(Ac)₂, 0,15 mM pramlintida (^{25,28,29}Pro- h-amilina) contra pH.

Figura 6 ilustra la solubilidad de una mezcla de 0,6mM Insulina^{B28D}, 0,2 mM Zn(Ac)₂, 0,1 mM pramlintida (^{25,28,29}Pro- h-amilina), 16mM fenol, 16mM m-cresol, 3000 ppm Poloxamer-188.

Figura 7 ilustra el efecto de un fosfolípido en la estabilidad física de una mezcla que contiene Insulina^{B28D} y pramlintida (^{25,28,29}Pro- h-amilina).

Figura 8 ilustra la solubilidad de una mezcla de 0,6 mM Insulina^{B28D}, 0,2 mM Zn(Ac)₂, 100 µM pramlintida (^{25,28,29}Pro- h-amilina), 30 mM fenol y 3 mM 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) (DMPG).

Figura 9 ilustra la estabilidad física de mezclas con Insulina^{B28D}, pramlintida (^{25,28,29}Pro- h-amilina) y DMPG usando un ensayo de fibrilación de ThT.

Figura 10 ilustra que el curso de tiempo para formación de fibrilla puede ser descrito por una curva sigmoide.

Resumen de la invención

[0012] Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica soluble para administración parenteral, que comprende un péptido de amilina e Insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K, B29E} humana.

[0013] Otro objeto de la invención es proporcionar un método para tratamiento de hiperglicemia.

Definiciones

[0014] Lo siguiente es una definición detallada de algunos de los términos usados en la especificación.

[0015] El término "cantidad efectiva" como se utiliza en este caso significa una dosificación que es suficiente para que el tratamiento del paciente sea eficaz comparado con la no existencia de tratamiento.

[0016] El término "medicamento" como se utiliza en este caso significa una composición farmacéutica adecuada para administración de los compuestos farmacéuticamente activos a un paciente.

[0017] El término "composición farmacéutica" como se utiliza en este caso significa un producto que comprende un compuesto activo o un derivado de sal opcionalmente junto con excipientes farmacéuticos tal como un tampón, conservante y modificador de tonicidad, dicha composición farmacéutica siendo útil para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad o trastorno mediante administración de dicha composición farmacéutica a una persona. Así, una composición farmacéutica es también conocida en la técnica como una fórmula farmacéutica.

- 5 [0018] El término "composición farmacéutica soluble" como se utiliza en este caso significa un péptido de amilina 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 tiene que ser reconstituida será sustancialmente soluble una vez que haya sido disuelta en el líquido de reconstitución prescrito. Debe entenderse que el pH de una composición farmacéutica que tiene que ser reconstituida es el valor de pH que se mide en la composición reconstituida producida por reconstitución en el líquido de reconstitución prescrito a temperatura ambiente.
- 10 [0019] El término "aceptable farmacéuticamente" como se utiliza en este caso significa adecuado para aplicaciones normales farmacéuticas, es decir dando lugar a efectos secundarios no serios tal como eventos adversos en pacientes etc.
- 15 [0020] El término "tampón" como se utiliza en este caso se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que reduce la tendencia de pH de la composición a cambiar en el tiempo como de otra manera ocurriría debido a reacciones químicas. Tampones incluyen productos químicos tal como fosfato sódico, TRIS, glicina y citrato sódico.
- 20 [0021] 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 aceptables farmacéuticamente son fenol, m-cresol y una mezcla de fenol y m-cresol.
- 25 [0022] El término "agente de isotonicidad" como se utiliza en este caso 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 acerque a la del plasma humano. Agentes de isotonicidad incluyen NaCl, glicerol, manitol etc.
- 30 [0023] El término "estabilizador" como se utiliza en este caso se refiere a productos químicos añadidos a composiciones farmacéuticas que contienen péptidos para estabilizar el péptido(s), es decir para aumentar el tiempo de conservación y/o tiempo en uso de tales composiciones. Ejemplos de estabilizadores usados en formulaciones farmacéuticas son L-glicina, L-histidina, arginina, polietilenglicol y carboximetilcelulosa.
- 35 [0024] El término "tensioactivo" como se utiliza en este caso se refiere a cualquier molécula o ión que esté compuesto de una parte hidrosoluble (hidrofílica), la cabeza, y un segmento liposoluble (lipofílico), la cola, como por ejemplo se ha descrito en "Surfactants and Polymers in Aqueous Solution", 2nd ed. by K. Holmberg, B. Lindman et. al.. Los tensioactivos se acumulan preferiblemente en interfaces, la parte hidrofílica se orienta hacia el agua (fase hidrofílica) y la parte lipofílica hacia la fase hidrofóbica u oleosa (es decir, aire, aceite etc.). La concentración en la que los tensioactivos empiezan a formar micelas es conocida como la concentración de micela crítica o CMC. Además, tensioactivos bajan el tensión superficial de un líquido. Tensioactivos son también conocidos como compuestos anfipáticos. El término "detergente" es un sinónimo usado para tensioactivos en general.
- 40 [0025] El término "tratamiento de una enfermedad" como se utiliza en este caso significa la gestión y cuidado de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, condición o trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, condición o trastorno. 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 asociadas a la enfermedad, condición o trastorno.
- 45 [0026] El término "prevención de una enfermedad" como se utiliza en este caso se define como la gestión y cuidado de un individuo que corre el 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.
- 50 [0027] El término "análogo" como se utiliza en este caso en referencia a un péptido significa un péptido modificado donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido han sido sustituidos por otros residuos de aminoácidos y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido eliminados del péptido y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido añadidos al péptido. En un aspecto de la invención, tal adición o delección de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el N-terminal del péptido y/o en el C-terminal del péptido. En una forma de realización un análogo comprende menos de 8 modificaciones (sustituciones, delecciones, adiciones) con respecto al péptido nativo. En una forma de realización un análogo comprende menos de 7 modificaciones (sustituciones, delecciones, adiciones) con respecto al péptido nativo. En una forma de realización un análogo comprende menos de 6 modificaciones (sustituciones, delecciones, adiciones) con respecto al péptido nativo. En otra forma de realización un análogo comprende menos de 5 modificaciones (sustituciones, delecciones, adiciones) con respecto al péptido nativo. En otra forma de realización un análogo comprende menos de 4 modificaciones (sustituciones, delecciones, adiciones) con respecto al péptido nativo. En otra forma de realización un análogo comprende menos de 3 modificaciones (sustituciones, delecciones, adiciones) con respecto al péptido nativo. En otra forma de realización un análogo comprende menos de 2 modificaciones (sustituciones, delecciones, adiciones) con respecto al péptido nativo. En otra forma de realización un análogo comprende sólo una única modificación (sustitución, delección, adición) con

respecto al péptido nativo.

[0028] En una forma de realización, la modificación(es) son sustitución(es). En otra forma de realización, la modificación(es) son delección(es). En otra forma de realización, la modificación(es) son adición(es).

[0029] El término "derivado" como se utiliza en este caso en relación con un péptido significa una proteína progenitora químicamente modificada o un análogo de la misma, donde al menos un sustituyente no está presente en la proteína progenitora o un análogo del mismo, es decir una proteína progenitora que ha sido modificada de manera covalente. Modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos de alquilo, grupos de acilo, ésteres, PEGilaciones y similares. Ejemplos de derivados de insulina humana son treonina metil éster^{B30} insulina humana y N^{εB29}-tetradecanoilo des(B30) insulina humana.

[0030] El término "péptido de insulina" como se utiliza en este caso significa un péptido que es insulina humana o una insulina humana químicamente modificada, tal como un análogo o un derivado.

[0031] El término "insulina humana" como se utiliza en este caso significa la hormona humana cuya estructura y propiedades son bien conocidas. Insulina humana tiene dos cadenas de polipéptidos que se conectan por puentes de disulfuro entre residuos de cisteína, a saber la cadena A y la cadena B. La cadena A es un péptido de aminoácido 21 y la cadena B es un péptido de aminoácido 30, las dos cadenas se conectan por tres puentes de 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.

[0032] Las mutaciones en la molécula de insulina se denominan en el superíndice que declara la cadena (A o B), la posición, y el código de letra único para el aminoácido que sustituye el aminoácido nativo. Por "desB30" se entiende una cadena B de insulina natural o un análogo de la misma que carece del aminoácido B30. Así, insulina^{A21G, B28D, desB30} humana es un análogo de insulina humana donde las posición 21 de la cadena A se muta a glicina, la posición 28 de la cadena B se muta a ácido aspártico y la posición 30 de la cadena B es eliminada.

[0033] El término "péptido de insulina relacionada 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, por ejemplo desaparición y/o aparición farmacocinética en cerdos.

[0034] Preferiblemente, la insulina humana relacionada con la comida tiene un tiempo de acción inferior a aproximadamente 5 horas. Preferiblemente, la insulina relacionada con la comida tiene un tiempo de acción en el intervalo de 0 horas a aproximadamente 4 horas. Preferiblemente, la insulina relacionada con la comida tiene un tiempo de acción similar al que se observa para composiciones farmacéuticas comerciales de Actrapid[®], Novolog[®], Humalog[®] y Apidra[®]. El término "aproximadamente" en relación al tiempo de acción de insulinas significa + o - 30 minutos.

[0035] El término "péptido de amilina" como se utiliza en este caso significa un péptido que es amilina, un análogo o derivado de la misma o un agonista de amilina. Se entiende que agonistas de amilina biológicamente activos pueden tener un grupo de amida fijado al grupo ácido del residuo de terminal C vía un enlace peptídico.

[0036] Análogos de amilina humana (h-amilina) se pueden denominar por la posición o posiciones cambiadas en el superíndice seguido de las tres letras código para el aminoácido que sustituye el aminoácido o aminoácidos nativos si varios residuos se cambian al mismo aminoácido. Así, pramlintida se puede denominar como ^{25,28,29} Pro-h-amilina indicando que las posiciones 25, 28 y 29 en la amilina humana han sido cambiadas a prolina. Por "des-¹Lys" se entiende que falta la lisina en la posición 1, por ejemplo, des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina es una amilina humana análoga donde la lisina en la posición 1 falta, el aminoácido en la posición 18 se cambia a una arginina y los dos aminoácidos en posiciones 25 y 28 se cambian a una prolina.

[0037] El término "punto isoeléctrico" como se utiliza en este caso significa el valor de pH donde la carga de red total de una macromolécula tal como un péptido es cero. En péptidos puede haber diferentes grupos cargados y en el punto isoeléctrico la suma de todas estas cargas es cero. En un pH por encima del punto isoeléctrico la carga neta total del péptido será negativa, mientras que en valores de pH por debajo del punto isoeléctrico la carga neta total del péptido será positiva.

[0038] 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 cuando el agua de adición a una composición liofilizada. La solución es frecuentemente para administración parenteral y así el agua para inyección es típicamente usado para reconstituir el material sólido.

[0039] El término "aproximadamente" 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 "aproximadamente 5 mg/mL insulina" significa una concentración de 4,5 mg/mL insulina a 5,5 mg/mL insulina. En una forma de realización, dónde el término "aproximadamente" se usa, el valor correspondiente o intervalo incluye el valor o intervalo exacto como si el término no estuviera presente.

Descripción de la invención

[0040] En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica soluble para administración parenteral, que comprende un péptido de amilina e insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana, donde el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 6,5 a pH 9,0 y que comprende además un tensoactivo aniónico donde dicho tensoactivo aniónico es un derivado de glicerofosfoglicerol seleccionado del grupo que consiste en derivado de dimiristoil o 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosforac-(1-glicerol) (DMPG).

[0041] En otro aspecto de la invención, el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de aproximadamente pH 6,8 a aproximadamente pH 8,0. En otro aspecto de la invención, el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 7,8. En otro aspecto de la invención, el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de aproximadamente pH 7,2 a aproximadamente pH 7,6.

[0042] En otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica es una solución. En otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica es un sólido. En otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica debe ser reconstituida con una solución acuosa, tal como un tampón o agua para inyección. En otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica es adecuada para administración por inyección o infusión. En otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica es adecuada para administración subcutánea. En otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica es adecuada para administración intramuscular. En otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica es adecuada para administración intravenosa.

[0043] Otra forma de realización la presente invención se refiere a una composición farmacéutica donde el péptido de insulina relacionada con comida tiene una acción temporal inferior a 4 horas.

[0044] En otra forma de realización de la invención, la concentración de dicho péptido de insulina relacionada con la comida en dicha composición farmacéutica está en el intervalo de aproximadamente 1,6 mg/mL a aproximadamente 5,6 mg/mL, o de aproximadamente 2,6 mg/mL a aproximadamente 4,6 mg/mL, o de aproximadamente 3,2 mg/mL a aproximadamente 4,0 mg/mL. En otra forma de realización de la invención, la concentración de dicho péptido de insulina relacionada con la comida está en el intervalo de aproximadamente 1,2 mg/mL a aproximadamente 5,6 mg/mL.

[0045] En otra forma de realización de la invención, la concentración de dicho péptido de insulina relacionada con la comida en dicha composición farmacéutica está en el intervalo de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, o de aproximadamente 2,5 mg/mL a aproximadamente 8,75 mg/mL, o de aproximadamente 3,5 mg/mL a aproximadamente 8,75 mg/mL, o de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 8,75 mg/mL.

[0046] En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica comprende dos péptidos de insulina diferentes.

[0047] En un aspecto de la invención, el péptido de amilina es amilina, una amilina análoga o una agonista de amilina.

[0048] "Amilina" como se usa aquí se refiere a compuestos tal como aquellos descritos en las patentes estadounidenses 5,124,314 y 5,234, 906, los cuales se incorporan aquí por referencia. El término incluye, pero no está limitado a, una hormona de péptido humano de 37 aminoácidos llamada amilina, que se cosecreta con insulina de β -células del páncreas. Amilina humana tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-su-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu-Ser-Ser-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr (identidad SEC nº1). Así, la fórmula estructural es Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-His-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu-Ser-Ser-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH₂ (identidad SEC nº 1) con un puente de disulfuro entre los dos residuos de Cys y un grupo de amida fijado al aminoácido C-terminal vía un enlace peptídico. El término también incluye variantes de amilina como presentes, y en la forma de aislable, en otras especies mamíferas. Respecto al compuesto de amilina de origen natural, el término incluye tal compuesto en forma aislada, purificada u otra que de otra manera no se encuentra en la naturaleza.

[0049] Un "agonista" de amilina se refiere a un compuesto que imita uno o más efectos (o actividades) de amilina in vitro o in vivo. Los efectos de amilina incluyen la capacidad para directa o indirectamente interactuar o enlazar con uno o más receptores que son activados o desactivado por amilina, por ejemplo, el ensayo de unión receptora y el ensayo de músculo sóleo descritos en los ejemplos 2 y 3, respectivamente, en WO 2004/037168. Preferiblemente, el

agonista de amilina no es una calcitonina, que, como se utiliza en este caso, se refiere a la calcitonina de hormona de péptido humano y variaciones de especies de ésta, tal como de rata, salmón 10 y anguila (incluida calcitonina de anguila aminosubérica).

5 [0050] Un "análogo" (o "análogo" o "agonista análogo") de amilina se refiere a un compuesto que es similar en la estructura (p. ej., derivado de la secuencia de aminoácidos primaria de amilina por sustitución de uno o más aminoácidos innaturales o naturales o peptidomiméticos) a la amilina e imita un efecto de amilina in vitro o in vivo. Análogos de amilina útil según la invención pueden también incluir fragmentos de amilina tal como aquellos descritos en EP 289287, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia. Agonistas de amilina preferidos pueden también ser compuestos con como mínimo 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con identidad SEC n° 1 y teniendo actividad de amilina. El péptido de amilina de la presente invención puede ser capaz de enlazar a o de otra manera directa o indirecta interactuar con un receptor de amilina, u otro receptor o receptores con los cuales la misma amilina pueda interactuar para suscitar una respuesta biológica, por ejemplo, reducción de la ingesta de alimento. Compuestos de la invención pueden enlazar un receptor de amilina con una afinidad mayor que 20 nM, 10 nM, 5 nM, y más preferiblemente con una afinidad mayor que 0,10 nM por ejemplo como determinado por el ensayo receptor de amilina de la sección "Métodos".

[0051] Análogos de amilina también incluyen amilina con inserciones, deleciones y/o sustituciones en al menos una o más posiciones del aminoácido de identidad SEC n° 1. El número de inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido puede ser al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20, 25 o 30. Inserciones o sustituciones pueden ser con otros aminoácidos innaturales o naturales, aminoácidos sintéticos, peptidomiméticos u otros compuestos químicos.

[0052] Un "derivado" de amilina se refiere a una amilina que es químicamente modificada tal como amilina N-metilada. En un aspecto de la invención, el péptido de amilina es amilina N-metilada en las posiciones 24 y 26, como se describe en Yan et al, PNAS, vol. 103, no. 7, p. 2046-2051, 2006.

[0053] Agonistas análogos ejemplares de amilina contemplados en el uso de la invención incluyen aquellos descritos en las patentes de EEUU 5,686,411, 6,114,304 y 6,410,511, que se incorporan aquí por referencia en su integridad.

30 [0054] Compuestos ejemplares incluyen, pero de forma no limitativa, des-¹Lys-h-amilina, ²⁸Pro-h-amilina, ^{25,28,29}Pro-h-amilina, ¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina y des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28} Pro-h-amilina, todos muestran actividad de amilina in vivo en animales de experimentación tratados, (p. ej. provocando hiperlactemia marcada seguida de hiperglicemia). Además de tener actividades características de amilina, se ha descubierto que algunos de los compuestos preferidos de la invención también poseen solubilidad más deseable y características de estabilidad cuando se compara con amilina humana. Ejemplos de estos compuestos incluyen ²⁵Pro²⁶Val²⁸, ²⁹Pro-h-amilina, ^{25,28,29}Pro-h-amilina y ¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina.

[0055] En un aspecto de la invención, dicho péptido de amilina es amilina humana. En un aspecto de la invención, dicho péptido de amilina es ^{25,28,29}Pro-h-amilina (pramlintida). En otro aspecto de la invención, dicho péptido de amilina es metilado de amilina humana en la posición 24 y 26.

[0056] En un aspecto de la invención, la concentración de dicho péptido de amilina está en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL o de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 4 mg/mL, o de aproximadamente 0,4 mg/mL a aproximadamente 1,2 mg/mL.

45 [0057] En otro aspecto de la invención, dicho péptido de insulina es insulina^{B28D} humana y dicho péptido de amilina es ^{25,28,29}Pro-h-amilina. En otro aspecto de la invención, la concentración de ^{25,28,29}Pro-h-amilina está en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL y la concentración de insulina^{B28D} humana está en el intervalo de aproximadamente 0,3 mg/mL a aproximadamente 4,0 mg/mL. En aún otro aspecto de la invención, la concentración de ^{25,28,29}Pro-h-amilina está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 4 mg/mL, y la concentración de insulina^{B28D} humana está en el intervalo de aproximadamente 0,36 mg/mL a aproximadamente 3,8 mg/mL.

50 [0058] En otro aspecto de la invención, dicho péptido de insulina es insulina^{B3K,B29E} humana y dicho péptido de amilina es ^{25,28,29}Pro-h-amilina. En otro aspecto de la invención, la concentración de insulina^{B3K,B29E} humana está en el intervalo de aproximadamente 0,36 mg/mL a aproximadamente 4,0 mg/mL.

[0059] En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende además zinc y/o calcio. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende además zinc. En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende además calcio. En una forma de realización de la invención, la proporción molar de zinc para péptido de insulina es de 1/6₂ mol/mol, preferible de 3/12 a 5/12 mol/mol. En otra forma de realización de la invención, la proporción molar de calcio para péptido de insulina es de 1/12 a 5/12 mol/mol, preferible de 1/6 a 1/3 mol/mol, tal como de 3/12 a 5/12 mol/mol.

65 [0060] Las composiciones farmacéuticas de la invención son químicamente estables y solubles al deseado pH. Por

"soluble a un pH dado" se entiende que el péptido de insulina y/o el péptido de amilina contenido en la composición de la invención está completamente disuelto al pH de la composición donde métodos para determinar si el péptido de insulina y/o el péptido de amilina contenido en la composición de la invención está disuelto se conocen en la técnica.

5 [0061] En una forma de realización, la composición farmacéutica se puede someter a centrifugado durante 20 minutos a 30 000 g y luego el péptido de insulina y/o la concentración de péptido de amilina en el sobrenadante se puede determinar por RP- HPLC. Si esta concentración es igual dentro del error experimental que el péptido de insulina y/o la concentración de péptido de amilina originalmente usado para hacer la composición, luego el péptido de insulina y/o el péptido de amilina es completamente soluble en la composición de la invención.

10 [0062] En otra forma de realización, la solubilidad de la insulina y/o el péptido(s) de amilina en una composición de la invención pueden ser simplemente determinada examinando a ojo el contenedor en el que la composición es contenida. La insulina y/o el péptido(s) de amilina es soluble si la solución es clara para el ojo y no hay materia granulosa suspendida o precipitado en los lados/fondo del contenedor.

15 [0063] En otra forma de realización, la estabilidad física de la insulina y/o el péptido(s) de amilina en una composición de la invención se puede determinar por un ensayo de fibrilación de ThT para la evaluación de estabilidad física de formulaciones de proteína.

20 [0064] En una forma de realización de la invención, la composición farmacéutica según la invención es una composición farmacéuticamente "físico estable". El término "físico estable" como se usa en este contexto significa que el péptido de amilina y el péptido de insulina relacionada con la comida no se desestabilizan el uno al otro en la composición combinada, es decir la composición farmacéutica es tan físico estable como lo menos estable del péptido de amilina y el péptido de insulina relacionada con la comida solos. La físico estabilidad se puede determinar como se describe en el ensayo de fibrilación de ThT en "Métodos".

25 [0065] Por supuesto, debe entenderse por el experto en la materia que la solubilidad de la insulina y/o el péptido(s) de amilina en una composición de la invención puede ser afectada no sólo por la composición y su pH sino también por la temperatura y el tiempo en el que la composición es almacenada antes de medición de solubilidad. Por ejemplo, mientras que almacenar la composición de la invención a una temperatura de 45°C puede estrechar el intervalo de valores de pH donde se observa solubilidad, cualquier precipitación de la insulina y/o el péptido(s) de amilina de las composiciones de la invención observada a 45°C se puede invertir por reducción de la temperatura de la composición. Así, por ejemplo, si una composición es una solución clara (es decir, soluble) a 4°C a un pH dado entre pH 5-6 pero comienza a precipitar cuando está almacenada a 45°C, este precipitado será resuelto cuando la composición se almacene a 4°C después.

30 [0066] En una forma de realización de la invención, dicha composición farmacéutica comprende un conservante. En una forma de realización dicho conservante es seleccionado del grupo que consiste en fenol, m-cresol o una mezcla de los mismos.

35 [0067] En otra forma de realización de la invención, dicha composición farmacéutica comprende un tampón. En una forma de realización dicho tampón es seleccionado del grupo que consiste en fosfato, un tampón de Good tal como TRIS, BICINE, y HEPES glicina, glicil-glicina, citrato o una mezcla de los mismos.

40 [0068] En otra forma de realización de la invención, dicha composición farmacéutica comprende un agente de isotonicidad. En una forma de realización, dicho agente de isotonicidad no es una sal. En otra forma de realización, dicho agente de isotonicidad es seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, glucosa, manitol, sorbitol, glicerol, propilenoglicol y una mezcla de los mismos.

45 [0069] En otra forma de realización de la invención, dicha composición farmacéutica comprende un estabilizador. En una forma de realización, dicho estabilizador es seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, imidazol y L-arginina. En un forma de realización, dicho estabilizador es un polietilenglicol.

50 [0070] En otra forma de realización de la invención, dicha composición farmacéutica comprende un tensioactivo. En un aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende un tensioactivo aniónico en una concentración superior a su concentración de micela crítica (CMC).

55 [0071] En un aspecto de la invención, el tensioactivo aniónico es un derivado de glicerofosfoglicerol. En un aspecto de la invención, dicho derivado de glicerofosfoglicerol es un derivado de dimiristoil, por ejemplo, 2-Dimiristoil-sn-glicero-3- fosfo-rac-(1-glicerol). En un aspecto de la invención, el derivado de dimiristoil se adiciona a una concentración entre 0,1 mM y 10 mM, preferiblemente entre 0,5 mM y 5 mM, preferiblemente entre 0,5 mM y 3 mM. En un aspecto de la invención, dicho derivado de glicerofosfoglicerol es 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) (DMPG), tal como CAS n°. 67232-80-8.

60 [0072] En un aspecto de la invención, la concentración de dicho tensioactivo es de aproximadamente 5 mg/L a

aproximadamente 50 g/L. En otro aspecto de la invención, la concentración de dicho tensioactivo es de aproximadamente 10 mg/L a aproximadamente 30 g/L. En otro aspecto de la invención, la concentración de dicho tensioactivo es de aproximadamente 20 mg/L a aproximadamente 3000 mg/L. En otro aspecto de la invención, la concentración de dicho tensioactivo es de aproximadamente 30 mg/L a aproximadamente 500 mg/L. En otro aspecto de la invención, la concentración de dicho tensioactivo es de aproximadamente 50 mg/L a aproximadamente 200 mg/L.

[0073] En un aspecto de la invención, el tensioactivo se adiciona en una concentración entre 0,1 mM y 10 mM, preferiblemente entre 0,5 mM y 5 mM, preferiblemente entre 0,5 mM y 3 mM.

[0074] En un aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende dos tensioactivos diferentes. En un aspecto de la invención, al menos uno de los dos tensioactivos diferentes es un tensioactivo aniónico.

[0075] En un aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende además una sal de protamina, donde dicha sal de protamina está presente en dicha composición en una concentración mayor que 0,25mM y donde dicha composición tiene un pH de menos de aproximadamente 7,0. En las composiciones de la invención, donde una sal de protamina se incluye, el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es en un aspecto de aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente pH 6,0, en otro aspecto de aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente pH 5,5, en otro aspecto de aproximadamente pH 4,0 a sobre pH 5,0, en otro aspecto de aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente pH 4,0 y en otro aspecto más de aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente pH 5,5.

[0076] En las composiciones de la invención, donde una sal de protamina debe ser incluida se debe incluir una sal de protamina distinta de sulfato de protamina dónde tales sales incluyen, pero de forma no limitativa, acetato, bromuro, cloruro, caproato, trifluoroacetato, HCO₃, propionato, lactato, formiato, nitrato, citrato, monohidrogenfosfato, dihidrogenfosfato, tartrato o sales percloratas de protamina o mezclas de dos sales de protamina cualquiera. "Protamina" como se utilizan en este caso se refiere al nombre genérico de un grupo de proteínas fuertemente básicas presentes en células de esperma en combinación tipo sal con ácidos nucleicos. Normalmente, protaminas para ser usadas son obtenidas de, por ejemplo salmón (salmine), trucha arco iris (iridine), arenque (clupeine), esturión (sturine) o caballa o atún españoles (tinnine) 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 principales, 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 no están presentes en la secuencia otros grupos amino, se espera que la modificación química de protamina por una sal particular sea homogénea en este contexto.

[0077] En una forma de realización, las sales de protamina usadas en la presente invención son de salmón.

[0078] En otra forma de realización, las sales de protamina usadas en la presente invención son de arenque.

[0079] En otra forma de realización, las sales de protamina usadas en la presente invención son de trucha arco iris.

[0080] En otra forma de realización, las sales de protamina usadas en la presente invención son de atún.

[0081] En otra forma de realización, la sal de protamina es seleccionada del grupo que consiste en propionato, lactato, formiato, nitrato, acetato, citrato, caproato, monohidrogenfosfato, sales dihidrogenfosfatos de protamina.

[0082] En otra forma de realización, la sal de protamina es seleccionada del grupo que consiste en propionato, lactato, formiato, nitrato y sales de acetato de protamina.

[0083] En otra forma de realización, la sal de protamina es seleccionada de sales de acetato de protamina.

[0084] En otra forma de realización, cuando la sal de protamina debe ser incluida en la composición de la invención debe ser una mezcla de dos sales diferentes, una sal será acetato y la otra sal será seleccionada del grupo que consiste en propionato, lactato, formiato, y sales de nitrato de protamina. Debe entenderse que cuando la sal de protamina que se va a incluir en la formulación de la invención debe ser una mezcla de dos sales diferentes, la proporción molar entre las dos sales diferentes puede ser de 0,1:1 a 1:1.

[0085] En otra forma de realización, cuando la sal de protamina debe ser incluida en la composición de la invención, la insulina relacionada con comida es seleccionada del grupo que consiste en insulina^{B28D} humana e insulina^{B28K,B29P} humana. En otra forma más de realización, el péptido de insulina relacionada con la comida es insulina^{B28D} humana. En otra forma más de realización, el péptido de insulina relacionada con la comida es insulina^{B28K,B29P} humana.

[0086] En una forma de realización, la proporción molar de sal de protamina para péptido de insulina en las composiciones de la invención es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100.

[0087] En otra forma de realización, la proporción molar de sal de protamina para péptido de insulina en las composiciones de la invención es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10.

5 [0088] En otra forma de realización, la proporción molar de sal de protamina para péptido de insulina en las composiciones de la invención es de aproximadamente 0,5 a 5.

[0089] En otra forma de realización, la proporción molar de sal de protamina para péptido de insulina en las composiciones de la invención es de aproximadamente 1 a 3.

10 [0090] En otro aspecto, la invención se refiere a un uso para tratar hiperglicemia por administración parenteral de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, que comprende un péptido de amilina y un péptido de insulina relacionada con la comida.

15 [0091] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un uso para tratar síndrome del atracón o bulimia que comprende administración parenteral de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, que comprende un péptido de amilina y un péptido de insulina relacionada con la comida.

20 [0092] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un uso para tratar o prevenir la diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de 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 administración parenteral de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, que comprende un péptido de amilina y un péptido de insulina relacionada con la comida.

25 [0093] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un uso para demorar o prevenir la progresión de la enfermedad en la diabetes de tipo 2 que incluye administración parenteral de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, que comprende un péptido de amilina y un péptido de insulina relacionada con la comida.

30 [0094] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un uso para disminuir la ingesta de alimento, disminuir la apoptosis β -celular, aumentar la función celular y la masa β -celular, y/o para restaurar la sensibilidad glucosa en β -células que comprenden administración parenteral de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, que comprende un péptido de amilina y un péptido de insulina relacionada con la comida.

35 [0095] En otro aspecto la presente invención se refiere a un uso para tratar cualquiera de las condiciones anteriores que comprende además administración a una persona que necesita de una cantidad farmacéuticamente pertinente de GLP-1 o un derivado de GLP-1. En otra forma de realización el derivado de GLP-1 que se debe emplear en combinación con una composición de la presente invención se refiere a GLP-1(1-37), exendina-4(1-39), fragmentos insulíntrópicos de los mismos, análogos insulíntrópicos de los mismos y derivados insulíntrópicos de los mismos. Fragmentos insulíntrópicos de GLP-1(1-37) son péptidos insulíntrópicos para los que la secuencia entera se puede encontrar en la secuencia de GLP-1(1-37) y donde al menos un aminoácido terminal ha sido eliminado. Ejemplos de fragmentos insulíntrópicos de GLP-1(1-37) son GLP-1(7-37) donde los residuos de aminoácidos en posiciones 1-6 de GLP-1(1-37) han sido eliminados, y GLP-1(7-36) donde los residuos de aminoácidos en la posición 1-6 y 37 de GLP-1(1-37) han sido eliminados. Ejemplos de fragmentos insulíntrópicos de exendina-4(1-39) son exendina-4(1-38) y exendina-4(1-31). La propiedad insulíntrópica 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 para un animal y controlando la concentración de insulina en el tiempo. Análogos insulíntrópicos de GLP-1(1-37) y exendina-4(1-39) se refieren a las moléculas respectivas donde uno o más de los residuos de aminoácidos han sido intercambiados por otros residuos de aminoácidos y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido eliminados y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido adicionados con la condición de que dicho análogo bien sea insulíntrópico o sea un profármaco de un compuesto insulíntrópico. Ejemplos de análogos insulíntrópicos de GLP-1(1-37) son por ejemplo Met³-GLP-1(7-37) donde la alanina en la posición 8 ha sido sustituida por metionina y los residuos de aminoácidos en la posición 1 a 6 han sido eliminados, y Arg³⁴-GLP-1(7-37) donde la valina en la posición 34 ha sido sustituida por arginina y los residuos de aminoácidos en la posición 1 a 6 han sido eliminados. Un ejemplo de un análogo insulíntrópico de exendina-4(1-39) es Ser² Asp³-exendina-4(1-39) donde los residuos de aminoácidos en la posición 2 y 3 ha sido sustituidos con serina y ácido aspártico, respectivamente (este análogo particular también se conoce en la técnica como exendina-3). Derivados insulíntrópicos de GLP-1(1-37), exendina-4(1-39) y sus análogos son lo que el experto en la técnica considera derivados de estos péptidos, es decir teniendo al menos un sustituyente que no está presente en la molécula de péptido progenitor con la condición de que dicho derivado bien sea insulíntrópico o sea un profármaco de un compuesto insulíntrópico. Ejemplos de sustituyentes son amidas, carbohidratos, grupos alquilo y sustituyentes lipofílicos. Ejemplos de derivados insulíntrópicos de GLP-1(1-37), exendina-4(1-39) y sus análogos son GLP-1(7-36)-amida, Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε-(^γ-glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1(7-37) y Tyr³¹-exendina-4(1-31)-amida. Además, ejemplos de GLP-1(1-37), exendina-4(1-39), fragmentos insulíntrópicos, análogos insulíntrópicos de los mismos y derivados insulíntrópicos de los mismos son descritos en WO 98/08871, WO 99/43706, US 5424286 y WO 00/09666.

65

[0096] Cuando las composiciones farmacéuticas según la presente invención se administran por inyección, por ejemplo vía una pluma o una jeringa, son típicamente administradas 3 veces al día, preferiblemente antes de las comidas. Se prefiere que cada administración comprenda menos aproximadamente 500 µL, o menos aproximadamente 200 µL ya que volúmenes mayores de inyección son desagradables para el paciente. Cuando las composiciones farmacéuticas según la presente invención se administran por una bomba, es típicamente administrado continuamente o de forma discontinua tal como vía al menos 10 administraciones o más al día.

[0097] En una forma de realización de la invención, el uso comprende administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que es de 30 µl/día a aproximadamente 600 µl/día, tal como a partir de aproximadamente 60 µl/día a aproximadamente 360 µl/día. En otra 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 donde dicha administración discontinua de dicha composición farmacéutica es por una dosificación por pulsos para un periodo temporal que es inferior al periodo entre impulsos.

[0098] En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un péptido de amilina e insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana para la producción de una composición farmacéutica para administración parenteral, que comprende un péptido de amilina e insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana. 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 donde dicha administración discontinua de dicha composición farmacéutica es por una dosificación por pulsos para un periodo temporal que es inferior al periodo entre impulsos.

[0099] En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un péptido de amilina e insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de hiperglicemia por administración parenteral, esta composición comprende un péptido de amilina y un péptido de insulina relacionada con la comida.

[0100] En otro aspecto, la presente invención se refiere a composición farmacéutica según la invención para uso en el tratamiento de hiperglicemia. En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un péptido de amilina e insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de síndrome del atracón o bulimia.

Más formas de realización de la invención

[0101]

1. Una composición soluble farmacéutica para administración parenteral, que comprende un péptido de amilina e insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana, donde el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 6,5 a pH 9,0, y que comprende además un tensioactivo aniónico donde dicho tensioactivo aniónico es un derivado de glicerofosfoglicerol seleccionado del grupo que consiste en derivado de dimiristoil o 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) (DMPG).

2. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 1, donde el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de aproximadamente pH 6,8 a aproximadamente pH 8,0.

3. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 1, donde el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 7,8.

4. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 1, donde el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de aproximadamente pH 7,2 a aproximadamente pH 7,6.

5. La composición farmacéutica como definida en cualquier de las formas de realización 1-4, donde la composición es una solución.

6. La composición farmacéutica como definida en cualquier de las formas de realización 1-4, donde la

composición es un sólido.

- 5 7. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 6, que debe ser reconstituida con una solución acuosa, tal como un tampón o agua para inyección.
8. La composición farmacéutica como definida en cualquier de las formas de realización 1-7, que es conveniente para administración por inyección o infusión.
- 10 9. La composición farmacéutica como definida en cualquier de las formas de realización 1-8, donde insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana tiene una acción de tiempo inferior a 4 horas.
- 15 10. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 1, donde dicho análogo de insulina humana relacionada con la comida es insulina^{B28D} humana.
11. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 1, donde dicho análogo de insulina humana relacionada con la comida es insulina^{B3K,B29E} humana.
- 20 12. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-11, donde la concentración de insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana está en el intervalo de aproximadamente 1,6 mg/mL a aproximadamente 5,6 mg/mL, o de aproximadamente 2,6 mg/mL a aproximadamente 4,6 mg/mL, o de aproximadamente 3,2 mg/mL a aproximadamente 4,0 mg/mL.
- 25 13. La composición farmacéutica como definida en cualquier de las formas de realización 1-11, donde la concentración de insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana está en el intervalo de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, o de aproximadamente 2,5 mg/mL a aproximadamente 8,75 mg/mL, o de aproximadamente 3,5 mg/mL a aproximadamente 8,75 mg/mL, o de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 8,75 mg/mL.
- 30 14. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-13, donde dicho péptido de amilina es amilina, un análogo de amilina o un agonista de amilina.
- 35 15. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-14, donde dicho péptido de amilina es amilina humana.
16. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-14, donde dicho péptido de amilina es ^{25,28,29}Pro-h-amilina.
- 40 17. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-14, donde dicho péptido de amilina es metilado de amilina humana en la posición 24 y 26.
- 45 18. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-17, donde la concentración de dicho péptido de amilina está en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL o de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 4 mg/mL, o de aproximadamente 0,4 mg/mL a aproximadamente 1,2 mg/mL.
- 50 19. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-18, donde la concentración de dicho péptido de amilina está en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL y la concentración de insulina humana está en el intervalo de aproximadamente 3,2 mg/mL a aproximadamente 4,0 mg/mL.
- 55 20. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-19, donde el péptido de insulina es insulina^{B28D} humana y dicho péptido de amilina es ^{25,28,29}Pro-h-amilina.
21. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 20, donde la concentración de ^{25,28,29}Pro-h-amilina está en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL y la concentración de insulina^{B28D} humana está en el intervalo de aproximadamente 0,3 mg/mL a aproximadamente 4,0 mg/mL.
- 60 22. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 21, donde la concentración de ^{25,28,29}Pro-h-amilina está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 4 mg/mL, y la concentración de insulina^{B28D} humana está en el intervalo de aproximadamente 0,36 mg/mL a aproximadamente 3,8 mg/mL.
- 65 23. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-22, donde el péptido de insulina es insulina^{B3K,B29E} humana y dicho péptido de amilina es ^{25,28,29}Pro-h-amilina.
24. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 23, donde la concentración de

insulina^{B3K,B29E} humana está en el intervalo de aproximadamente 0,36 mg/mL a aproximadamente 4,0 mg/mL.

- 5 25. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-24, que comprende zinc y/o calcio.
26. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 25, donde la proporción molar de zinc para insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana es de 1/6½ mol/mol, preferible de 3/12 a 5/12 mol/mol.
- 10 27. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 25, donde la proporción molar de calcio para insulina^{B28D} humana insulina^{B3K,B29E} humana es de 3/12 a 5/12 mol/mol, preferible de 1/6 a 1/3 mol/mol.
- 15 28. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-27, donde dicha composición farmacéutica comprende un conservante.
29. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-28, donde dicho conservante es seleccionado del grupo que consiste en fenol, m-cresol o una mezcla de los mismos.
- 20 30. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-29, donde dicha composición farmacéutica comprende un tampón.
- 25 31. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 30, donde dicho tampón es seleccionado del grupo que consiste en fosfato, un tampón de Good tal como TRIS, BICINE y HEPES, glicina, glicil-glicina, citrato o una mezcla de los mismos.
32. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-31, donde dicha composición farmacéutica comprende un agente de isotonicidad.
- 30 33. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 32, donde dicho agente de isotonicidad no es una sal.
- 35 34. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 32, donde dicho agente de isotonicidad es seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, glucosa, manitol, sorbitol, glicerol, propilenoglicol o una mezcla de los mismos.
- 35 35. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-34, que comprende además un estabilizador.
- 40 36. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 35, donde dicho estabilizador es seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, imidazol y L-arginina.
- 45 37. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 35, donde dicho estabilizador es un polietilenglicol.
- 50 38. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 1, que comprende además una sal de protamina, donde dicha sal de protamina está presente en dicha formulación en una concentración mayor que 0,25mM y donde dicha formulación tiene un pH inferior a aproximadamente 7,0.
- 55 39. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 38, donde la proporción molar de sal de protamina para insulina es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100.
- 40 40. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 39, donde la proporción molar de sal de protamina para insulina es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10.
- 60 41. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 40, donde la proporción molar de sal de protamina para insulina es de aproximadamente 0,5 a 5.
- 65 42. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 38-41, donde la sal de protamina es seleccionada del grupo que consiste en propionato, lactato, formiato, sales de nitrato y acetato de protamina.
43. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 42, donde la sal de protamina es acetato de protamina.
44. 44. La composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 38-43, como

además definida en cualquiera de las formas de realización 1-37.

45. La composición farmacéutica como definida en la forma de realización 1, donde dicho análogo de insulina humana relacionada con la comida es insulina^{B28D} humana.

46. Un método para tratamiento de hiperglicemia que comprende administración parenteral de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-45.

47. El método como definido en la forma de realización 46, donde dicha cantidad eficaz de la composición farmacéutica es de aproximadamente 30 µl/día a aproximadamente 600 µl/día, tal como a partir de aproximadamente 60 µl/día a aproximadamente 360 µl/día.

48. El método como definido en cualquiera de las formas de realización 46-47, donde la administración es por inyección subcutánea.

49. El método como definido en cualquiera de las formas de realización 46-48, donde la administración es por una bomba.

50. El método como definido en cualquiera de las formas de realización 46-49, donde la administración es por una bomba que entrega una cantidad discontinua de dicha composición farmacéutica.

51. El método como definido en la forma de realización 50, donde dicha administración discontinua de dicha composición farmacéutica es por una dosificación por pulsos para un periodo de tiempo que es inferior al periodo de tiempo entre impulsos.

52. El uso de insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana y un péptido de amilina para la producción de una composición farmacéutica como definida en cualquiera de las formas de realización 1-45.

53. El uso como definido en la forma de realización 52, donde dicha composición farmacéutica es de inyección subcutánea.

54. El uso como definido en cualquiera de las formas de realización 52-53, donde la administración es por una bomba.

55. El uso como definido en cualquier de las formas de realización 52-54, donde la administración es por una bomba que entrega una cantidad discontinua de dicha composición farmacéutica.

56. El uso como definido en la forma de realización 55, donde dicha administración discontinua de dicha composición farmacéutica es por una dosificación por pulsos para un periodo temporal que es inferior al periodo temporal entre impulsos.

57. Uso de un péptido de insulina y un péptido de amilina para la producción de una composición farmacéutica tal y como se define en cualquiera de las formas de realización 1-45 para el tratamiento de hiperglicemia.

58. Uso de un péptido de insulina y un péptido de amilina para la producción de una composición farmacéutica tal y como se define en cualquiera de las formas de realización 1-45 para el tratamiento de síndrome del atracón o bulimia.

[0102] Las características descritas en la descripción precedente pueden, tanto separadamente y como en cualquier combinación de las mismas, ser material para percatarse de la invención en formas diversas de la misma.

[0103] La presente invención es posteriormente ilustrada en los siguientes métodos representativos y ejemplos que, no obstante, no están destinados a limitar el ámbito de la invención de ninguna manera.

Métodos

Ensayo de fibrilación de ThT

[0104] La estabilidad física baja de un péptido puede llevar a formación de fibrilla amiloide, lo que es observado como estructuras bien ordenadas tipo hebra macromoleculares en la muestra finalmente dando como resultado formación de gel. En una Aplicación de ensayo de fibrilación de ThT se usa una pequeña sonda indicadora de molécula. Tioflavina T (TT) tiene una firma de fluorescencia diferente cuando se enlaza a fibrillas (Naiki et al. (1989) Anal. Biochem. 177, 244-249 ; LeVine (1999) Methods. Enzymol. 309, 274-284).

[0105] El curso de tiempo para formación de fibrilla puede ser descrito por una curva sigmoide como se muestra en Figura 10 con la expresión siguiente (Nielsen et al. (2001) Biochemistry 40, 6036-6046):

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

5 [0106] Aquí, F es la fluorescencia de ThT en el 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 kappa = 1/τ.

10 [0107] La formación de un producto intermedio parcialmente plegado del péptido es sugerida como un mecanismo de inicio general para fibrilación. Pocos de aquellos productos intermedios forman núcleo para formar un molde sobre el que más productos intermedios puedan ensamblarse y la fibrilación proceda. 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 misma es formada.
Preparación de la muestra

15 [0108] Muestras fueron preparadas justo antes de cada ensayo. Cada composición de muestra es descrita en las leyendas. El pH de la muestra fue ajustado al valor deseado usando cantidades apropiadas de concentrado NaOH y HClO₄. Tioflavina T se añadió a las muestras de una solución madre en H₂O a una concentración final de 1 μM.

20 [0109] Partes alícuotas de muestra de 200 μl fueron colocadas en un placa de microtitulación de 96 pocillos (Packard OptiPlate™-96, poliestireno blanco). Normalmente, se colocaron ocho réplicas de cada muestra (correspondientes a una condición de prueba) en una columna de pocillos. La placa fue sellada con cinta adhesiva (Qiagen).

Incubación y medición de fluorescencia

25 [0110] Incubación a temperatura dada, agitación y medición de la emisión de fluorescencia de ThT fueron hechas en un lector de placas de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystems). La temperatura fue ajustada a 37 °C. La agitación orbital fue ajustada a 960 r.p.m. Con una amplitud de 1 mm en todos los datos presentados. Medición de fluorescencia fue hecha usando excitación a través de un filtro de 444 nm y medición de emisión a través de un filtro de 485 nm.

30 [0111] Cada uno fue iniciado al incubar la placa a la temperatura de ensayo durante 10 min. La placa fue medida cada 20 minutos durante un periodo de tiempo deseado. Entre cada medición, la placa fue agitada y calentada como se describe.

35 Manipulación de datos

40 [0112] Los puntos de medición fueron guardados en formato de Microsoft Excel para tratamiento posterior y para dibujar la curva y los ajustes fueron realizados usando GraphPad Prism. La emisión de fondo de ThT en ausencia de fibrillas fue insignificante. Los puntos de datos son típicamente un promedio de ocho muestras y se muestran con barras de error de desviación típica. Sólo los datos obtenidos en el mismo experimento (es decir, muestras en la misma placa) se presentan en el mismo gráfico lo que asegura una medida relativa de fibrilación entre experimentos.

45 [0113] El conjunto de datos se puede ajustar a Eq. (1). No obstante, ya que las curvas sigmoidales completas en este caso no son siempre conseguidas durante el tiempo de medición, el grado de fibrilación se expresa como Fluorescencia de ThT contabilizada como el promedio de las ocho muestras y mostrada con la desviación típica a varios puntos de tiempo.

Solubilidad de proteína

50 [0114] La solubilidad de péptidos y proteínas depende del pH de la solución. Frecuentemente una proteína o péptidos precipita a y/o cerca de su punto isoeléctrico (pI), en el que su carga neta es cero. A bajo pH (es decir, inferior al pI) proteínas y péptidos son típicamente positivamente cargados, a pH superior al pI ellos son típicamente cargados negativamente.

55 [0115] Un requisito para coformulación de una mezcla que consiste en una insulina y una molécula de amilina es que ambos péptidos permanezcan solubles en concentraciones suficientes a un pH dado, lo que es conveniente para formular el producto de fármaco y para la administración del producto de fármaco al paciente, por ejemplo por inyección subcutánea.

60 [0116] Solubilidad contra curvas de pH fue medida de la siguiente manera. Una formulación fue preparada y partes alícuotas fueron ajustadas a valores de pH en el intervalo deseado añadiendo HClO₄ y NaOH. Estas muestras fueron dejadas para equilibración a temperatura ambiente durante 2 - 3 días. Luego las muestras fueron centrifugadas. Una

pequeña alícuota de cada muestra fue retirada para análisis de HPLC inverso para determinar la concentración de proteínas en la solución. El pH de cada muestra fue medido después del centrifugado, y la concentración de cada proteína fue representada contra el pH medido en cada muestra.

5 Ensayo de unión al receptor de amilina

[0117] Para el ensayo de unión al receptor, membranas de las células de amilina 3(a)/CRE-luc descritas abajo pueden ser utilizadas. El trazador es tyr-pramlintida iodado con ¹²⁵I en la tirosina N-terminal. Microesferas de SPA-WGA (GE Healthcare RPNQ0001) se incuban en un Optiplate de 96 pocillos en un tampón con 50 mM Hepes, 5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 0,025% Tween-20, pH 7,4 con membranas, trazador y una serie de diluciones del análogo de amilina.

[0118] Tras la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente las placas se centrifugan y se cuentan en un Topcounter. El EC50 se calcula como una medida de afinidad receptora.

15 Ensayo de luciferasa de amilina

1. Esquema de ensayo de amilina

[0119] Se ha publicado anteriormente (Poyner DR et al 2002, Pharmacological Reviews 54(2) 233-246) que la activación de receptores de amilina (coexpresión de receptor de calcitonina y actividad receptora que modifica péptidos (RAMP)) por amilina conduce a un aumento en la concentración intracelular de AMPc. En consecuencia, la transcripción se activa en los promotores que contienen copias múltiples del elemento de respuesta de AMPc (CRE, por su sigla en inglés). Es así posible medir actividad de amilina usando un gen reportero de luciferasa CRE introducido en células BHK que también expresan un receptor de amilina.

2. Construcción de una línea celular de amilina 3(a)/CRE-luc

[0120] Una línea celular BHK570 estable modificada con el receptor de calcitonina humana (CTa) y un gen reportero de luciferasa CRE-sensible. La línea celular fue de nuevo modificada con RAMP-3, usando métodos estándar. Esto convierte el receptor de calcitonina en un receptor de amilina 3(a). Metotrexato, neomicina e higromicina son marcadores de selección para luciferasa, el receptor de calcitonina y RAMP-3, respectivamente.

3. Ensayo de luciferasa de amilina

[0121] Para ejecutar ensayos de actividad, células de amilina 3(a)//CRE-luc BHK se siembran en placas de cultivo blancas de 96 pocillos a una densidad de aproximadamente 20 000 células/pocillo. Las células están en medio de cultivo 100 µl (DMEM con 10% FBS, 1% Pen/Strep, 1 mM Na-piruvato, 250 nM metotrexato, 500 µg/ml neomicina, y 400 µg/ml higromicina). Después de incubación durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂, el medio de cultivo se sustituye por medio de ensayo 50 µl/pocillo (DMEM (sin rojo de fenol), Glumamax™, 10% FBS y 10 mM Hepes, pH 7,4). Además, se agrega 50 µl/pocillo de estándar o muestra en el tampón de ensayo. Después de 4 horas de incubación a 37°C y 5% CO₂, el medio de ensayo con estándar o muestra se quita y es sustituido por 100 µl/pocillo PBS. Además, 100 µl/pocillo LucLite™ se añade. Las placas se sellan e incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, la luminiscencia se mide en un TopCounter (Packard) en modo SPC (cuenta de fotón único).

45 Ejemplos

[0122] En los siguientes ejemplos, el ensayo de fibrilación de ThT anteriormente mencionado se usan para evaluación de estabilidad física de las formulaciones y la solubilidad se mide por el método de solubilidad anteriormente mencionado.

Ejemplo de referencia 1

[0123] Figura 1 muestra la solubilidad de una mezcla de la pramlintida análoga de amilina ^{25,28,29}Pro-h-amilina e insulina ^{A21G,B28D,desB30} contra pH. Todas las muestras contenían 0,2 mM acetato de zinc, 16 mM m-cresol, 16 mM fenol. La concentración de ^{25,28,29}Pro-h-amilina en la solución contra pH fue trazada con una línea y símbolos negros y usando el eje-y izquierdo; la concentración del análogo de insulina en la solución contra pH fue trazado con una línea y símbolos gris claro y usando el eje-y derecho. ^{25,28,29}Pro-h-amilina co-precipitada con el análogo de insulina en su zona de precipitación. En pH por debajo de 3,8 y por encima de pH 7,5 cantidades sustanciales de ambos péptidos fueron solubles en esta mezcla particular de análogos. Esto permite coformulación de dosis terapéuticamente relevantes tanto de insulina ^{A21G,B28D,desB30} como de ^{25,28,29}Pro-h-amilina a pH ácido, por ejemplo pH 3,5.

Ejemplo de referencia 2

[0124] La estabilidad física de una mezcla que contiene insulina ^{A21G,B28D,desB30} y pramlintida (^{25,28,29}Pro-h-amilina) fue

evaluada usando un ensayo de fibrilación de ThT. Este se muestra en Figura 2. Las tres formulaciones contenían 174 mM glicerol, 16 mM fenol, 16 mM m-cresol, 30 mM acetato sódico y fueron ajustadas a pH 3,5. Bajo estas condiciones ^{25,28,29}Pro-h-amilina era inerte hacia fibrilación en todo el tiempo de ensayo dado que esta no mostraba ninguna señal de fluorescencia de ThT. El análogo de insulina solo fibriló con un tiempo de retardo de aprox. 4,5 horas. La mezcla con el análogo de insulina y ^{25,28,29}Pro-h-amilina mostró la misma respuesta de ThT (incluyendo el mismo tiempo de retardo de aprox. 4,5 horas) que la formulación con el análogo de insulina solo. Por lo tanto, no hubo desestabilización mutua ya que la mezcla fue tan físico estable como el componente menos estable (el análogo de insulina) solo. Esto permite una coformulación estable de este análogo de insulina y ^{25,28,29}Pro-h-amilina bajo estas condiciones.

Ejemplo de referencia 3

[0125] Figura 3 muestra la solubilidad de una mezcla del análogo de amilina ^{25,28,29}Pro-h-amilina e insulina ^{A21G, B28E, desB30} contra pH. El análogo de insulina ha sido descrito en la solicitud de patente WO2004/080480. La mutación B28E hace la insulina monomérica y por lo tanto útil como una insulina relacionada con la comida. Todas las muestras contenían 0,2 mM zn-acetato, 16 mM m-cresol, 16 mM fenol. La concentración de ^{25,28,29}Pro-h-amilina en la solución contra pH fue trazada con línea y símbolos negros y usando el eje- γ izquierdo; la concentración del análogo de insulina en la solución contra pH fue trazado usando línea y símbolos gris claro y usando el eje- γ derecho. ^{25,28,29}Pro-h-amilina co-precipitada con el análogo de insulina en su zona de precipitación. En pH por debajo de 3,5 y por encima de pH 7,7 cantidades sustanciales de ambos péptidos fueron solubles en esta mezcla particular de análogos. Esto permite coformulación de dosis terapéuticamente pertinentes de insulina ^{A21G, B28E, desB30} y ^{25,28,29}Pro-h-amilina en pH ácido, por ejemplo pH 3,5.

Ejemplo de referencia 4

[0126] La estabilidad física de una mezcla que contiene insulina ^{A21G, B28E, desB30} y ^{25,28,29}Pro-h-amilina fue evaluada por el uso de un ensayo de fibrilación de ThT. Esto se muestra en Figura 4. Las tres formulaciones contenían 174 mM glicerol, 16 mM fenol, 16 mM m-cresol, 30 mM acetato sódico; y fueron ajustadas a pH 3,5. Bajo estas condiciones ^{25,28,29}Pro-h-amilina fue inerte hacia fibrilación en todo el tiempo del ensayo. El análogo de insulina solo y una mezcla del análogo de insulina y ^{25,28,29}Pro-h-amilina iniciaron fibrilación con tiempos de lapso idénticos (aprox. 6 horas). Esto indicó que no había desestabilización mutua dado que la mezcla fue tan físico estable como el componente menos estable (el análogo de insulina). Esto permite una formulación de mezcla estable de los dos péptidos a pH ácido, por ejemplo pH 3,5.

Ejemplo 5

[0127] Figura 5 muestra la solubilidad de una mezcla de 0,6 mM insulina ^{B28D}, 0,2 mM Zn(Ac)₂, 0,15 mM ^{25,28,29}Pro-h-amilina contra pH. La concentración de ^{25,28,29}Pro-h-amilina en la solución contra pH fue trazada con una línea y símbolos negros y usando el eje- γ izquierdo; la concentración del análogo de insulina en la solución contra pH fue trazada usando una línea y símbolos gris claro y usando el eje- γ derecho. A pesar de coprecipitación a pH fisiológico, fue posible tener cantidades significativas de ambos ^{25,28,29}Pro-h-amilina e insulina ^{B28D} en solución en pH ligeramente más alto. Esto permite la entrega simultánea de insulina ^{B28D} y ^{25,28,29}Pro-h-amilina en dosis clínicas pertinentes formuladas en pH ligeramente más alto que pH fisiológico, por ejemplo pH 8,0.

Ejemplo 6

[0128] Figura 6 muestra la solubilidad de una mezcla de 0,6mM insulina ^{B28D}, 0,2mM Zn(Ac)₂, 0,1 mM ^{25,28,29}Pro-h-amilina, 16mM fenol, 16mM m-cresol, 3000 ppm Poloxamer-188. La concentración de ^{25,28,29}Pro-h-amilina en solución contra pH fue trazada con una línea y símbolos negros y usando el eje- γ izquierdo; la concentración del análogo de insulina en solución contra pH fue trazada usando una línea y símbolos gris claro y usando el eje- γ derecho. La solubilidad de ambos péptidos aumentó cuando el pH aumentó de pH neutral a pH 8,0. Esto permite entrega simultánea de insulina ^{B28D} y ^{25,28,29}Pro-h-amilina en dosis clínicas pertinentes formuladas a pH ligeramente más alto que pH fisiológico, por ejemplo pH 8,0. La presencia del tensioactivo Poloxamer-188 puede aumentar la estabilidad física de tal coformulación.

Ejemplo 7

[0129] En este ejemplo el efecto de un fosfolípido en la estabilidad física de una mezcla que contiene Insulina ^{B28D} y ^{25,28,29}Pro-h-amilina fue examinada. Esto se muestra en Figura 7. Ambas formulaciones contenían 0,6 mM Insulina ^{B28D}, 50 μ M ^{25,28,29}Pro-h-amilina, 0,3 mM Zn(Ac)₂, 174 mM glicerol, 30 mM fenol, 8 mM glicil-glicina pH 7,4. La muestra sin tensioactivo adicionado mostró una significativa señal de fluorescencia de ThT después de un tiempo de retardo de aprox. 4 horas indicando que la fibrilación se había iniciado. La adición de 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) (DMPG), CAS n°. 67232- 80-8, para 5 mM significativamente aumentó este tiempo de retardo a más de 25 horas. Esto indica que coformulación de insulina ^{B28D} y ^{25,28,29}Pro-h-amilina en presencia de una micela de lípido aniónico puede aumentar la estabilidad física de la formulación.

Ejemplo 8

[0130] La adición del fosfolípido DMPG también aumentó la solubilidad de la Insulina^{B28D} y la ^{25,28,29}Pro-h-amilina. Figura 8 muestra la solubilidad de una mezcla de 0,6 mM Insulina^{B28D}, 0,2 mM Zn(Ac)2, 100 μM ^{25,28,29}Pro-h-amilina 30 mM fenol y 3 mM DMPG. La concentración de ^{25,28,29}Pro-h-amilina en la solución contra pH fue trazada con una línea y símbolos negros y usando el eje-γ izquierdo; la concentración del análogo de insulina en la solución contra pH fue trazado usando una línea y símbolos gris claro y usando eje-γ derecho. El efecto de DMPG fue muy pronunciado. Solubilidad completa de insulina^{B28D} y ^{25,28,29}Pro-h-amilina fue observada ya por encima de pH 6. Esto permite formulación e inyección subcutánea de dosis terapéuticamente pertinentes en un volumen de inyección aceptable y a pH fisiológico. Además, la formulación de mezcla de insulina^{B28D} y ^{25,28,29}Pro-h-amilina con DMPG es prevista que sea estable contra la fibrilación como se ilustra en los ejemplos 7 y 9.

Ejemplo 9

[0131] La estabilidad física de mezclas que contienen Insulina^{B28D}, ^{25,28,29}Pro-h-amilina y DMPG fue evaluada usando un ensayo de fibrilación de ThT. Esto se muestra en Figura 9. Ambas formulación 9A y 9B contenían 0,6 mM Insulina^{B28D}, 0,3 mM Zn(Ac)2, 100 μM ^{25,28,29}Pro-h-amilina, 174 mM glicerol, 30 mM fenol, 8 mM glicil-glicina pH 7,4. La formulación 9A además contenía 1,0 mM DMPG y la formulación 9B además contenía 3,0 mM DMPG. La formulación 9A (con 1,0 mM DMPG) tuvo un tiempo de retardo de aproximadamente 2,5 horas, mientras que la formulación 9B (con 3,0 mM DMPG) tuvo un tiempo de retardo de aproximadamente 22 horas antes de iniciar fibrilación. Esto indicó que DMPG aumentó la estabilidad física de la coformulación Insulina^{B28D} - ^{25,28,29}Pro-h-amilina, y el tiempo de retardo antes de fibrilación ocurrido fue significativamente prolongado en presencia de 3,0 mM DMPG.

Listado de secuencias

[0132]

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Mezclas de amilina e insulina

<130> 7376.204-PCT

<160> 1

<170> Patente en la versión 3.3

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DISULFURO

<222> (2)..(7)

<220>

<221> Amida terminal

<222> (37)

<400>

```

1
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1           5           10           15

```

```

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
          20           25           30

```

```

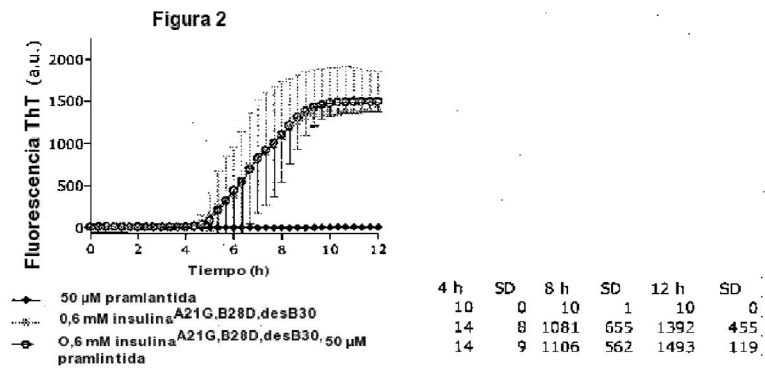
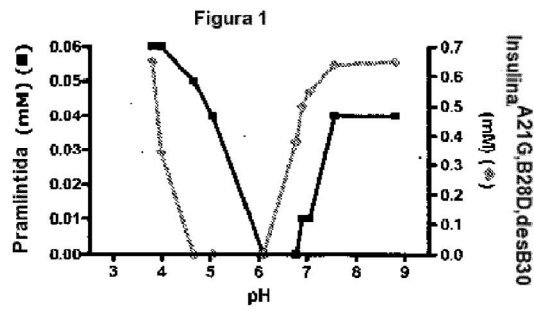
Gly Ser Asn Thr Tyr
          35

```

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición soluble farmacéutica para administración parenteral, que comprende un péptido de amilina e insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana, donde el pH de dicha composición farmacéutica o una solución reconstituida de dicha composición farmacéutica es de pH 6,5 a pH 9,0, y que comprende además un tensioactivo aniónico donde dicho tensioactivo aniónico es un derivado de glicerofosfoglicerol seleccionado del grupo que consiste en derivado de dimiristoil o 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) (DMPG).
- 10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, donde la concentración de insulina^{B28D} humana o insulina^{B3K,B29E} humana está en el intervalo de 1,2 mg/mL a 5,6 mg/mL.
- 15 3. Composición farmacéutica según todas las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido de amilina es ^{25,28,29}Pro-h-amilina.
4. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicho péptido de amilina es amilina humana metilada en la posición 24 y 26.
5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende zinc y/o calcio.
- 20 6. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha composición farmacéutica comprende un conservante.
7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha composición farmacéutica comprende un tampón.
- 25 8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha composición farmacéutica comprende un agente de isotonicidad.
9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un estabilizador.
- 30 10. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1, donde el tensioactivo se adiciona en una concentración entre 0,1 mM y 10 mM.
- 35 11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento de hiperglicemia.



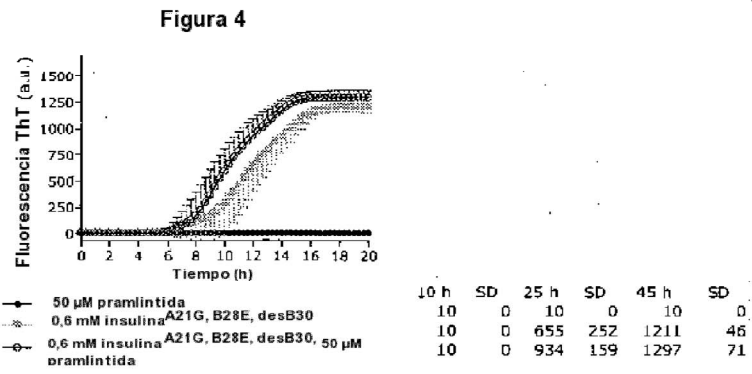
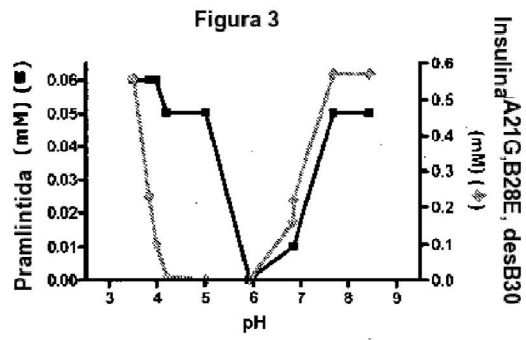


Figura 5

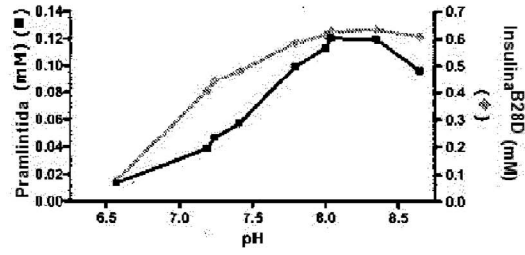


Figura 6

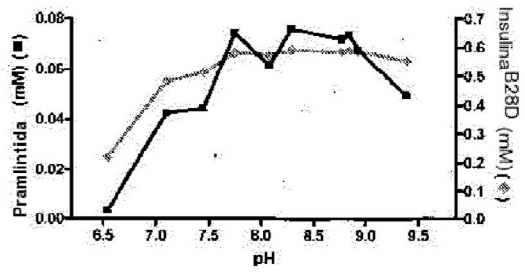


Figura 7

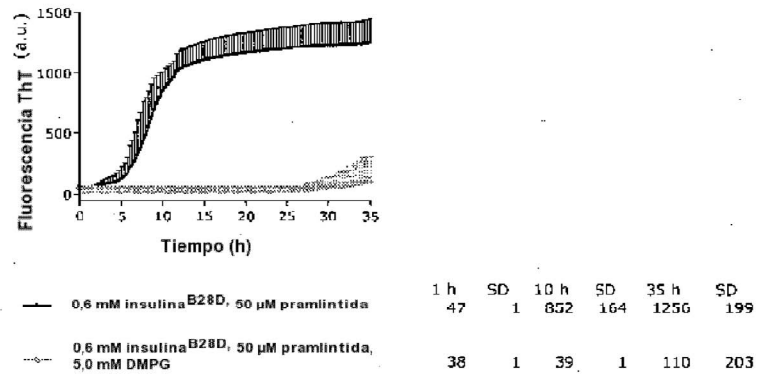


Figura 8

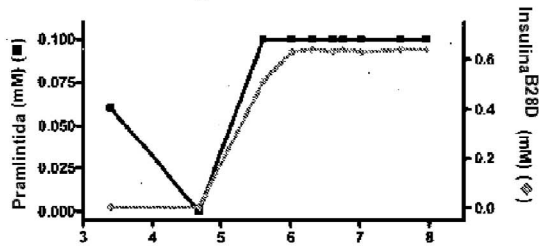
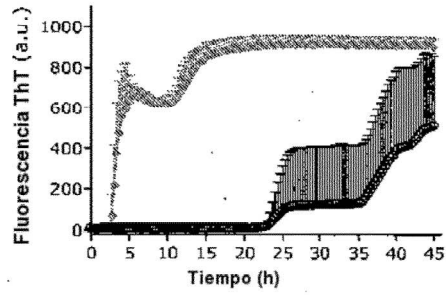


Figura 9



	2 h	SD	20 h	SD	40 h	SD
Formulación 9A (+ 1,0 mM DMPG)	8	0	900	51	911	40
Formulación 9B (+ 3,0 mM DMPG)	7	0	8	1	388	395

Figura 10

