

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 289**

51 Int. Cl.:

A61K 38/28 (2006.01)
A61K 31/465 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/455 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010 E 10730134 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2340033**

54 Título: **Preparación que comprende insulina, nicotinamida y arginina**

30 Prioridad:

26.06.2009 EP 09163940
01.07.2009 US 222168 P

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

28.01.2014

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

OLSEN, HELLE BIRK;
HAVELUND, SVEND;
RIBEL, ULLA;
STURIS, JEPPE;
NAVER, HELLE;
SCHLEIN, MORTEN y
LUDVIGSEN, SVEND

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 440 289 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

Preparación que comprende insulina, nicotinamida y arginina

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a productos farmacéuticos que incluyen un compuesto de insulina, un compuesto nicotínico, arginina y tampón fosfato.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La diabetes mellitus es un trastorno metabólico en el cual se pierde parcial o completamente la capacidad para utilizar la glucosa. Aproximadamente el 5% de todas las personas sufre diabetes y la enfermedad alcanza proporciones epidémicas.

15

[0003] Desde la introducción de la insulina en 1920, se han introducido mejoras continuas en el tratamiento de la diabetes. Para ayudar a evitar los altos niveles de glicemia, los pacientes diabéticos practican frecuentemente terapias de inyecciones múltiples, en las cuales se administra la insulina con cada comida. Ya que los pacientes diabéticos han sido tratados con insulina durante varias décadas, existe una necesidad principal de obtener preparaciones de insulina que mejoren la seguridad y la calidad de vida. Entre las preparaciones de insulina disponibles comercialmente, pueden mencionarse las preparaciones de actuación prolongada, de actuación intermedia y de acción rápida.

20

[0004] En el tratamiento de la diabetes mellitus se han sugerido y usado muchas variedades de productos farmacéuticos de insulina, como la insulina regular (como Actrapid®), insulina isofánica (designada NPH), suspensiones de insulina-zinc (como Semilente®, Lente®, y Ultralente®) e insulina isofánica bifásica (como NovoMix®). Los análogos de insulina humana y derivados han sido desarrollados y diseñados para perfiles particulares de acción, es decir, acción rápida o acción prolongada. Algunas de las preparaciones de insulina comercialmente disponibles como análogos de insulina de acción rápida incluyen NovoRapid® (preparación de insulina humana B28Asp), Humalog® (preparación de insulina humana B28LysB29Pro) y Apidra® (preparación de insulina humana B3LysB29Glu).

25

30

[0005] Las solicitudes internacionales WO 91/09617 y WO/9610417 (Novo Nordisk A/S) describen preparaciones de insulina que contienen nicotinamida o ácido nicotínico o una sal de los mismos.

35

[0006] Generalmente, las preparaciones farmacéuticas de insulina son administradas por inyección subcutánea. Es importante para el paciente el perfil de acción de la insulina, lo cual se refiere a la acción de insulina en el metabolismo de glucosa como una función del tiempo a partir de la inyección. En este perfil, entre otras cosas, son importantes el tiempo de la aparición, el valor máximo y la duración total de acción. En el caso de insulinas de bolo, los pacientes desean y requieren una variedad de preparaciones de insulina con diferentes perfiles de acción. Un paciente puede usar, en el mismo día, preparaciones de insulina con perfiles de acción muy diferentes. El perfil de acción deseado por ejemplo, depende de la hora del día y la cantidad y composición de la comida que ha comido el paciente.

40

[0007] Igualmente importante para el paciente es la estabilidad química de las preparaciones de insulina, por ejemplo, debido al uso abundante de dispositivos de inyección con forma de pluma tales como dispositivos que contienen cartuchos de Penfill®, en los cuales se almacena una preparación de insulina hasta que se vacía la totalidad del cartucho que puede ser al menos de 1 a 2 semanas para dispositivos que contienen cartuchos de 1,5-3,0 ml. Durante el almacenamiento, ocurren los cambios químicos covalentes en la estructura de insulina. Esto puede llevar a la formación de moléculas las cuales pueden ser menos activas y/o potencialmente inmunogénicas como productos de desamidación y productos de transformación de peso molecular superior (dímeros, polímeros). Además, también es importante la estabilidad física de las preparaciones de insulina, ya que un almacenamiento a largo plazo puede eventualmente llevar a la formación de fibrillas insolubles, las cuales son biológicamente inactivas y potencialmente inmunogénicas.

45

50

RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La invención se refiere a preparaciones de insulina con una proporción de absorción favorable y una estabilidad química y física favorable. La presente invención se refiere a preparaciones de insulina que comprenden insulina humana y/o a análogos de la misma, nicotinamida o ácido nicotínico y/o sales derivadas, arginina y un tampón fosfato.

55

[0009] En una forma de realización, la presente invención se refiere a una preparación de insulina que comprende:

60

- un compuesto de insulina,
- un compuesto nicotínico,
- arginina y tampón fosfato.

[0010] En otra forma de realización, la preparación de insulina puede comprender además ácido glutámico.

65

[0011] En otra forma de realización, la presente invención también contempla la formación para el uso en el tratamiento

de la diabetes mellitus en un sujeto o para la reducción del nivel de glucosa en sangre en un sujeto, dicho tratamiento comprende la administración a un sujeto o mamífero de una preparación de insulina según la invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

[0012]

La Figura 1 muestra el desarrollo en el porcentaje de contenido de insulina total de productos de degradación durante 2 semanas de almacenamiento a 37 °C de preparaciones según la presente invención. La letra A se refiere a una referencia NovoRapid® y las letras restantes corresponden a preparaciones de insulina aspart como se describe en la tabla 1 del Ejemplo 1. Comparada con la preparación NovoRapid® (preparación A), la adición de la nicotinamida (preparaciones B y D) lleva a una formación incrementada de productos de degradación, mientras que la adición combinada de nicotinamida, ácido glutámico y arginina (preparaciones C y E), tiene un patrón de degradación bastante similar, con menor formación de HMWP (proteínas de alto peso molecular).

15

La Figura 2 muestra el desarrollo en porcentaje de contenido de insulina total de productos de degradación durante 2 semanas de almacenamiento a 37 °C de preparaciones según esta invención. La letra A se refiere a una referencia de NovoRapid® y las letras restantes corresponden a preparaciones de insulina aspart como se describen en la Tabla 1 del Ejemplo 1. La adición combinada de nicotinamida, ácido glutámico y arginina, preparaciones F, G, H, y I, difiere en el sistema tampón, tampón fosfato o tampón tris, y la concentración de insulina y Zn, 0,6 mM y 0,3 mM o 1,2 mM y 0,6 mM, tiene un modelo de degradación similar a la preparación de NovoRapid®, la preparación A.

20

La Figura 3 muestra la concentración de glucosa (promedio +/- SEM, N=8) en el plasma después de la inyección subcutánea en cerdos de una dosis de 1 nmol/kg en 0 minutos de preparaciones según esta invención. La letra A se refiere a una referencia NovoRapid® y las letras restantes corresponden a preparaciones de insulina aspart como se describe en la Tabla 1 del Ejemplo 1. En comparación con la preparación NovoRapid® (preparación A) la proporción inicial de reducción de glucosa en sangre es más rápida para la preparación con adición de nicotinamida (preparación N) e incluso más rápida para una combinación de nicotinamida y arginina (preparación M).

25

La Figura 4 muestra la concentración de glucosa en el plasma (promedio +/- SEM, N=7) después de la inyección subcutánea en cerdos de una dosis de 1 nmol/kg en 0 minutos de preparaciones según esta invención. La letra A se refiere a una referencia NovoRapid® y las letras restantes corresponden a preparaciones de insulina aspart como se describe en la Tabla 1 del Ejemplo 1. En comparación con la preparación NovoRapid® (preparación A), la proporción inicial de reducción de glucosa en sangre es más rápida para una preparación con una combinación de nicotinamida, arginina y ácido glutámico (preparación L) y para una preparación con una combinación de nicotinamida y arginina (preparación K).

30

35

La Figura 5 muestra la concentración de insulina aspart en el plasma (promedio +/- SEM, N=7) después de la inyección subcutánea en cerdos de una dosis de 1 nmol/kg en 0 minutos de preparaciones según esta invención. La letra A se refiere a una referencia NovoRapid® y las letras restantes corresponden a preparaciones de insulina aspart como se describe en la Tabla 1 del Ejemplo 1. En comparación con la preparación NovoRapid® (preparación A), la proporción inicial de absorción del componente de insulina de las preparaciones con nicotinamida (preparación J), la combinación de nicotinamida y arginina (preparación K), y la combinación de nicotinamida, arginina y ácido glutámico (preparación L) es notablemente más rápida.

40

45

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0013] Sorprendentemente se descubrió que la absorción después de la inyección subcutánea del compuesto de insulina en las preparaciones de insulina de la presente invención era más rápida que la de las preparaciones de insulina de referencia. Esta propiedad es útil para insulinas de acción rápida, en particular en relación con un régimen de inyección múltiple donde se da la insulina antes de cada comida. Con la aparición más rápida de acción, la insulina puede tomarse convenientemente más cerca de la comida que con soluciones de insulina de acción rápida convencionales. Además, una desaparición más rápida de la insulina disminuye probablemente el riesgo de hipoglucemia post-comida.

50

55

[0014] Las preparaciones de insulina de la presente invención son preparaciones de insulina de acción rápida que incluyen un compuesto de insulina como la insulina aspart, un compuesto nicotínico, tal como la nicotinamida, el aminoácido arginina y un tampón fosfato. Opcionalmente, las preparaciones de insulina de la presente invención pueden comprender otros aminoácidos tales como ácido glutámico. Estas preparaciones de insulina tienen un perfil de absorción rápida que imita la fisiología normal de forma más cercana que las terapias existentes. Además, las preparaciones de insulina de la presente invención tienen estabilidad química y física adecuada para los productos farmacéuticos comerciales.

60

[0015] Las preparaciones de insulina de la presente invención proporcionan un inicio más rápido de acción en comparación con las terapias de insulina existentes. Dichas preparaciones de insulina ultrarrápida tienen la ventaja de restablecer la primera fase de liberación de insulina, conveniencia de inyección y detiene la producción de glucosa

65

hepática. Las preparaciones de insulina de la presente invención tienen una velocidad de absorción favorable a partir del tejido subcutáneo en el plasma con un aumento de la velocidad de absorción inicial que varía de 1,5 a 5 veces, cuando se compara con las preparaciones convencionales tales como NovoRapid®, como se sugiere por diferentes experimentos de PK/PD en cerdos. Esta velocidad de absorción más rápida puede mejorar el control glicémico y conveniencias y puede permitir un cambio de la dosificación pre-comida a la post-comida. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento sorprendente que aunque, la adición de nicotinamida permite el incremento en la velocidad de absorción, tiene también un efecto negativo en la estabilidad química por el hecho de incrementar significativamente la cantidad de HMWP. Las preparaciones de insulina de la presente invención tienen una estabilidad química mejorada por la adición de arginina, lo cual se refleja por ejemplo en una reducción en la formación de dímeros y polímeros y desamido insulinas después del almacenamiento. Las preparaciones de insulina de la presente invención adicionalmente también pueden tener una estabilidad física mejorada, lo cual puede ser útil para el uso en bombas.

[0016] La presente invención proporciona una preparación de insulina que incluye un compuesto de insulina según la presente invención que está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10,0 mM, y donde dicha preparación contiene un pH de 3 a 8,5. La preparación también comprende un compuesto nicotínico, arginina y tampón fosfato. La preparación puede comprender además inhibidor(es) de proteasa, iones metálicos, un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizadores y tensioactivos.

[0017] En una forma de realización, las preparaciones de insulina comprenden una insulina humana, un análogo o combinaciones de los mismos, nicotinamida y/o ácido nicotínico y/o sales de los mismos y arginina y/o sales de la misma y un tampón fosfato.

[0018] En una forma de realización, las preparaciones de insulina según la presente invención comprenden una solución acuosa de insulina humana B28Asp, nicotinamida, arginina y tampón fosfato.

[0019] El contenido de insulina humana B28Asp en las soluciones de esta invención pueden estar en el rango de 15 a 500 unidades internacionales (IU)/ml, preferiblemente en el rango de 50 a 333 IU/ml, en preparaciones para la inyección. No obstante, para otros fines de administración parenteral, el contenido del compuesto de insulina puede ser más alto.

[0020] Aquí también se describe una preparación de insulina que incluye un compuesto de insulina, un compuesto nicotínico, ácido glutámico, arginina y tampón fosfato.

[0021] En el presente contexto la unidad "IU" corresponde a 6 nmol.

[0022] El término "insulina aspart" se refiere al análogo de la insulina humana, la insulina humana B28Asp.

[0023] El término "de inicio en" se refiere al tiempo de inyección hasta que la curva PK cambia a un aumento.

[0024] El término "velocidad de absorción" se refiere a la pendiente de la curva PK.

[0025] Un "compuesto de insulina" de acuerdo a la invención debe entenderse en la presente como insulina humana, un análogo de insulina y/o cualquier combinación de los mismos.

[0026] El término "insulina humana" como se utiliza en este caso significa la hormona humana cuya estructura y propiedades son bien conocidas. La insulina humana tiene dos cadenas de polipéptido que están conectadas por puentes de disulfuro entre los residuos de cisteína, es decir, la cadena A y la cadena B. La cadena A es un péptido de 21 aminoácidos y la cadena B es un péptido de 30 aminoácidos, las dos cadenas que están conectadas por tres puentes disulfuro: uno entre las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A, el segundo entre la cisteína en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y el tercero entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B.

[0027] La hormona está sintetizada como una proinsulina precursora de una cadena sencilla (preproinsulina) que consiste en un prepéptido de 24 aminoácidos seguido por una proinsulina que contiene 86 aminoácidos en la configuración: prepéptido B-Arg Arg-C-Lys Arg-A, en la cual C es un péptido de conexión de 31 aminoácidos. Arg de Arg y Lys-Arg son puntos de escisión para la escisión del péptido de conexión de las cadenas A y B.

[0028] Por "análogo de insulina" como se utiliza en este caso se entiende un polipéptido derivado de la estructura primaria de una insulina de origen natural, por ejemplo, de la insulina humana, por mutación. Se producen una o más mutaciones al eliminar y/o sustituir por lo menos un residuo de aminoácidos que se da en la insulina de origen natural y/o al agregar por lo menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos sustituidos y/o adicionados pueden ser tanto residuos de aminoácidos codificables como otros residuos de aminoácidos de origen natural.

[0029] En una forma de realización de un análogo de insulina comprende menos de 8 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones y cualquier combinación de la misma) en relación a la insulina progenitora, alternativamente menos de 7 modificaciones en relación a la insulina progenitora, alternativamente menos de 6 modificaciones en

relación a la insulina progenitora, alternativamente menos de 5 modificaciones en relación a la insulina progenitora, alternativamente menos de 4 modificaciones en relación a la insulina progenitora, alternativamente menos de 3 modificaciones en relación a la insulina progenitora, alternativamente menos de 2 modificaciones en relación a la insulina progenitora.

5

[0030] Las mutaciones en la molécula de insulina son denominadas mediante el establecimiento de la cadena (A o B), la posición, y el código de tres letras para el aminoácido que sustituye al aminoácido nativo. Por "desB30" o "B(1-29)" se entiende una cadena B de insulina natural o un análogo de la misma que carezca del residuo de aminoácido B30, y por insulina humana B28Asp se entiende insulina humana donde el residuo de aminoácido en la posición 28 de la cadena B ha sido sustituido con Asp.

10

[0031] Ejemplos de análogos de insulina son aquellos donde Pro en la posición 28 de la cadena B se muta con Asp, Lys, Leu, Val, o Ala y/o Lys en la posición B29 se muta con Pro, Glu o Asp. Además, Asn en la posición B3 se puede mutar con Thr, Lys, Gln, Glu o Asp. El residuo de aminoácido en la posición A21 se puede mutar con Gly. El aminoácido en la posición B1 se puede mutar con Glu. El aminoácido en la posición B16 se puede mutar con Glu o His. Otros ejemplos de análogos de insulina son los análogos de delección, por ejemplo, análogos donde el aminoácido B30 en la insulina humana ha sido eliminado (insulina humana des(B30)), análogos de insulina donde el aminoácido B1 en la insulina humana ha sido eliminado (insulina humana des(B1)), insulina humana des(B28-B30) e insulina humana des(B27). Análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión N-terminal y análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión C-terminal tal como con dos residuos de arginina añadidos al C-terminal de la cadena B son también ejemplos de análogos de insulina. Otros ejemplos son análogos de insulina que comprenden combinaciones de las mutaciones mencionadas. Los análogos de insulina donde el aminoácido en la posición A14 es Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly o His, el aminoácido en la posición B25 es His y que opcionalmente comprende además una o más mutaciones adicionales son otros ejemplos de análogos de insulina. Los análogos de insulina de la insulina humana donde el residuo de aminoácido en la posición A21 es Gly y donde el análogo de insulina se extiende además en el C-terminal con dos residuos de arginina también son ejemplos de análogos de insulina.

15

20

25

30

[0032] Otros ejemplos de análogos de insulina incluyen, pero no se limitan a: insulina humana DesB30; insulina humana AspB28; insulina humana AspB28, desB30; insulina humana LysB3, GluB29; insulina humana LysB28, ProB29; insulina humana GlyA21, ArgB32; insulina humana GluA14, HisB25; insulina humana HisA14, HisB25; insulina humana GluA14, HisB25, desB30; insulina humana HisA14, desB30; insulina humana GluA14, His825, des827, des828, des829, des830; insulina humana GluA14, HisB25, GluB27, desB30; insulina humana GluA14, HisB16, HisB25, desB30; insulina humana HisA14, HisB16, HisB25; insulina humana HisA8, GluA14, HisB25, GluB27, desB30; insulina humana HisA8, GluA14, GluB1, GluB16, HisB25, GluB27, desB30; e insulina humana HisA8, GluA14, GluB16, HisB25, desB30.

35

[0033] El término "compuesto nicotínico" incluye nicotinamida, ácido nicotínico, niacina, niacinamida y vitamina B3 y/o sales derivadas y/o cualquier combinación de los mismos.

40

[0034] Según la presente invención, la concentración del compuesto nicotínico y/o las sales derivadas se encuentra en el rango de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 300 mM o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 200 mM.

[0035] El término "Arg" o "arginina" incluye el aminoácido arginina y/o una sal derivada.

45

[0036] En una forma de realización, la preparación de insulina comprende de 1 a 100 mM de arginina.

[0037] En una forma de realización, la preparación de insulina comprende de 1 a 20 mM de arginina.

50

[0038] En una forma de realización, la preparación de insulina comprende de 20 a 90 mM de arginina.

[0039] En una forma de realización, la preparación de insulina comprende de 30 a 85 mM de arginina.

[0040] El término "Glu" o "ácido glutámico" incluye el aminoácido ácido glutámico y/o una sal derivada.

55

[0041] En una forma de realización, la preparación de insulina comprende de 1 a 100 mM de ácido glutámico.

[0042] En una forma de realización, la preparación de insulina comprende de 20 a 90 mM de ácido glutámico.

60

[0043] En una forma de realización, la preparación de insulina comprende de 30 a 85 mM de ácido glutámico.

[0044] El término "producto farmacéutico" o "preparación de insulina" como se utiliza en este caso quiere decir un producto que incluye un compuesto de insulina, es decir, una insulina humana, un análogo de la misma y/o combinaciones de los mismos y un compuesto nicotínico y un aminoácido, opcionalmente junto con otros excipientes tales como conservantes, agentes quelantes, modificadores de tonicidad, agentes de carga, estabilizadores, antioxidantes, polímeros y tensioactivos, iones metálicos, vehículos oleaginosos y proteínas (p. ej., albúmina de suero

65

humano, gelatina o proteínas), donde dicha preparación de insulina es útil para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad o trastorno mediante la administración de dicha preparación de insulina a una persona. De este modo, una preparación de insulina es también conocida en la técnica como un producto farmacéutico o composición farmacéutica.

5

[0045] El tampón se puede seleccionar del grupo que consta de, pero no se limita a, acetato sódico, carbonato de sodio, citrato, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, fosfato sódico, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

10

[0046] La preparación de insulina de la presente invención puede comprender además otros ingredientes comunes a preparaciones de insulina, por ejemplo, agentes complejantes de zinc tales como citrato.

15

[0047] Glicerol y/o manitol y/o cloruro sódico pueden estar presentes en una cantidad correspondiente a una concentración de 0 a 250 mM, de 0 a 200 mM o de 0 a 100 mM.

[0048] Estabilizadores, tensioactivos y conservantes también pueden estar presentes en las preparaciones de insulina de esta invención.

20

[0049] Las preparaciones de insulina de la presente invención pueden comprender además un conservante farmacéuticamente aceptable. El conservante puede estar presente en una cantidad suficiente para obtener un efecto de preservación. La cantidad de conservante en una preparación de insulina se puede determinar, por ejemplo, a partir de bibliografía de este campo y/o la(s) cantidad(es) conocida(s) de conservante en, por ejemplo, productos comerciales. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en productos farmacéuticos se describe, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19 edición, 1995.

25

[0050] El conservante presente en la preparación de insulina de esta invención puede ser como en las preparaciones de insulina convencional hasta el momento, por ejemplo fenol, m-cresol y metilparabeno.

30

[0051] La preparación de insulina de la presente invención puede comprender, además, un agente quelante. El uso de un agente quelante en productos farmacéuticos es conocido por el experto en la materia. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19 edición, 1995.

35

[0052] La preparación de insulina de la presente invención puede comprender además un estabilizador. El término "estabilizador" como se utiliza en este caso se refiere a productos químicos añadidos a polipéptidos que contienen productos farmacéuticos para estabilizar el péptido, es decir, para aumentar el tiempo de conservación y/o tiempo en uso de dichos productos. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19 edición, 1995.

40

[0053] La preparación de insulina de la presente invención puede comprender además un tensioactivo. El término "tensioactivo" como se utiliza en este caso se refiere a cualquier molécula o ión compuesto por una parte hidrosoluble (hidrofílica), la cabeza, y un segmento liposoluble (lipofílico). Los tensioactivos se acumulan preferiblemente en las interfaces, donde la parte hidrofílica se orienta hacia el agua (fase hidrofílica) y la parte lipofílica hacia la fase hidrofóbica u oleosa (es decir, vidrio, aire, aceite, etc.). La concentración a la que los tensioactivos empiezan a formar micelas es conocida como la concentración de micela crítica o CMC. Además, los tensioactivos bajan la tensión superficial de un líquido. Los tensioactivos también son conocidos como compuestos anfipáticos. El término "detergente" es un sinónimo usado para los tensioactivos en general. El uso de un tensioactivo en productos farmacéuticos es conocido por el experto en la materia. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19 edición, 1995.

50

[0054] En otra forma de realización la invención se refiere a una preparación de insulina que incluye una solución acuosa de un compuesto de insulina de la presente invención, y un tampón fosfato, donde dicho compuesto de insulina está presente en una concentración de 0,1 mM o más, y donde dicha preparación tiene un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,5 a temperatura ambiente (~25 °C).

55

[0055] La presente invención también se refiere a métodos para producir las preparaciones de insulina de la invención.

[0056] En una forma de realización, el método para hacer preparaciones de insulina de la invención comprende:

60

- a) la preparación de una solución mediante la disolución del compuesto de insulina o una mezcla de compuestos de insulina en el agua o tampón;
- b) la preparación de una solución mediante la disolución de un ión de metal bivalente en el agua o tampón;
- c) la preparación de una solución mediante la disolución de un conservante en el agua o tampón;
- d) la preparación de una solución mediante la disolución de un agente de isotonicidad en el agua o tampón;
- e) la preparación de una solución mediante la disolución de un tensioactivo y/o un estabilizador en el agua o tampón;

65

f) solución de mezcla a) y una o varias soluciones b), c), d), y e);

[0057] Finalmente, el ajuste del pH de la mezcla en f) al pH deseado seguido de una filtración estéril.

5 [0058] Las preparaciones de insulina de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de la diabetes mediante administración parenteral. Se recomienda que la dosificación de las preparaciones de insulina de esta invención a ser administrada al paciente sea seleccionada por un médico.

10 [0059] La administración parenteral se puede realizar por inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar mediante una bomba de infusión. Como otra opción, las preparaciones de insulina que contienen el compuesto de insulina de la invención también pueden ser adaptadas a la administración transdérmica, por ejemplo, por inyección sin aguja o por un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosal, por ejemplo, bucal.

15 [0060] Se pueden administrar preparaciones de insulina según la presente invención a un paciente que necesite dicho tratamiento en diferentes zonas, por ejemplo, en zonas tópicas, por ejemplo, zonas de piel y mucosas, en zonas que evitan la absorción, por ejemplo, la administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y a sitios que implican absorción, por ejemplo, la administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

20 [0061] En una forma de realización de la invención la preparación de insulina es una preparación acuosa, es decir, una preparación que comprende agua. Dicha preparación es típicamente una solución o una suspensión. En otra forma de realización de la invención la preparación de insulina es una solución acuosa.

25 [0062] El término "preparación acuosa" se define como una preparación que comprende al menos el 50% en peso de agua. Asimismo, el término "preparación acuosa" se define como una solución que comprende al menos el 50% en peso de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos el 50% en peso de agua.

30 [0063] Las suspensiones acuosas pueden contener los compuestos activos en la mezcla con excipientes adecuados para la producción de suspensiones acuosas.

[0064] En una forma de realización, las preparaciones de insulina de esta invención se adecuan para la aplicación en dispositivos con forma de pluma usadas para terapia de insulina por inyección.

35 [0065] En una forma de realización, las preparaciones de insulina de la presente invención se pueden usar en bombas para la administración de insulina.

40 [0066] El término "estabilidad física" de la preparación de insulina como se utiliza en este caso se refiere a la tendencia de la proteína de formar agregados insolubles y/o biológicamente inactivos de la proteína como resultado de la exposición de la proteína para termotensiones mecánicas y/o interacción con interfases y superficies que son desestabilizantes, tales como superficies hidrofóbicas e interfases. La estabilidad física de las preparaciones de proteína acuosa se evalúa mediante inspección visual y/o mediciones de turbidez después de exponer la preparación rellena en contenedores adecuados (p. ej., cartuchos o viales) con tensión mecánica/física (p. ej., agitación) a temperaturas diferentes en varios periodos temporales. La inspección visual de las preparaciones se realiza en una luz nítida enfocada con fondo oscuro. La turbidez de la preparación se caracteriza por una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez, por ejemplo, en una escala del 0 al 3 (una preparación que no muestra turbidez corresponde a una puntuación visual de 0, y una preparación que muestra turbidez visual en la luz diurna corresponde a una puntuación visual de 3). Una preparación se clasifica de forma físicamente inestable con respecto a la agregación de proteínas, cuando muestra turbidez visual en la luz diurna. Alternativamente, la turbidez de la preparación se puede evaluar mediante mediciones de turbidez simples conocida por el experto en la materia. La estabilidad física de las preparaciones de proteína acuosa también puede ser evaluada usando un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferiblemente una molécula pequeña que se enlaza preferentemente a un conformador no nativo de la proteína. Un ejemplo de una pequeña sonda espectroscópica molecular de estructura de proteína es la tioflavina T. La tioflavina T es un tinte fluorescente que ha sido ampliamente usado para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas, y quizás también otras configuraciones de proteína, la tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación alrededor de 450 nm y una emisión mejorada de alrededor de 482 nm cuando se liga a una forma de proteína de fibrilla. La tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente en las longitudes de onda.

60 [0067] El término "estabilidad química" de la preparación de proteína como se utiliza en este caso se refiere a cambios en la estructura de proteína covalente que conlleva a la formación de productos de degradación química con potencia potencial menos biológica y/o propiedades inmunogénicas potenciales mayores en comparación con la estructura de proteína nativa. Varios productos de degradación química se pueden formar dependiendo del tipo y naturaleza de la proteína nativa y el entorno al que la proteína se expone. Las cantidades crecientes de productos de degradación química son vistos frecuentemente durante el almacenamiento y uso de la preparación de proteína. Muchas proteínas son propensas a la desamidación, un proceso en el que el grupo de amida de cadena lateral en el glutaminilo o residuos

- de asparaginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre o residuos de asparaginilo para formar un derivado de IsoAsp. Otras vías de degradación implican la formación de productos de alto peso molecular donde dos o más moléculas de proteína son unidas de manera covalente entre sí mediante la transamidación y/o las interacciones de disulfuro que llevan a la formación de productos de degradación de dímeros, oligómeros y polímeros unidos de manera covalente (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). Se pueden mencionar la oxidación (de por ejemplo residuos de metionina) como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la preparación de proteína se puede evaluar por medición de la cantidad de los productos de degradación química en varios puntos de tiempo después de la exposición a condiciones medioambientales diferentes (la formación de productos de degradación puede verse acelerada frecuentemente por ejemplo por un aumento de temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual es frecuentemente determinada por la separación de los productos de degradación dependiendo del tamaño de molécula y/o carga utilizando varias técnicas de cromatografía (p. ej., SEC-HPLC y/o RP-HPLC). Ya que los productos HMWP son potencialmente inmunogénicos y no activos biológicamente, son ventajosos los niveles bajos de HMWP.
- 5
- 10
- 15 [0068] El término "preparación estabilizada" se refiere a una preparación con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada. En general, una preparación debe ser estable durante su uso y almacenamiento (en la adaptabilidad con uso recomendado y condiciones de almacenamiento) hasta que se alcance la fecha de caducidad.
- 20 [0069] El término "diabetes" o "diabetes mellitus" incluye diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, diabetes de gestación (durante el embarazo) y otros estados que causan hiperglicemia. El término se usa para un trastorno metabólico en el que el páncreas produce cantidades insuficientes de insulina, o en el que las células del cuerpo no responden apropiadamente a la insulina, previniendo así que las células absorban glucosa. Como resultado, la glucosa aumenta en la sangre.
- 25 [0070] Diabetes de tipo 1, también conocida como diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) y diabetes de inicio juvenil, es provocada por la destrucción de células B, provocando normalmente una deficiencia de insulina absoluta.
- 30 [0071] Diabetes de tipo 2, también conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) y diabetes de aparición en adultos, se asocia con la resistencia a la insulina predominante y, así, a la deficiencia relativa de insulina y/o un defecto secretor predominantemente de insulina con resistencia a la insulina.
- 35 [0072] El término "farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en este caso significa adecuado para aplicaciones farmacéuticas normales, es decir, que no dan lugar a casos adversos serios en pacientes.
- 40 [0073] El término "tratamiento de una enfermedad" como se utiliza en este caso significa la gestión y el cuidado de un paciente con la enfermedad, condición o trastorno desarrollado e incluye el tratamiento, prevención o alivio de la enfermedad. El propósito de tratamiento es combatir la enfermedad, condición o trastorno. El tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, condición o trastorno al igual que para aliviar los síntomas o complicaciones asociados a la enfermedad, condición o trastorno, y prevención de la enfermedad, condición o trastorno.
- 45 [0074] En otra forma de realización, un análogo de insulina según la invención se usa como un medicamento para aplazar o prevenir la progresión de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.
- 50 [0075] En una forma de realización de la presente invención, se provee la preparación de insulina según la invención para el uso como un medicamento para el tratamiento o prevención de la hiperglicemia incluyendo hiperglicemia inducida por estrés, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, y quemaduras, lesiones de operación y otras enfermedades o heridas donde es necesario un efecto anabólico en el tratamiento, infarto de miocardio, derrame cerebral, cardiopatía coronaria y otros trastornos cardiovasculares.
- 55 [0076] En otra forma de realización de la presente invención, la preparación de insulina es para el uso en el tratamiento o prevención de la hiperglicemia incluyendo hiperglicemia inducida por estrés, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, y quemaduras, lesiones de operación y otras enfermedades o heridas donde es necesario un efecto anabólico en el tratamiento, infarto de miocardio, cardiopatía coronaria y otros trastornos cardiovasculares, derrame cerebral, el uso que comprende la administración a un paciente que necesita dicho tratamiento se provee una cantidad eficaz para este tipo de tratamiento de una preparación de insulina según la invención.
- 60 [0077] El tratamiento con una preparación de insulina según la presente invención también se puede combinar con una segunda o más sustancias farmacológicamente activas, por ejemplo, seleccionadas de agentes contra la diabetes, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes antihipertensivos, agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones que resultan de o están asociadas a la diabetes y agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones y trastornos que resultan de o van asociados a la obesidad.
- 65 [0078] El tratamiento con una preparación de insulina según la presente invención también se puede combinar con cirugía bariátrica, una cirugía que influye en el nivel de glucosa y/o homeostasis lipídica como bandas gástricas o baipás

gástricos.

[0079] La producción de polipéptidos, por ejemplo, insulinas, es de sobra conocida en la técnica. Un análogo de insulina según la invención puede producirse, por ejemplo, por síntesis del péptido tradicional, por ejemplo, síntesis péptida de fase sólida usando química t-Boc o Fmoc u otras técnicas bien establecidas, véase por ejemplo Greene y Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis" John Wiley & Sons, 1999. El análogo de insulina también se puede producir por un método que comprende el cultivo de una célula huésped con una secuencia de ADN que codifica el análogo y es capaz de expresar el análogo de insulina en un medio nutritivo adecuado en condiciones que permiten la expresión del análogo de insulina. Para análogos de insulina que comprenden residuos de aminoácidos no naturales, la célula recombinante debería ser modificada de manera que los aminoácidos no naturales se incorporan en el análogo, por ejemplo usando mutantes ARNt. Por lo tanto, brevemente, los análogos de insulina según la invención se preparan análogamente a la preparación de análogos de insulina conocidos.

[0080] Se pueden usar diferentes métodos para la producción de insulina humana y análogos de insulina humana. Por ejemplo, en el documento WO2008034881 se describen tres métodos mayores que se usan en la producción de insulina en microorganismos. Dos de estos incluyen *Escherichia coli*, con la expresión de una proteína de fusión grande en el citoplasma (Frank et al. (1981) in Peptides: Proceedings of the 7th American Peptide Chemistry Symposium (Rich & Gross, eds.), Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. Págs. 729-739), o el uso de un péptido señal para permitir la secreción en el espacio periplásmico (Chan et al. (1981) PNAS 78:5401-5404). Un tercer método utiliza *Saccharomyces cerevisiae* para segregar un precursor de insulina en el medio (Thim et al. (1986) PNAS 83:6766-6770). El estado de la técnica divulga varios precursores de insulina que se expresan bien con *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*, véase los documentos US 5,962,267, WO 95/16708, EP 0055945, EP 0163529, EP 0347845 y EP 0741188.

[0081] Los análogos de insulina se producen mediante expresión de una secuencia de ADN que codifica el análogo de insulina en cuestión en una célula huésped adecuada por técnicas conocidas como se describe, por ejemplo, en el documento US 6500645. El análogo de insulina es expresado directamente o como una molécula precursora que tiene una extensión N-terminal en la cadena B o una extensión C-terminal en la cadena B. La extensión N-terminal puede tener la función de aumentar el rendimiento del producto directamente expresado y puede tener una longitud de hasta 15 residuos de aminoácidos. La extensión N-terminal debe ser dividida de in vitro después del aislamiento del caldo de cultivo y por lo tanto tendrá una zona de escisión junto a B1. Las extensiones N-terminales del tipo adecuado en la presente invención son descritas en los documentos US 5,395,922, y EP 765,395. La extensión C-terminal puede tener la función de proteger la insulina madura o molécula de análogo de insulina contra tratamiento intracelular proteolítico por células huéspedes exoproteasas. La extensión C-terminal debe ser dividida bien extracelularmente en el caldo de cultivo por carboxipeptidasa activa segregada o in vitro después del aislamiento del caldo de cultivo. Un método para producir insulina madura y análogos de insulina con extensiones C-terminales en la cadena B que son retiradas por la carboxipeptidasa son descritas en los documentos WO 08037735. El producto de insulina objetivo del proceso puede ser una insulina humana bicatenaria o un análogo de insulina humana bicatenaria que puede o puede no tener una extensión C-terminal corta de la cadena B. Si el producto de insulina objetivo no tiene una extensión C-terminal de la cadena B, entonces dicha extensión C-terminal debería ser capaz de posteriormente ser cortada de la cadena B antes de otros pasos de purificación.

[0082] La presente invención también contempla la siguiente lista no limitativa de formas de realización, que se describen además en este documento:

1. Una preparación de insulina que comprende:

- un compuesto de insulina,
- un compuesto nicotínico,
- arginina, y un tampón fosfato.

2. La preparación de insulina según la forma de realización 1, donde el compuesto de insulina es insulina humana o un análogo de insulina.

3. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina es insulina humana B28Asp.

4. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina es insulina humana B28LysB29Pro.

5. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina es insulina humana B3LysB29Glu.

6. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en un rango seleccionado entre los siguientes: 0,1-10,0 mM; 0,1-3,0 mM; 0,1-2,5 mM; 0,1-2,0 mM; 0,1-1,5 mM; 0,2-2,5 mM; 0,2- 2,0 mM; 0,2-1,5 mM; 0,3-3,0 mM; 0,3-2,5 mM; 0,3-2,0 mM; 0,3-1,5 mM; 0,5-1,3 mM y 0,6-1,2 mM.

7. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina es presente en la cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10,0 mM.

8. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 3,0 mM.

9. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2,5 mM.
10. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2,0 mM.
- 5 11. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1,5 mM.
12. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 2,5 mM.
- 10 13. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 2,0 mM.
14. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 1,5 mM.
- 15 15. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 3,0 mM.
16. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 2,5 mM.
17. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 2,0 mM.
- 20 18. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 1,5 mM.
19. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,3 mM.
20. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 1,2 mM.
- 25 21. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 1,2 mM.
22. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,6 o aproximadamente 1,2 mM.
- 30 23. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,3 mM.
24. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,6 mM.
25. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 1,2 mM.
- 35 26. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto nicotínico está seleccionado del grupo consistiendo en nicotinamida, ácido nicotínico, niacina, niacinamida y vitamina B3 y/o sales derivadas y/o cualquier combinación de los mismos.
27. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto nicotínico está seleccionado de nicotinamida y ácido nicotínico y/o sales derivadas y/o cualquier combinación de los mismos.
- 40 28. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el compuesto nicotínico está presente en un rango seleccionado de los siguientes: 1-300 mM; 5-200 mM; 40-120 mM, 70-140 mM o 80-130 mM.
29. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 300 mM del compuesto nicotínico.
- 45 30. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 260 mM del compuesto nicotínico.
31. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 200 mM del compuesto nicotínico.
- 50 32. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 150 mM del compuesto nicotínico.
33. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM del compuesto nicotínico.
34. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 120 mM del compuesto nicotínico.
- 55 35. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 120 mM del compuesto nicotínico.
36. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM del compuesto nicotínico.
- 60 37. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 60 mM a aproximadamente 80 mM del compuesto nicotínico.
38. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 70 mM a aproximadamente 140 mM del compuesto nicotínico.
39. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 130 mM del compuesto nicotínico.
- 65 40. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende

- aproximadamente 8 mM, 30 mM, 100 mM o 130 mM del compuesto nicotínico.
41. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 8 mM del compuesto nicotínico.
- 5 42. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 30 mM, 100 mM o 130 mM del compuesto nicotínico.
43. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 30 mM del compuesto nicotínico.
44. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 100 mM del compuesto nicotínico.
- 10 45. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 130 mM del compuesto nicotínico.
46. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 150 mM del compuesto nicotínico.
- 15 47. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, comprendiendo los rangos siguientes de compuesto de arginina: 1-100 mM, 5-120 mM, 8-85 mM, 20- 90 mM, 30- 90 mM, 30- 85 mM, 30- 60 mM o 10-40 mM.
48. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, comprendiendo los rangos siguientes de compuesto de arginina: 1-120 mM, 8-85 mM o 1-40 mM.
- 20 49. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 120 mM de arginina.
50. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM de arginina.
51. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 120 mM de arginina.
- 25 52. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 90 mM de arginina.
53. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 85 mM de arginina.
- 30 54. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 85 mM de arginina.
55. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM de arginina.
56. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM de arginina.
- 35 57. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 40 mM de arginina.
58. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde arginina está presente en un rango seleccionado de los siguientes: 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM o 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM o 60 mM.
- 40 59. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 1 mM de arginina.
60. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 2 mM de arginina.
- 45 61. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 3 mM de arginina.
62. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 4 mM de arginina.
63. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 5 mM de arginina.
- 50 64. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 6 mM de arginina.
65. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 7 mM de arginina.
- 55 66. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 8 mM de arginina.
67. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 9 mM de arginina.
68. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 10 mM de arginina.
- 60 69. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 15 mM de arginina.
70. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 20 mM de arginina.
- 65 71. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 25 mM de arginina.
72. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende

- aproximadamente 30 mM de arginina.
73. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 35 mM de arginina.
- 5 74. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 40 mM de arginina.
75. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 45 mM de arginina.
76. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 50 mM de arginina.
- 10 77. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 55 mM de arginina.
78. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende aproximadamente 60 mM de arginina.
- 15 79. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende además ácido glutámico.
80. La preparación de insulina según la forma de realización 79, donde el ácido glutámico está presente en un rango seleccionado de los siguientes: : 1-100 mM, 20- 90 mM, 30- 90 mM, 30- 85 mM o 30-50 mM.
81. La preparación de insulina según forma de realización 79, que comprende de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM de ácido glutámico.
- 20 82. La preparación de insulina según forma de realización 79, que comprende de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 90 mM de ácido glutámico.
83. La preparación de insulina según forma de realización 79, que comprende de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 85 mM de ácido glutámico.
84. La preparación de insulina según forma de realización 79, que comprende de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM de glutámico ácido.
- 25 85. La preparación de insulina según forma de realización 79, que comprende aproximadamente 30 mM o 50 mM de ácido glutámico.
86. La preparación de insulina según forma de realización 79, que comprende aproximadamente 30 mM de ácido glutámico.
- 30 87. La preparación de insulina según forma de realización 79, que comprende aproximadamente 50 mM de ácido glutámico.
88. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, que comprende además un ión metálico, agente(s) conservante(s), agente(s) de isotonicidad y estabilizador(es), detergente(s) y tampón(es).
89. La preparación de insulina según la forma de realización 88, donde el estabilizador es un detergente no iónico.
- 35 90. La preparación de insulina según la forma de realización 89, donde el detergente es polisorbato 20 (Tween 20) o polisorbato 80 (Tween 80).
91. La preparación de insulina según la forma de realización 89, donde el detergente es polisorbato 20 (Tween 20).
92. La preparación de insulina según la forma de realización 89, donde el detergente es polisorbato 80 (Tween 80).
- 40 93. La preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización 89-92, que comprende de aproximadamente 5 a 100 ppm, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 ppm o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 ppm de polisorbato.
94. La preparación de insulina según la forma de realización 88, que comprende además un compuesto fenólico.
95. La preparación de insulina según la forma de realización 94, donde dicho compuesto fenólico está presente en la cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente 6 mg/ml o de aproximadamente 0 a aproximadamente 4 mg/ml.
- 45 96. La preparación de insulina según la forma de realización 88, que comprende además m-cresol.
97. La preparación de insulina según la forma de realización 96 donde m-cresol está presente en la cantidad de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4,0 mg/ml o de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 4,0 mg/ml.
98. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH varía entre neutral y débilmente básico.
- 50 99. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH varía entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0.
100. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH es aproximadamente 7,0.
- 55 101. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH es aproximadamente 7,1.
102. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH es aproximadamente 7,2.
103. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH es aproximadamente 7,3.
- 60 104. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH es aproximadamente 7,4.
105. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH es aproximadamente 7,5.
- 65 106. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH es aproximadamente 7,6.
107. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH es

aproximadamente 7,7.

108. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH es aproximadamente 7,8.

5 109. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH es aproximadamente 7,9.

110. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el pH es aproximadamente 8,0.

10 111. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes para el uso en la reducción del nivel de glucosa en sangre en mamíferos mediante la administración a un paciente con necesidad de dicho tratamiento de una dosis terapéuticamente activa de una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes.

112. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes para el uso en el tratamiento de la diabetes mellitus en un sujeto, comprendiendo la administración a un sujeto de una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes.

15 113. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes o un uso según las formas de realización 111 o 112, para la administración parenteral.

20 114. Una preparación de insulina según cualquiera de las formas de realización precedentes, para el uso en el tratamiento o prevención de la hiperglicemia, incluyendo hiperglicemia inducida por estrés, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, y quemaduras, lesiones de operación y otras enfermedades o heridas donde es necesario un efecto anabólico en el tratamiento, infarto de miocardio, derrame cerebral, cardiopatía coronaria y otros trastornos cardiovasculares y tratamiento de pacientes críticos enfermos de diabetes y pacientes no diabéticos.

[0083] La invención se ilustra a continuación mediante los siguientes ejemplos que no deben ser interpretados como limitativos.

25

EJEMPLOS

Ejemplo 1

30 Preparación de productos farmacéuticos

[0084] Los productos farmacéuticos de la presente invención se pueden formular como una solución acuosa. El medio acuoso se hace isotónico, por ejemplo, con cloruro sódico o glicerol. Además, el medio acuoso puede contener iones de zinc, por ejemplo añadidos como acetato de zinc o cloruro de zinc, tampones y conservantes. La arginina se puede añadir como Arg, HCl. El valor de pH de la preparación se ajusta al valor deseado y puede estar entre aproximadamente 3 y aproximadamente 8,5, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 o aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5 dependiendo del punto isoelectrico, pI, de la insulina en cuestión.

40

45

50

55

60

65

Tabla 1. Composición de las preparaciones de insulina de acuerdo a esta invención

	Insulina aspartato (mM)	Zn (mM)	Fenol (mM)	m-cresol (mM)	NaCl (mM)	Fosfato (mM)	Tris (mM)	Glicerol (%p/v)	Arginine, HCl (mM)	Nicotinamida (mM)	Ácido glutámico (mM)	pH
A*	0,6	0,3	16	16	10	7		1,6				7,4
B	0,6	0,3	16	16	2	7				130		7,4
C	0,6	0,3	16	16	2	7			50	80	50	7,4
D	0,6	0,3	16	16	2		7			130		7,4
E	0,6	0,3	16	16	2		7		50	80	50	7,4
F	0,6	0,3	16	16	20	7			30	80	30	7,4
G	0,6	0,3	16	16	20		7		30	80	30	7,4
H	1,2	0,6	16	16	20	7			30	80	30	7,4
I	1,2	0,6	16	16	20		7		30	80	30	7,4
J	0,6	0,3	16	16	10		7	1,3		80		7,4
K	0,6	0,3	16	16	10		7	0,77	30	80		7,4
L	0,6	0,3	16	16	10		7	0,24	30	80	30	7,4
M	0,6	0,3	16	16	10		7		60	100		7,4
N	0,6	0,3	16	16	10		7	1,13		100		7,4

* Comercialmente disponible NovoRapid®

Tabla 2. Composición de preparaciones de insulina adicionales de acuerdo a esta invención

N.º preparación	[insulina aspart] mM	[Zn ²⁺] mM	[fenol] mM	[Arg] mM	[Gly] mM	[Glu] mM	[His] mM	[Nicotinamida] mM
1	0,6	0,3	32					260
2	0,6	0,3	32	10				260
3	0,6	0,3	32	20				260
4	0,6	0,3	32	30				260
5	0,6	0,3	32	40				260
6	0,6	0,3	32	50				260
7	0,6	0,3	32		50			260
8	0,6	0,3	32			50		260
9	0,6	0,3	32				50	260

Ejemplo 2**5 Análisis de estabilidad química de insulina**Cromatografía de exclusión por tamaño

10 [0085] La determinación cuantitativa de proteínas de alto peso molecular (HMWP) e insulina aspart monomérica fue realizada en la insulina de Waters (300 x 7,8 mm, parte n.º wat 201549) con un eluyente que contiene 2,5 M de ácido acético, 4 mM de L-arginina y 20% (V/V) de acetonitrilo a una velocidad de flujo de 1ml/min y 40 °C. La detección fue realizada con un detector de absorbancia airable (Waters 486) a 276 nm. El volumen de inyección fue 40 µl y un estándar de 600 µM de insulina humana. La HMWP y la concentración de las preparaciones fueron medidas en cada punto de muestreo.

Cromatografía de fase inversa (UPLC)

15 [0086] La determinación de las impurezas relacionadas de insulina aspart fue realizada en un sistema UPLC que utiliza una columna BEH RP C8 2,1 x 100 mm, tamaño de partícula de 1,7 µm. Número de pieza de Waters 186002878, con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min., a detección de 40 °C a 220 nm. La elución fue realizada con un fase móvil que consiste en lo siguiente:

A. 10% (w/V) acetonitrilo, 2,8% (p/p) sulfato de sodio, 0,3% (p/p) ácido o-fosfórico, pH 3,5.

20 B. 70% (w/V) acetonitrilo. Gradiente: 0-11 min isocrático con 73%/27% de A/B, 11- 12 cambio lineal a 52%/48% A/B, 25 13-15 min. cambio lineal a 73%/27% de A/B, 15-20 min. gradiente isocrático a 73%/27% de A/B.

[0087] La cantidad de aspart B28iso, desamido y otras impurezas relacionadas fueron determinadas como área de absorbancia medida en el porcentaje de área de absorbancia total determinado después de la elución de los conservantes. El método RP-UPLC es equivalente al método analítico usado para el control de la calidad de los fármacos de insulina aspart comercializados por Novo Nordisk.

30 [0088] La adición de arginina reduce la cantidad de productos de degradación formados, especialmente HMWP y formas desamido, aumentar la concentración de arginina en la variedad 10 a 50 mM lleva además a la reducción de la degradación. La estabilidad física medida como tiempo de retardo en el ensayo ThT se reduce mediante la adición de arginina y se reduce cada vez más cuando aumenta la concentración de arginina. El rendimiento total de 50 mM de arginina es superior a 50 mM de glicina, 50 mM de ácido glutámico, o 50 mM de histidina en relación a la reducción de la formación de productos de degradación, como se muestra a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Datos de Estabilidad Física y Química para Preparaciones de Insulina 1-9 de la Tabla 2 (Ejemplo 1)

N.º preparación	Estabilidad física, tiempo de retardo (min) en el ensayo ThT	Estabilidad química			
		Contenido del producto de degradación (%) medido como diferencia entre el contenido después de la incubación por 2 semanas a 37 °C y a 4 °C			
		B20 IsoAsp	Formas des-amido	Otras impurezas relacionadas	HMWP
1	160	1,17	3,67	1,73	1,36
2	80	1,30	3,05	0,82	0,65
3	80	1,30	2,49	0,64	0,34
4	60	1,31	2,26	0,79	0,20
5	60	1,27	2,27	0,37	0,19
6	40	1,36	1,99	0,47	0,16
7	100	1,26	4,72	2,21	1,11
8	50	1,39	3,41	1,07	0,70
9	0	1,75	6,99	2,22	1,01

Ejemplo 3

5

Estudios Farmacocinéticos (PK) / Farmacodinámicos (PD) en modelos de cerdo LYD y ensayo de análisis de plasmaEstudios PK/PD en cerdos LYD

10

[0089] Los estudios PK/PD fueron realizados en los cerdos de hembra domésticos, cruzamientos LYD, que pesen entre 55 y 110 kg. Los cerdos son cateterizados en la vena yugular a través de la vena del oído por lo menos 2 días antes de iniciar el estudio. La última comida antes del inicio del estudio fue servida a los animales aprox. 18 horas antes de la inyección de la preparación de prueba, y los animales tiene libre acceso al agua en todo el tiempo durante el periodo de ayuno y el periodo de prueba.

15

[0090] En el tiempo de 0 horas la preparación de prueba fue administrada de forma subcutánea en el lado lateral del cuello. Se extrajo una muestra sanguínea mediante dosificación previa y a intervalos de tiempo regulares después de que las muestras de dosificación fueran extraídas del catéter y muestreadas en tubos de vidrio de 1,5 ml prereservados con heparina. Las muestras de sangre fueron mantenidas en agua con hielo hasta la separación del plasma por centrifugado durante 10 minutos, a 3000 rpm a 4 °C, lo cual se realizó en los primeros 30 minutos. Las muestras de plasma fueron almacenadas a 4 °C durante un breve periodo de tiempo (2-3 horas) o a -18 °C para almacenamientos a largo plazo y fueron analizados para glucosa en YSI o Konelab 30i y para concentración de insulina aspart por LOCI.

20

Inmunoensayo de Canalización de Oxígeno Luminiscente (LOCI) para Cuantificación de Insulina Aspart

25

[0091] La insulina aspart LOCI es un inmunoensayo tipo sándwich a base de anticuerpos monoclonales y se aplica a la proximidad de dos esferas, las esferasceptoras recubiertas de europio y las esferas donante recubiertas de estreptavidina. Las esferasceptoras fueron recubiertas con un anticuerpo específico contra la insulina humana y reconocen insulina aspart en las muestras de plasma. Un segundo anticuerpo biotinilado enlaza específicamente la insulina aspart y las esferas recubiertas de estreptavidina, y componen el sándwich. La iluminación del inmunocomplejo agregado de esferas libera el oxígeno singlete a partir de las esferas donantes lo cual canaliza en las esferasceptoras y acciona la quimioluminiscencia. La quimioluminiscencia fue medida y la cantidad de luz generada es proporcional a la concentración de insulina aspart.

30

35

[0092] En comparación con el producto comercializado NovoRapid®, la velocidad inicial de reducción de la glucosa en sangre es más rápida para las preparaciones de la presente invención (Figuras 3 y 4). Asimismo, cuando se compara con NovoRapid®, la velocidad de absorción inicial del componente de insulina de las preparaciones de la presente invención, es marcadamente más rápida (Figura 5).

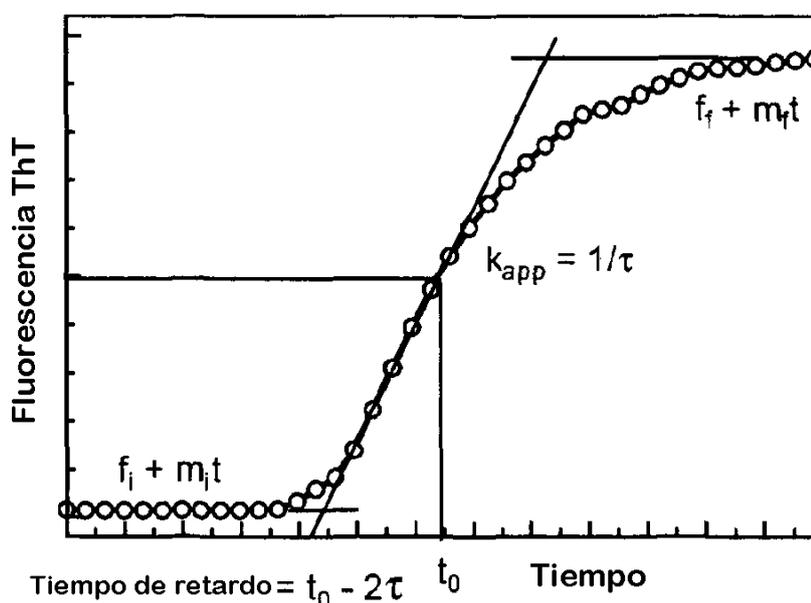
40

Ejemplo 4**Introducción General a los Ensayos de fibrilación de ThT para la evaluación de la Estabilidad Física de Formulaciones de Proteína**

[0093] La baja estabilidad física de un péptido puede llevar a la formación de fibrilla amiloide, lo cual es observado como estructuras macromoleculares bien ordenadas de tipo hebra en la muestra, dando como resultado eventualmente la formación de gel. Este ha sido medido generalmente mediante inspección visual de la muestra. No obstante, este tipo de medición es muy subjetiva y depende del observador. Por lo tanto, la aplicación de una sonda indicadora de moléculas pequeñas es mucho más ventajosa. La tioflavina T (ThT) es una sonda y tiene una firma de fluorescencia diferente cuando se une a fibrillas [Naiki et al. (1989) Anal. Biochem. 177, 244-249; LeVine (1999) Methods. Enzymol. 309, 274-284]. El curso temporal para la formación de fibrilla puede ser descrito por una curva sigmoide con la siguiente expresión [Nielsen et al. (2001) bioquímica Biochemistry 40, 6036-6046]:

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

[0094] Aquí, F es la Fluorescencia de ThT al mismo tiempo t. La constante t₀ es el tiempo necesario para alcanzar el 50% de fluorescencia máxima. Los dos parámetros importantes que describen la formación de fibrilla son el tiempo de retardo calculado por t₀ - 2τ y la constante de índice aparente k_{app} = 1/τ.



[0095] La formación de un intermediario parcialmente plegado del péptido es sugerido como un mecanismo de inicio general para la fibrilación. Pocos de aquellos productos intermediarios tienen un núcleo para formar un modelo en el que otros intermediarios pueden ensamblarse y tiene lugar la fibrilación. El tiempo de retardo corresponde al intervalo en el que la masa crítica del núcleo se incrementa y la constante de velocidad aparente es la velocidad con la que se forma la fibrilla misma.

Preparación de la muestra

[0096] Las muestras se preparan recientemente antes de cada ensayo. Cada composición de muestra es descrita en cada ejemplo. El pH de la muestra fue ajustado al valor deseado utilizando cantidades apropiadas de concentrado de NaOH y HClO₄ o HCl. La tioflavina T se añadió a las muestras de una solución madre en H₂O a una concentración final de 1 μM.

[0097] Las alícuotas de muestra de 200 μl fueron colocadas en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Packard Opti-Plate™-96, poliestireno blanco). Normalmente, se colocan cuatro u ocho réplicas de cada muestra (correspondiente a una condición de prueba) en una columna de pocillos. La placa fue sellada con Scotch Pad (Qiagen).

Incubación y medición de la fluorescencia

[0098] La incubación a la temperatura dada, agitación y medición de la emisión de fluorescencia de ThT se hizo en un lector de placa de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL o un lector de placa Varioskan (Thermo Labsystems). La temperatura fue ajustada a 37 °C. La agitación orbital fue ajustada a 960 rpm con una amplitud de 1 mm en todos los datos presentados. La medición de la fluorescencia fue hecha mediante excitación a través de un filtro de 444 nm y la

medición de la emisión a través de un filtro de 485 nm.

5 [0099] Cada operación es iniciada al incubar la placa a la temperatura de ensayo durante 10 minutos. La placa fue medida cada 20 minutos durante un periodo temporal deseado. Entre cada medición, la placa fue agitada y calentada como se describe.

Manipulación de datos

10 [0100] Los puntos de medición fueron guardados en formato Microsoft Excel para un tratamiento adicional y el dibujo y el ajuste de la curva fueron realizados utilizando GraphPad Prism. La emisión previa de ThT en ausencia de fibrillas fue insignificante. Los puntos de datos son típicamente un medio de cuatro u ocho muestras y se muestra con barras de error de desviación estándar. Sólo los datos obtenidos en el mismo experimento (es decir, muestras en la misma placa) se presentan en el mismo gráfico que asegura una medida relativa de fibrilación entre experimentos.

15 [0101] El conjunto de datos se puede ajustarse a la Eq. (1). No obstante, ya que las curvas sigmoidales completas no siempre se consiguen durante el tiempo de medición, los tiempos de retardo fueron visualmente determinados aquí a partir de la curva de fluorescencia de ThT como el punto temporal en el que la fluorescencia de ThT es diferente al nivel previo.

20 Medición de las concentraciones final e inicial

25 [0102] La concentración peptídica en cada una de las formulaciones evaluadas fue medida en ambos casos antes de la aplicación en el ensayo de fibrilación de ThT ("Inicial") y una vez finalizada la fibrilación de ThT ("Después del ensayo ThT"). Las concentraciones fueron determinadas por métodos HPLC inversos que utilizan un estándar de pramlintida como una referencia. Antes de medir una vez completado, se recogieron 150 µl de cada replica y fueron transferidos a un tubo de Eppendorf. Estos fueron centrifugados a 30000 G durante 40 minutos. Los sobrenadantes fueron filtrados a través de un filtro de 0,22 µm antes de la aplicación en el sistema HPLC.

REIVINDICACIONES

1. Preparación de insulina que comprende:
- 5 • un compuesto de insulina,
 • un compuesto nicotínico,
 • arginina, y
 • un tampón fosfato.
- 10 2. Preparación de insulina según la reivindicación 1, donde el compuesto de insulina es insulina humana o un análogo de insulina.
3. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el compuesto de insulina es insulina humana B28Asp.
- 15 4. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el compuesto de insulina es insulina humana B28LysB29Pro.
5. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el compuesto de insulina es insulina humana B3LysB29Glu.
- 20 6. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 2,0 mM.
7. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el compuesto de insulina está presente en la cantidad de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 1,2 mM.
- 25 8. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el compuesto nicotínico es seleccionado del grupo que consta de nicotinamida, ácido nicotínico, niacina, niacinamida y vitamina B3 y/o sales derivadas y/o cualquier combinación de los mismos.
- 30 9. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 150 mM del compuesto nicotínico.
10. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 85 mM de arginina.
- 35 11. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además ácido glutámico.
- 40 12. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un ión metálico, agente(s) conservante(s), agente(s) de isotonicidad, estabilizador(es), y detergente(s).
13. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el tampón fosfato es seleccionado de entre dihidrógeno fosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio o fosfato sódico.
- 45 14. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en la reducción del nivel de glucosa en sangre en mamíferos mediante la administración a un paciente que necesita dicho tratamiento de una dosis terapéuticamente activa de dicha preparación de insulina.
- 50 15. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus en un sujeto que comprende la administración a un sujeto de dicha preparación de insulina.
16. Preparación de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento o prevención de: hiperglicemia, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, enfermedades o heridas donde es necesario un efecto anabólico en el tratamiento, trastornos cardiovasculares y tratamiento de pacientes críticamente enfermos.
- 55 17. Preparación de insulina para su uso según la reivindicación 16 donde dicha preparación de insulina es para su uso en el tratamiento o prevención de: hiperglicemia inducida por estrés, quemaduras, lesiones de operación, infarto de miocardio, derrame cerebral, cardiopatía coronaria, y tratamiento de pacientes críticos enfermos de diabetes y no diabéticos.
- 60

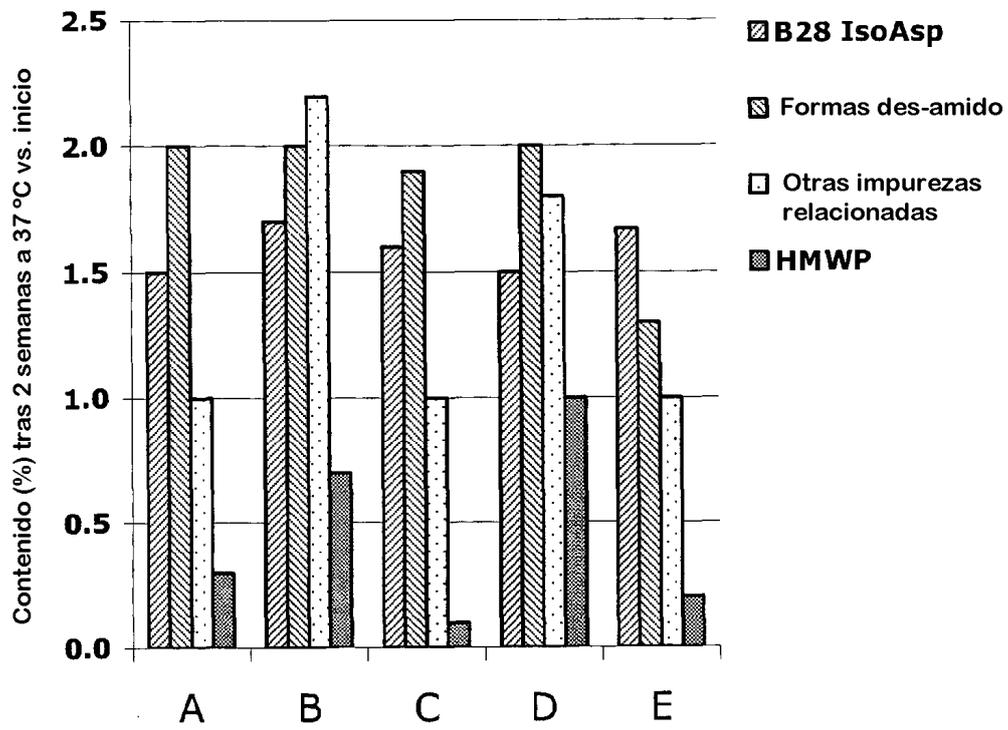


Fig. 1/5

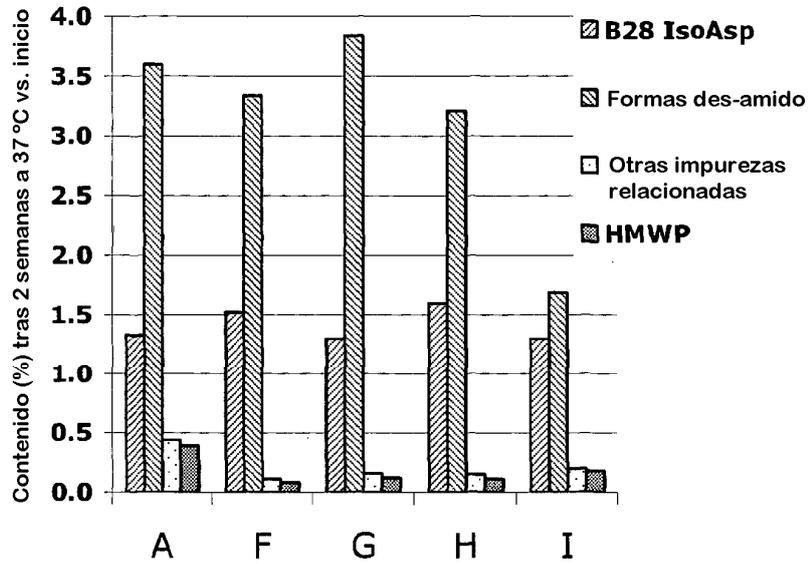


Fig. 2/5

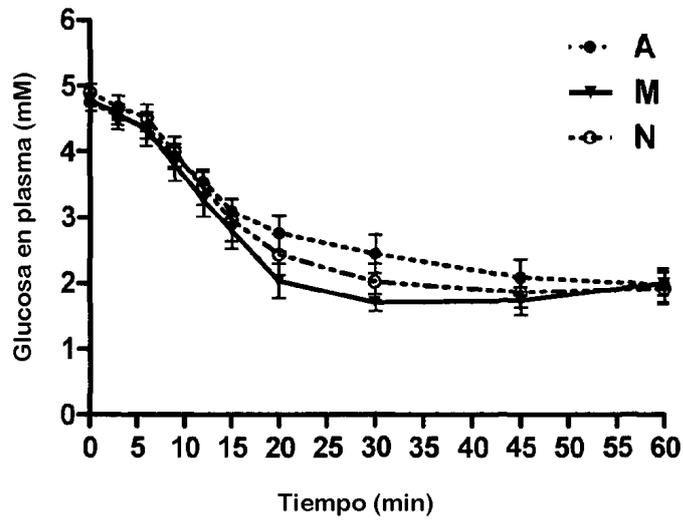


Fig. 3/5

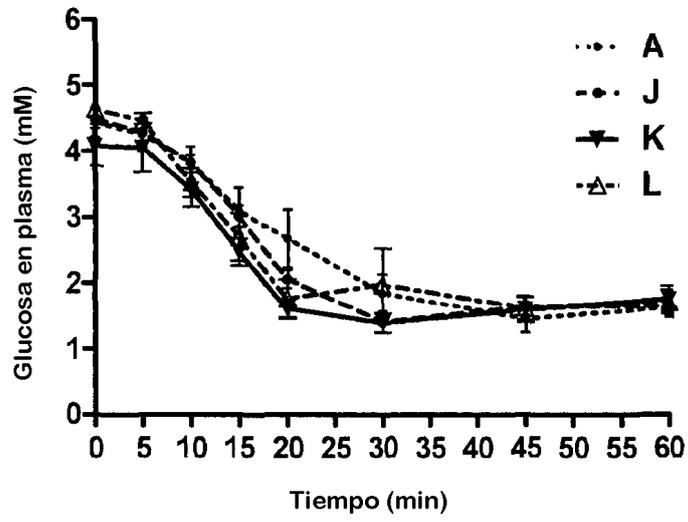


Fig. 4/5

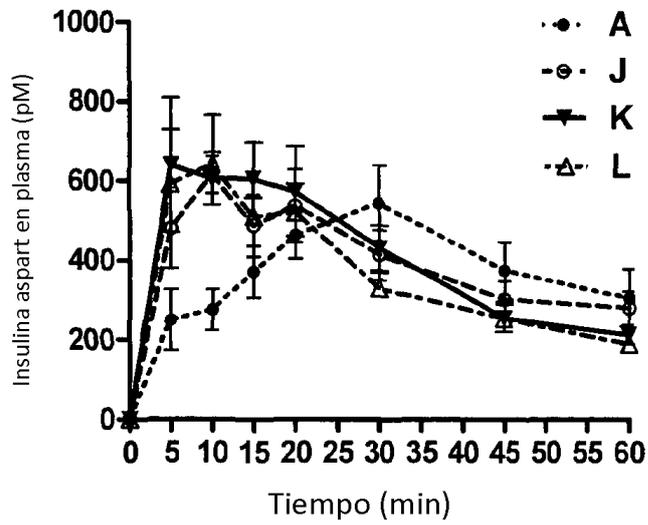


Fig. 5/5