

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 705**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/28** (2006.01)

**A61K 31/465** (2006.01)

**A61K 47/18** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**A61K 31/455** (2006.01)

**A61K 31/198** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010 E 13158960 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2612677**

54 Título: **Preparación que contiene 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:

**21.08.2015**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)**

**Novo Allé**

**2880 Bagsværd, DK**

72 Inventor/es:

**OLSEN, HELLE BIRK;**

**HAVELUND, SVEND;**

**RIBEL-MADSEN, ULLA;**

**STURIS, JEPPE;**

**NAVER, HELLE;**

**SCHLEIN, MORTEN y**

**LUDVIGSEN, SVEND**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 543 705 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 contiene insulina, nicotinamida y arginina

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas y a su uso.

**5 Antecedentes de la invención**

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico en el cual se perdió parcial o totalmente la capacidad para utilizar la glucosa. Alrededor del 5% de todas las personas sufren de diabetes y el trastorno se acerca a proporciones epidémicas.

10 Desde la introducción de la insulina en la década de 1920, se han hecho continuos avances para mejorar el tratamiento de la diabetes. Para ayudar a evitar niveles de glucemia elevados, los pacientes diabéticos a menudo se practican un tratamiento de inyecciones múltiples, por el cual se administran insulina con cada comida. Como los pacientes diabéticos han sido tratados con insulina por varias décadas, existe una importante necesidad de preparaciones de insulina que mejoren la seguridad y la calidad de vida. Entre las preparaciones de insulina disponibles comercialmente, se pueden mencionar las preparaciones de acción rápida, acción intermedia y de  
15 acción prolongada.

En el tratamiento de la diabetes mellitus, se han sugerido y utilizado muchas variedades de preparaciones farmacéuticas de insulina, como la insulina regular (por ejemplo Actrapid®), la insulina isófana (denominada NPH), las suspensiones de insulina zinc (como Semilente®, Lente® y Ultralente®) y la insulina isófana bifásica (como NovoMix®). También se han desarrollado derivados y análogos de la insulina humana, diseñados para perfiles de acción particulares, es decir acción rápida o acción prolongada. Algunas de las preparaciones de insulina disponibles en el comercio que contienen dichos análogos de insulina de acción rápida incluyen NovoRapid® (preparación de B28Asp insulina humana), Humalog® (preparación de B28LysB29Pro insulina humana) y Apidra® (preparación de B3LysB29Glu insulina humana).

25 Las solicitudes internacionales WO 91/09617 y WO/9610417 (Novo Nordisk A/S) dan a conocer preparaciones de insulina que contienen nicotinamida o ácido nicotínico o una de sus sales.

Muy a menudo las preparaciones farmacéuticas de insulinas se administran por inyección subcutánea. El perfil de acción de la insulina es importante para el paciente, es decir la acción de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa como una función del tiempo desde la inyección. En este perfil, entre otras cosas, el tiempo de inicio, el valor máximo y la duración total de la acción son importantes. En el caso de las insulinas en bolo, diversas preparaciones de insulina con perfiles de acción diferentes son deseadas y solicitadas por los pacientes. Un paciente puede, en el mismo día, utilizar 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 ingerida por el paciente.

Igualmente importante para el paciente es la estabilidad química de las preparaciones de insulina, por ejemplo, debido al abundante uso de los dispositivos de inyección tipo lapicera como los dispositivos que contienen cartuchos Penfill®, en los cuales una preparación de insulina se almacena hasta que el cartucho se vacía totalmente que puede ser al menos 1 a 2 semanas para los dispositivos que contienen cartuchos de 1.5-3.0 ml. Durante el almacenamiento, se pueden producir cambios químicos covalentes en la estructura de la insulina. Esto puede conducir a la formación de moléculas que sean menos activas y/o potencialmente inmunógenas como productos de desamidación y productos de transformación de mayor peso molecular (dímeros, polímeros). Además, también es importante la estabilidad física de las preparaciones de insulina, dado que el almacenamiento a largo plazo puede conducir con el tiempo a la formación de fibrillas insolubles que son biológicamente inactivas y potencialmente inmunógenas.

**Resumen de la invención**

45 La invención se refiere a preparaciones de insulina con velocidad de absorción y estabilidad química y física favorables. La presente invención se refiere a preparaciones de insulina que contienen insulina humana y/o sus análogos, nicotinamida o ácido nicotínico y/o sus sales, y arginina.

En una realización, la presente invención se refiere a una preparación de insulina que contiene:

- un compuesto insulínico,
- 50 • un compuesto nicotínico, y

- arginina.

En otra realización, la preparación de insulina puede contener además ácido glutámico.

### Descripción de las figuras

5 La figura 1 muestra el desarrollo en porcentaje del contenido total de insulina de los productos de degradación de las preparaciones según la invención durante 2 semanas de almacenamiento a 37 °C. La letra A se refiere a la referencia NovoRapid® y las letras restantes corresponden a las preparaciones de insulina aspart como las descritas en la tabla 1 del ejemplo 1. En comparación con la preparación NovoRapid® (preparación A), la adición de nicotinamida (preparaciones B y D) aumenta la formación de productos de degradación, en tanto la adición combinada de nicotinamida, ácido glutámico y arginina (preparaciones C y E), tiene un patrón de degradación  
10 mayormente similar, con menor formación de HMWP (Proteínas de alto peso molecular).

15 La figura 2 muestra el desarrollo en porcentaje del contenido total de insulina de los productos de degradación de las preparaciones según esta invención durante 2 semanas de almacenamiento a 37 °C. La letra A se refiere a la referencia NovoRapid® y las letras restantes corresponden a las preparaciones de insulina aspart como las descritas en la tabla 1 del ejemplo 1. La adición combinada de nicotinamida, ácido glutámico y arginina, preparaciones F, G, H e I, que difieren en el sistema tampón, tampón de fosfato o tris, y la concentración de insulina y Zn, 0.6 mM y 0.3 mM o 1.2 mM y 0.6 mM, tienen un patrón de degradación similar al de la preparación NovoRapid®, preparación A.

20 La figura 3 muestra la concentración de glucosa plasmática (media más +/- EEM, N = 8) después de la inyección subcutánea en cerdos de una dosis de 1 nmol/kg de las preparaciones según esta invención, a los 0 minutos. La letra A se refiere a la referencia NovoRapid® y las letras restantes corresponden a las preparaciones de insulina aspart como las descritas en la tabla 1 del ejemplo 1. En comparación con la preparación NovoRapid® (preparación A) la velocidad inicial de reducción de la glucosa plasmática es mayor para la preparación con adición de nicotinamida (preparación N) y aún mayor para una combinación de nicotinamida y arginina (preparación M).

25 La figura 4 muestra la concentración de glucosa plasmática (media más +/- EEM, N = 7) después de la inyección subcutánea en cerdos de una dosis de 1 nmol/kg de las preparaciones según esta invención, a los 0 minutos. La letra A se refiere a la referencia NovoRapid® y las letras restantes corresponden a las preparaciones de insulina aspart como las descritas en la tabla 1 del ejemplo 1. En comparación con la preparación NovoRapid® (preparación A) la velocidad inicial de reducción de la glucosa plasmática es mayor para la 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 La figura 5 muestra la concentración de insulina aspart plasmática (media más +/- EEM, N = 7) después de la inyección subcutánea en cerdos de una dosis de 1 nmol/kg de las preparaciones según esta invención, a los 0 minutos. La letra A se refiere a la referencia NovoRapid® y las letras restantes corresponden a las preparaciones de insulina aspart como las descritas en la tabla 1 del ejemplo 1. En comparación con la preparación NovoRapid® (preparación A) la velocidad de absorción inicial del componente insulínico 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 marcadamente mayor.  
35

### Descripción de la invención

40 La absorción después de la inyección subcutánea del compuesto insulínico de las preparaciones de insulina de la presente invención se encontró sorprendentemente que era más rápida que la de las preparaciones de insulina de referencia. Esta propiedad es útil para las insulinas de acción rápida, en particular con relación al régimen de inyecciones múltiples en los que la insulina se administra antes de cada comida. Al tener un inicio de acción más rápido, la insulina se puede administrar convenientemente más próxima a las comidas que con las soluciones de insulina de acción rápida convencionales. Además, una desaparición de la insulina más rápida probablemente disminuye el riesgo de hipoglucemia post ingesta.

45 Las preparaciones de insulina de la presente invención son preparaciones de insulina de acción rápida que contienen un compuesto insulínico como la insulina aspart, un compuesto nicotínico como la nicotinamida y el aminoácido arginina. Opcionalmente, las preparaciones de insulina de la presente invención pueden contener además otros aminoácidos como ácido glutámico. Estas preparaciones de insulina tienen un perfil de absorción rápido que imita la fisiología normal más estrechamente que los tratamientos existentes. Por otra parte, las preparaciones de insulina de la presente invención tienen una estabilidad física y química adecuada para las preparaciones farmacéuticas comerciales.  
50

55 Las preparaciones de insulina de la presente invención proporcionan un inicio de acción aún más rápido en comparación con los tratamientos de insulina existentes. Estas preparaciones de insulina ultra rápidas tienen las ventajas de restaurar la primera fase de la liberación de insulina, comodidad de inyección y suspensión de la producción de glucosa hepática. Las preparaciones de insulina de la presente invención tienen una velocidad de

absorción favorable desde la hipodermis al plasma con un aumento en la velocidad de absorción inicial que varía desde 1.5 hasta 5 veces, en comparación con las preparaciones convencionales como NovoRapid®, según lo sugerido por varios experimentos FC/FD en cerdos. Esta mayor velocidad de absorción puede mejorar el control de la glucemia y la comodidad, y permitir un cambio en la dosificación de pre ingesta a post ingesta. La presente invención se basa en parte, en el sorprendente descubrimiento de que aunque, la adición de nicotinamida permite aumentar la velocidad de absorción, también tiene un efecto negativo sobre la estabilidad química al aumentar significativamente la ca006Etidad de HMWP. Las preparaciones de insulina de la presente invención tienen una mayor estabilidad química por adición de arginina, que 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 pueden además tener mayor estabilidad física, que puede ser útil para utilizar en bombas.

La presente invención proporciona una preparación de insulina que contiene un compuesto de insulina según la invención que está presente en una concentración entre 0.1 mM y 10.0 mM, y donde dicha preparación tiene un pH entre 3 y 8.5. La preparación también contiene un compuesto nicotínico y arginina. La preparación puede contener además uno o más inhibidores de la proteasa, iones metálicos, un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, quelante(s), estabilizantes y surfactantes.

En una realización, las preparaciones de insulina contienen una insulina humana, uno de sus análogos o sus combinaciones, nicotinamida y/o ácido nicotínico y/o sus sales, y arginina y/o sus sales.

En una realización, las preparaciones de insulina según la presente invención contienen una solución acuosa de B28Asp insulina humana, nicotinamida y arginina.

El contenido de B28Asp insulina humana de las soluciones de esta invención puede estar en el intervalo entre 15 y 500 unidades internacionales (UI)/ml, preferentemente en el intervalo entre 50 y 333 UI/ml, en preparaciones inyectables. No obstante, para otros propósitos de administración parenteral, el contenido de compuesto insulínico puede ser superior.

También se describe en este documento una preparación de insulina que contiene un compuesto insulínico, un compuesto nicotínico y ácido glutámico.

En el presente contexto la unidad "UI" corresponde a 6 nmol.

La expresión "insulina aspart" se refiere al análogo de la insulina humana B28Asp insulina humana.

El término "inicio" se refiere al tiempo desde la inyección hasta que la curva farmacocinética (FC) cambia a un aumento.

La expresión "velocidad de absorción" se refiere a la pendiente de la curva FC.

Un "compuesto insulínico" según la invención, se debe entender en este documento como insulina humana, un análogo de la insulina y/o sus combinaciones.

La expresión "insulina humana" según se usa en este documento significa la hormona humana cuya estructura y propiedades son bien conocidas. La insulina humana tiene dos cadenas polipeptídicas que están conectadas por puentes disulfuro entre residuos de cisteína, denominadas cadena A y cadena B. La cadena A es un péptido de 21 aminoácidos y la cadena B es un péptido de 30 aminoácidos, las dos cadenas están conectadas por tres puentes disulfuro: uno entre las cisteínas en las posiciones 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.

La hormona se sintetiza como un precursor proinsulina de una sola cadena (preproinsulina) que consiste en un prepéptido de 24 aminoácidos, seguido de proinsulina que contiene 86 aminoácidos en la configuración: prepéptido-B-Arg-Arg-C-Lys-Arg-A, en la que C es un péptido de conexión de 31 aminoácidos. Arg-Arg y Lys-Arg son sitios de escisión para la escisión del péptido de conexión entre las cadenas A y B.

Por "análogo de la insulina" según se usa en este documento se quiere dar a entender un polipéptido derivado, por mutación, de la estructura primaria de una insulina natural, por ejemplo la de la insulina humana. Se hacen una o más mutaciones eliminando y/o sustituyendo al menos un residuo de aminoácido presente en la insulina natural y/o agregando al menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos agregados y/o sustituidos pueden ser residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de aminoácidos de origen natural.

En una realización, un análogo de la insulina contiene menos de 8 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones y cualquiera de sus combinaciones) en relación con la insulina original, alternativamente menos de 7 modificaciones en relación con la insulina original, alternativamente menos de 6 modificaciones en relación con la insulina original, alternativamente menos de 5 modificaciones en relación con la insulina original, alternativamente menos de 4 modificaciones en relación con la insulina original, alternativamente menos de 3 modificaciones en

relación con la insulina original, alternativamente menos de 2 modificaciones en relación con la insulina original.

Las mutaciones en la molécula de insulina se indican estableciendo la cadena (A o B), la posición, y el código de tres letras para el aminoácido que sustituye al aminoácido natural. Por "desB30" o "B(1-29)" se quiere dar a entender la cadena B de una insulina natural o un análogo de ésta que carece del residuo de aminoácido B30, y por B28Asp insulina humana se quiere dar a entender la insulina humana en la que el residuo de aminoácido en la posición 28 de la cadena B ha sido sustituido por Asp.

Los ejemplos de análogos de la insulina son aquellos en los que 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 la insulina son los análogos de eliminación por ejemplo análogos en los que el aminoácido B30 de la insulina humana ha sido eliminado (des(B30) insulina humana), análogos de la insulina en los que el aminoácido B1 de la insulina humana ha sido eliminado (des(B1) insulina humana), des(B28-B30) insulina humana y des(B27) insulina humana. Los análogos de la insulina en los que la cadena A y/o la cadena B tiene una extensión N-terminal y los análogos de la insulina en los que la cadena A y/o la cadena B tiene una extensión C-terminal como dos residuos de arginina agregados al extremo C-terminal de la cadena B también son ejemplos de análogos de la insulina. Otros ejemplos de análogos de la insulina comprenden combinaciones de las mutaciones mencionadas. Los análogos de la insulina en los que 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 contienen además una o más mutaciones adicionales son otros ejemplos de análogos de la insulina. Los análogos de insulina de la insulina humana en los que el residuo de aminoácido en la posición A21 es Gly y en los que el análogo de la insulina está extendido además en el extremo C-terminal con dos residuos de arginina también son ejemplos de análogos de la insulina.

Otros ejemplos de análogos de la insulina incluyen, pero no exclusivamente: DesB30 insulina humana; AspB28 insulina humana; AspB28,desB30 insulina humana; LysB3,GluB29 insulina humana; LysB28,ProB29 insulina humana; GlyA21,ArgB31,ArgB32 insulina humana; GluA14,HisB25 insulina humana; HisA14,HisB25 insulina humana; GluA14,HisB25,desB30 insulina humana; HisA14, HisB25,desB30 insulina humana; GluA14,HisB25,desB27,desB28,desB29,desB30 insulina humana; GluA14,HisB25,GluB27,desB30 insulina humana; GluA14,HisB16,HisB25,desB30 insulina humana; HisA14,HisB16,HisB25,desB30 insulina humana; HisA8,GluA14,HisB25,GluB27,desB30 insulina humana; HisA8,GluA14,GluB1,GluB16,HisB25,GluB27,desB30 insulina humana; y HisA8,GluA14,GluB16,HisB25,desB30 insulina humana.

La expresión "compuesto nicotínico" incluye nicotinamida, ácido nicotínico, niacina, niacinamida y vitamina B3 y/o sus sales y/o sus combinaciones.

Según la presente invención, la concentración de compuesto nicotínico y/o de sus sales está en el intervalo entre 1 mM y 300 mM, o entre 5 mM y 200 mM.

El término "arginina" o "Arg" incluye el aminoácido arginina y/o una de sus sales. En una realización, la preparación de insulina está compuesta por 1 a 100 mM de arginina.

En una realización, la preparación de insulina está compuesta por 1 a 20 mM de arginina.

En una realización, la preparación de insulina está compuesta por 20 a 90 mM de arginina.

En una realización, la preparación de insulina está compuesta por 30 a 85 mM de arginina.

El término "ácido glutámico" o "Glu" incluye el aminoácido ácido glutámico y/o una de sus sales.

En una realización, la preparación de insulina está compuesta por 1 a 100 mM de ácido glutámico.

En una realización, la preparación de insulina está compuesta por 20 a 90 mM de ácido glutámico.

En una realización, la preparación de insulina está compuesta por 30 a 85 mM de ácido glutámico.

La expresión "preparación farmacéutica" o "preparación de insulina" según se usa en este documento significa un producto que contiene un compuesto insulínico, es decir, una insulina humana, uno de sus análogos y/o sus combinaciones, y un compuesto nicotínico y un aminoácido, opcionalmente junto con otros excipientes como conservantes, quelantes, modificadores de la tonicidad, agentes de masa, estabilizantes, antioxidantes, polímeros y surfactantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos y proteínas (por ejemplo seroalbúmina humana, gelatina o proteínas), donde dicha preparación de insulina es útil para tratar, prevenir o disminuir la gravedad de una enfermedad o un trastorno por administración de dicha preparación de insulina a una persona. Por lo tanto, una preparación de insulina también se conoce en el área como una preparación farmacéutica o una composición farmacéutica.

El tampón se puede elegir del grupo que consiste en, pero no exclusivamente, acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, fosfato ácido de sodio, fosfato disódico, fosfato monosódico, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o sus mezclas. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.

- 5 La preparación de insulina de la presente invención puede contener además otros ingredientes comunes a las preparaciones de insulina, por ejemplo agentes complejantes de zinc como tampones de citrato y fosfato.

Glicerol y/o manitol y/o cloruro de sodio pueden estar presentes en una cantidad correspondiente a una concentración entre 0 y 250 mM, 0 y 200 mM o 0 y 100 mM.

- 10 También pueden estar presentes en las preparaciones de insulina de esta invención estabilizantes, surfactantes y conservantes.

- 15 Las preparaciones de insulina de la presente invención pueden contener además un conservante farmacéuticamente aceptable. El conservante puede estar presente en una cantidad suficiente para obtener un efecto de conservación. La cantidad de conservante en la preparación de insulina se puede determinar por ejemplo de la bibliografía pertinente y/o de cantidades conocidas de conservante, por ejemplo, en productos comerciales. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en preparaciones farmacéuticas se describe, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>a</sup> edición, 1995.

El conservante presente en la preparación de insulina de esta invención puede ser como en las preparaciones de insulina previamente convencionales, por ejemplo fenol, m-cresol y metilparabeno.

- 20 La preparación de insulina de la presente invención puede contener además un quelante. El uso de un quelante en preparaciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>a</sup> Edición, 1995.

- 25 La preparación de insulina de la presente invención puede contener además un estabilizante. El término "estabilizante" según se usa en este documento, se refiere a productos químicos agregados a preparaciones farmacéuticas que contienen polipéptidos para estabilizar el péptido, es decir para aumentar la vida útil y/o el tiempo de uso de dichas preparaciones. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>a</sup> Edición, 1995.

- 30 La preparación de insulina de la presente invención puede contener además un surfactante. El término "surfactante" según se usa en este documento se refiere a cualquier molécula o ión que esté constituido por una parte soluble en agua (hidrófila), la cabeza y un segmento soluble en grasa (lipófilo). Los surfactantes se acumulan preferentemente en las interfases, en las que la parte hidrófila se orienta hacia el agua (fase hidrófila) y la parte lipófila hacia la fase oleosa o hidrófoba (es decir, vidrio, aire, aceite, etc.). La concentración a la cual los surfactantes comienzan a formar micelas se conoce como la concentración micelar crítica o CMC. Además los surfactantes reducen la tensión superficial de un líquido. Los surfactantes se conocen también como compuestos anfipáticos. El término "detergente" es un sinónimo utilizado para los surfactantes en general. El uso de un surfactante en preparaciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>a</sup> Edición, 1995.

- 40 En otra realización, la invención se refiere a una preparación de insulina que contiene una solución acuosa de un compuesto insulínico de la presente invención y un tampón, donde dicho compuesto insulínico está presente en una concentración de 0.1 mM o mayor, y donde dicha preparación tiene un pH entre aproximadamente 3.0 y aproximadamente 8.5 a temperatura ambiente (~25 °C).

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

En una realización, el método para elaborar las preparaciones de insulina de la invención comprende:

- 45 a) preparar una solución disolviendo el compuesto insulínico o una mezcla de compuestos insulínicos en agua o tampón;
- b) preparar una solución disolviendo un ión metálico divalente en agua o tampón;
- c) preparar una solución disolviendo un conservante en agua o tampón;
- d) preparar una solución disolviendo un agente de isotonicidad en agua o tampón;
- e) preparar una solución disolviendo un surfactante y/o un estabilizante en agua o tampón;

f) mezclar la solución a) y una o más de las soluciones b), c), d) y e);

Finalmente ajustar el pH de la mezcla en f) al pH deseado, seguido de esterilización por filtración.

Las preparaciones de insulina de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de la diabetes por administración parenteral. Se recomienda que la dosis de las preparaciones de insulina de esta invención que se va a administrar al paciente sea elegida por un médico.

La administración parenteral se puede realizar por inyección subcutánea, intramuscular intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa en forma de lapicera. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Como otra opción, las preparaciones de insulina que contienen el compuesto insulínico de la invención también se pueden adaptar a la administración transdérmica, por ej. mediante inyección sin aguja o desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosa, por ej. bucal.

Las preparaciones de insulina según la presente invención se pueden administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, tópicamente, por ejemplo, en sitios de la piel y las mucosas, en sitios que eluden la absorción, por ejemplo, la administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en sitios que implican absorción, por ejemplo, la administración en la piel, debajo de la piel, en un músculo o en el abdomen.

En una realización de la invención, la preparación de insulina es una preparación acuosa es decir una preparación que contiene agua. Dicha preparación es generalmente una solución o una suspensión. En otra realización de la invención, la preparación de insulina es una solución acuosa.

La expresión "preparación acuosa" se define como una preparación que contiene al menos 50% p/p de agua. Asimismo, la expresión "solución acuosa" se define como una solución que contiene al menos 50% p/p de agua, y la expresión "suspensión acuosa" se define como una suspensión que contiene al menos 50% p/p de agua.

Las suspensiones acuosas pueden contener los principios activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas.

En una realización, las preparaciones de insulina de esta invención son muy adecuadas para la aplicación en dispositivos tipo lapicera utilizados para los tratamientos con insulina mediante inyección.

En una realización, las preparaciones de insulina de la presente invención se pueden usar en bombas para administración de insulina.

La expresión "estabilidad física" de la preparación de insulina según se usa en este documento se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles como resultado de la exposición de la misma a tensiones termomecánicas y/o interacción con las interfases y las superficies que son desestabilizantes, como las superficies e interfases hidrofóbicas. La estabilidad física de las preparaciones acuosas de proteína se evalúa mediante inspección visual y/o mediciones de turbidez, después de exponer la preparación acondicionada en recipientes adecuados (por ej. cartuchos o viales) a estrés mecánico o físico (por ej. agitación) a diferentes temperaturas durante diversos períodos. La inspección visual de las preparaciones se realiza en una luz fuerte enfocada, con un fondo oscuro. La turbidez de la preparación se caracteriza por una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez por ejemplo en una escala de 0 a 3 (una preparación que no presenta turbidez corresponde a una puntuación visual de 0 y una preparación que presenta turbidez visible a la luz del día corresponde a una puntuación visual de 3). Una preparación se clasifica como físicamente inestable con respecto a la agregación de proteína, cuando presenta turbidez visible a la luz del día. Alternativamente, la turbidez de la preparación se puede evaluar mediante mediciones de turbidez simples conocidas por los expertos. La estabilidad física de las preparaciones acuosas de proteínas también se puede evaluar mediante el uso de un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferentemente una molécula pequeña que de preferencia se une a un conformero no natural de la proteína. Un ejemplo de una sonda molecular espectroscópica pequeña de la estructura de la proteína es tioflavina T. La tioflavina T es una tintura fluorescente que ha sido utilizada ampliamente para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas y tal vez de otras configuraciones de proteínas, la tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación aproximadamente a 450 nm y una emisión potenciada aproximadamente a 482 nm cuando se une a una forma de proteína fibrilar. La tioflavina T sin unir es esencialmente no fluorescente a esas longitudes de onda.

La expresión "estabilidad química" de la preparación de proteína según se usa en este documento se refiere a cambios en la estructura covalente de la proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con posible menor potencia biológica y/o posibles mayores propiedades inmunógenas en comparación con la estructura natural de la proteína. Dependiendo del tipo y la naturaleza de la proteína natural y del medio ambiente al que está expuesta la proteína, se pueden formar diversos productos de degradación química. A menudo se observan cantidades crecientes de productos de degradación durante el almacenamiento y uso de la preparación de la proteína. La mayoría de las proteínas es propensa a la desamidación, un proceso en el cual se hidroliza el grupo

amida de la cadena lateral en residuos de glutaminilo o asparaginilo para formar un ácido carboxílico libre o residuos de asparaginilo para formar un derivado Iso-Asp. Otras vías de degradación implican la formación de productos de alto peso molecular donde dos o más moléculas de proteína están unidas covalentemente entre sí a través de transamidación y/o interacciones disulfuro que dan lugar a la formación de productos de degradación diméricos, oligoméricos y poliméricos unidos covalentemente (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación (por ejemplo de los residuos de metionina) se puede mencionar como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la preparación de la proteína se puede evaluar midiendo la cantidad de productos de degradación química en diversos momentos después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (la formación de productos de degradación se puede acelerar a menudo por ejemplo aumentando la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación se determina a menudo por separación de los productos de degradación dependiendo del tamaño y/o la carga de la molécula, empleando diversas técnicas cromatográficas (por ej. SEC-HPLC y/o RP-HPLC). Dado que los productos HMWP son potencialmente inmunógenos y no son biológicamente activos, son ventajoso bajos niveles de HMWP.

La expresión "preparación estabilizada" se refiere a una preparación con mayor estabilidad física, mayor estabilidad química o mayor estabilidad física y química. En general, una preparación debe ser estable durante el uso y el almacenamiento (de conformidad con las condiciones de uso y almacenamiento recomendadas) hasta la fecha de vencimiento.

El término "diabetes" o "diabetes mellitus" incluye la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2, la diabetes gestacional (durante el embarazo) y otros estados que causen hiperglucemia. 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 organismo no pueden responder adecuadamente a la insulina impidiendo que las células absorban la glucosa. Como resultado, la glucosa se acumula en la sangre.

La diabetes tipo 1, también denominada diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) y diabetes juvenil, es causada por la destrucción de las células  $\beta$ , que generalmente provoca una deficiencia absoluta de insulina.

La diabetes tipo 2, también conocida como diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNDI) y diabetes del adulto, se asocia a resistencia predominante a la insulina y por lo tanto una deficiencia de insulina relativa y/o a un defecto secretor de la insulina predominante con resistencia a la insulina.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" según se usa en este documento significa adecuado para aplicaciones farmacéuticas normales, es decir, que no produce eventos adversos graves en los pacientes.

La expresión "tratamiento de una enfermedad" según se usa en este documento significa el manejo y la atención de un paciente que sufre la enfermedad, la afección o el trastorno e incluye tratamiento, prevención o alivio de la enfermedad. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, la afección o el trastorno. El tratamiento incluye la administración de los principios activos para eliminar o controlar la enfermedad, la afección o el trastorno, así como para aliviar los síntomas o las complicaciones asociados a la enfermedad, la afección o el trastorno, y la prevención de la enfermedad, la afección o el trastorno.

En otra realización, un análogo de la insulina según la invención se usa como un medicamento para retrasar o prevenir el avance de la enfermedad en la diabetes tipo 2.

En una realización de la presente invención, la preparación de insulina según la invención está destinada a ser utilizada como un medicamento para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, incluida la hiperglucemia inducida por estrés, la diabetes tipo 2, la intolerancia a la glucosa, la diabetes tipo 1, y quemaduras, heridas quirúrgicas y otras enfermedades o lesiones en las que es necesario un efecto anabólico en el tratamiento, el infarto de miocardio, un accidente cerebrovascular, una coronariopatía y otros trastornos cardiovasculares.

El tratamiento con una preparación de insulina según la presente invención también se puede combinar con un segundo o más principios farmacológicamente activos, por ej. elegidos entre antidiabéticos, agentes antiobesidad, reguladores del apetito, antihipertensivos, agentes para el tratamiento o la prevención de las complicaciones resultantes de la diabetes o asociadas a ella y agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones y trastornos resultantes de la obesidad o asociados a ella.

El tratamiento con una preparación de insulina según la presente invención también se puede combinar con cirugía bariátrica - cirugía que influye en los niveles de glucosa o homeostasis lipídica como la banda gástrica o derivación (by-pass) gástrica.

La producción de polipéptidos, por ejemplo insulinas, es bien conocida en el área. Un análogo de la insulina según la invención se puede producir por ejemplo por síntesis de péptidos clásica, por ej. síntesis de péptidos en fase sólida empleando química de t-Boc o F-Moc u otras técnicas bien establecidas, véase por ej. Green y Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999. El análogo de la insulina también se puede producir por un método que comprende cultivar una célula huésped, que contiene una secuencia de ADN que codifica el análogo y

capaz de expresar el análogo de la insulina en un medio nutritivo adecuado, en condiciones que permitan la expresión del análogo de la insulina. Para los análogos de la insulina que contienen residuos de aminoácidos no naturales, la célula recombinante debe ser modificada de modo que se incorporen los aminoácidos no naturales en el análogo, por ejemplo mediante el uso de ARNt mutantes. Por consiguiente, en resumen, los análogos de la insulina según la invención se preparan de manera similar a la preparación de los análogos de insulina conocidos.

Se pueden emplear varios métodos para la producción de insulina humana y análogos de la insulina humana. Por ejemplo los tres métodos principales que se utilizan en la producción de insulina en microorganismos se dan a conocer en WO2008034881. Dos de éstos involucran *Escherichia coli*, con la expresión de una gran proteína de fusión 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. pp 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 la insulina en el medio (Thim et al. (1986) PNAS 83:6766-6770). El estado anterior de la técnica da a conocer una serie de precursores de la insulina que se expresan en *E. coli* o en *Saccharomyces cerevisiae*, véanse U.S.5,962,267, WO 95/16708, EP 0055945, EP 0163529, EP 0347845 y EP 0741188.

Los análogos de la insulina se producen mediante expresión de una secuencia de ADN que codifica el análogo de la insulina en cuestión en una célula huésped adecuada, por técnicas bien conocidas como las divulgadas por ej. en US 6500645. El análogo de la insulina se expresa 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 la cantidad de producto expresado directamente y puede tener hasta 15 residuos de aminoácidos de longitud. La extensión N-terminal se va a escindir *in vitro* después del aislamiento del caldo de cultivo y por lo tanto tendrá un sitio de escisión próximo a B1. Las extensiones N-terminales del tipo adecuado en la presente invención se dan a conocer en US 5,395,922 y EP 765,395. La extensión C-terminal puede tener la función de proteger la insulina madura o la molécula del análogo de la insulina contra el procesamiento proteolítico intracelular por las exoproteasas de la célula huésped. La extensión C-terminal debe ser escindida extracelularmente en el caldo de cultivo por la carboxipeptidasa secretada activa o *in vitro* luego del aislamiento del caldo de cultivo. Un método para producir insulina madura y análogos de la insulina con extensiones C-terminales en la cadena B, que son eliminadas por la carboxipeptidasa, se da a conocer en WO 08037735. El producto insulínico buscado del proceso puede ser una insulina humana de dos cadenas o un análogo de la insulina humana de dos cadenas que puede tener, o no, una extensión C-terminal corta de la cadena B. Si el producto insulínico buscado no va a tener una extensión C-terminal de la cadena B, entonces dicha extensión C-terminal debería poder ser escindida de la cadena B, posteriormente, antes de los pasos de purificación.

La presente invención también contempla la lista de realizaciones no limitante siguiente:

1. Una preparación de insulina que contiene:

- un compuesto insulínico,
- un compuesto nicotínico, y
- arginina.

2. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 1, en la que el compuesto insulínico es insulina humana o un análogo de la insulina.

3. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico es B28Asp insulina humana.

4. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico es B28LysB29Pro insulina humana.

5. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico es B3LysB29Glu insulina humana.

6. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en un intervalo elegido 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 de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.1 mM y 10.0 mM.

8. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto

insulínico está presente en una cantidad entre 0.1 mM y 3 mM.

9. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.1 mM y 2.5 mM.
- 5 10. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.1 mM y 2 mM.
11. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.1 mM y 1.5 mM.
12. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.2 mM y 2.5 mM.
- 10 13. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.2 mM y 2.0 mM.
14. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.2 mM y 1.5 mM.
- 15 15. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.3 mM y 3.0 mM.
16. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.3 mM y 2.5 mM.
17. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.3 mM y 2 mM.
- 20 18. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.3 mM y 1.5 mM.
19. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.5 mM y 1.3 mM.
- 25 20. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.3 mM y 1.2 mM.
21. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.6 mM y 1.2 mM.
22. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad de aproximadamente 0.6, o de aproximadamente 1.2 mM.
- 30 23. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad de aproximadamente 0.3 mM.
24. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad de aproximadamente 0.6 mM.
- 35 25. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad de aproximadamente 1.2 mM.
26. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto nicotínico se elige del grupo que consiste en nicotinamida, ácido nicotínico, niacina, niacinamida y vitamina B3 y/o sus sales y/o sus combinaciones.
- 40 27. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto nicotínico se elige entre nicotinamida y ácido nicotínico y/o sus sales y/o sus combinaciones.
28. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que el compuesto nicotínico está presente en un intervalo elegido entre los siguientes: 1-300 mM; 5-200 mM; 40-120 mM, 70-140 mM u 80-130 mM.
- 45 29. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por 1 mM a 300 mM del compuesto nicotínico.
30. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por 8 mM a

- 260 mM del compuesto nicotínico.
31. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por 5 mM a 200 mM del compuesto nicotínico.
- 5 32. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por 1 mM a 150 mM del compuesto nicotínico.
33. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por 5 mM a 20 mM del compuesto nicotínico.
34. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por 20 mM a 120 mM del compuesto nicotínico.
- 10 35. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por 40 mM a 120 mM del compuesto nicotínico.
36. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por 20 mM a 40 mM del compuesto nicotínico.
- 15 37. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por 60 mM a 80 mM del compuesto nicotínico.
38. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por 70 mM a 140 mM del compuesto nicotínico.
39. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por 80 mM a 130 mM del compuesto nicotínico.
- 20 40. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por aproximadamente 8 mM, 30 mM, 100 mM o 130 mM del compuesto nicotínico.
41. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por aproximadamente 8 mM del compuesto nicotínico.
- 25 42. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por aproximadamente 30 mM, 100 mM o 130 mM del compuesto nicotínico.
43. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por aproximadamente 30 mM del compuesto nicotínico
44. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por aproximadamente 100 mM del compuesto nicotínico.
- 30 45. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por aproximadamente 130 mM del compuesto nicotínico.
46. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes compuesta por aproximadamente 150 mM del compuesto nicotínico
- 35 47. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por los intervalos siguientes del 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 de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por los intervalos siguientes del compuesto de arginina: 1-120 mM, 8-85 mM o 1-40 mM.
- 40 49. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por 1 mM a 120 mM de arginina.
50. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por 1 mM a 100 mM de arginina.
51. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por 5 mM a 120 mM de arginina.
- 45 52. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por 20 mM a

- 90 mM de arginina.
53. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por 30 mM a 85 mM de arginina.
- 5 54. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por 8 mM a 85 mM de arginina.
55. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por 30 mM a 60 mM de arginina.
56. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por 10 mM a 40 mM de arginina.
- 10 57. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por 1 mM a 40 mM de arginina.
58. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en la que la arginina está presente en un intervalo elegido entre 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.
- 15 59. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 1 mM de arginina.
60. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 2 mM de arginina.
- 20 61. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 3 mM de arginina.
62. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 4 mM de arginina.
63. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 5 mM de arginina.
- 25 64. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 6 mM de arginina.
65. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 7 mM de arginina.
- 30 66. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 8 mM de arginina.
67. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 9 mM de arginina.
68. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 10 mM de arginina.
- 35 69. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 15 mM de arginina.
70. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 20 mM de arginina.
- 40 71. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 25 mM de arginina.
72. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 30 mM de arginina.
73. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 35 mM de arginina.
- 45 74. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por

- aproximadamente 40 mM de arginina.
75. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 45 mM de arginina.
- 5 76. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 50 mM de arginina.
77. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 55 mM de arginina.
78. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, compuesta por aproximadamente 60 mM de arginina.
- 10 79. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, que contiene además ácido glutámico.
80. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 79, en la que el ácido glutámico está presente en un intervalo elegido entre los siguientes: 1-100 mM, 20-90 mM, 30-90 mM, 30-85 mM o 30-50 mM.
81. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 79, compuesta por 1 mM a 100 mM de ácido glutámico.
- 15 82. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 79, compuesta por 20 mM a 90 mM de ácido glutámico.
83. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 79, compuesta por 30 mM a 85 mM de ácido glutámico.
84. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 79, compuesta por 30 mM a 50 mM de ácido glutámico.
85. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 79, compuesta por aproximadamente 30 mM o 50 mM de ácido glutámico.
- 20 86. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 79, compuesta por aproximadamente 30 mM de ácido glutámico.
87. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 79, compuesta por aproximadamente 50 mM de ácido glutámico.
- 25 88. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, que contiene además un ión metálico, conservante(s), agente(s) de isotonicidad y estabilizante(s), detergente(s) y uno o más tampones.
89. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 88, en la que dicho tampón es Tris.
90. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 89, compuesta por 2 mM a 50 mM de Tris.
91. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 89, compuesta por 10 mM a 40 mM de Tris.
92. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 89, compuesta por 20 mM a 30 mM de Tris.
- 30 93. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 89, compuesta por aproximadamente 10 mM, 20 mM, 30 mM o 40 mM de Tris.
94. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 89, compuesta por aproximadamente 10 mM de Tris.
95. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 89, compuesta por aproximadamente 20 mM de Tris.
96. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 89, compuesta por aproximadamente 30 mM de Tris.
- 35 97. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 89, compuesta por aproximadamente 40 mM de Tris.
98. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 89, en la que el ión metálico es zinc.
99. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que menos de 6 iones de zinc están presentes por hexámero del compuesto insulínico.
- 40 100. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que menos de 4 iones de zinc están presentes por hexámero del compuesto insulínico.
101. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que menos de 3 iones de zinc están

presentes por hexámero del compuesto insulínico.

102. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que la relación molar zinc:insulina es entre 2:6 y 5:6.
- 5 103. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que la relación molar zinc:insulina es entre 2.5:6 y 4.5:6.
104. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que la relación molar zinc:insulina es entre 3:6 y 4:6.
105. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que la relación molar zinc:insulina es aproximadamente 2:6.
- 10 106. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que la relación molar zinc:insulina es aproximadamente 2.5:6.
107. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que la relación molar zinc:insulina es aproximadamente 3:6.
- 15 108. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que la relación molar zinc:insulina es aproximadamente 3.5:6.
109. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que la relación molar zinc:insulina es aproximadamente 4:6.
110. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que la relación molar zinc:insulina es aproximadamente 4.5:6.
- 20 111. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 98, en la que la relación molar zinc:insulina es aproximadamente 5:6.
112. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 88, en la que el estabilizante es un detergente no iónico.
- 25 113. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 112, en la que el detergente es polisorbato 20 (Tween 20) o polisorbato 80 (Tween 80).
114. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 112, en la que el detergente es polisorbato 20 (Tween 20).
115. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 112, en la que el detergente es polisorbato 80 (Tween 80).
- 30 116. La preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 112 a 115, compuesta por 5 y 100 ppm, entre 10 y 50 ppm o entre 10 y 20 ppm de polisorbato.
117. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 88, que contiene además un compuesto fenólico.
118. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 117, en la que dicho compuesto fenólico está presente en una cantidad entre 0 y 6 mg/ml, o entre 0 y 4 mg/ml.
- 35 119. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 88, que contiene además m-cresol.
120. La preparación de insulina de acuerdo con la realización 119, en la que el m-cresol está presente en una cantidad entre 0.5 y 4.0 mg/ml o entre 0.6 y 4.0 mg/ml.
121. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH es neutro a ligeramente básico.
- 40 122. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas en la que el pH es entre 7.0 y 8.0.
123. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH es aproximadamente 7.0.
- 45 124. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH es aproximadamente 7.1.

125. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH es aproximadamente 7.2.
126. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH es aproximadamente 7.3.
- 5 127. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH es aproximadamente 7.4.
128. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH es aproximadamente 7.5.
- 10 129. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH es aproximadamente 7.6.
130. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH es aproximadamente 7.7.
131. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH es aproximadamente 7.8.
- 15 132. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH es aproximadamente 7.9.
133. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH es aproximadamente 8.0.
- 20 134. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, para usar en el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, incluida la hiperglucemia inducida por estrés, la diabetes tipo 2, la intolerancia a la glucosa, la diabetes tipo 1, y quemaduras, heridas quirúrgicas y otras enfermedades o lesiones en las que es necesario un efecto anabólico en el tratamiento, el infarto de miocardio, un accidente cerebrovascular, una coronariopatía y otros trastornos cardiovasculares y el tratamiento de pacientes diabéticos y no diabéticos críticamente enfermos.

25 **Ejemplos**

Ejemplo 1

Elaboración de preparaciones farmacéuticas

30 Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular como una solución acuosa. El medio acuoso se hace isotónico, por ejemplo, con cloruro de sodio o glicerol. Además, el medio acuoso puede contener iones zinc, por ejemplo agregados como acetato de zinc o cloruro de zinc, tampones y conservantes. La arginina se puede agregar como Arg, HCl. El valor de pH de la preparación se ajusta al valor deseado y puede ser entre aproximadamente 3 y aproximadamente 8.5, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 o aproximadamente 6.5 y aproximadamente 7.5 dependiendo del punto isoeléctrico, pI, de la insulina en cuestión.

Tabla 1. Composición de las preparaciones de insulina según esta invención

	Insulina aspart (mM)	Zn (mM)	Fenol (mM)	m-cresol (mM)	NaCl (mM)	Fosfato (mM)	Tris (mM)	Glicerol (% p/v)	Arginina, HCl (mM)	Nicotin-amida (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

ES 2 543 705 T3

	Insulina aspart (mM)	Zn (mM)	Fenol (mM)	m-cresol (mM)	NaCl (mM)	Fosfato (mM)	Tris (mM)	Glicerol (% p/v)	Arginina, HCl (mM)	Nicotinamida (mM)	Ácido glutámico (mM)	pH
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

\* Disponible comercialmente NovoRapid®

Tabla 2. Composición de otras preparaciones de insulina según esta invención

Preparación	Insulina aspart (mM)	[Zn <sup>2+</sup> ] 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 la estabilidad química de la insulina

Cromatografía de exclusión por tamaño

5 La determinación cuantitativa de proteínas de alto peso molecular (HMWP) y del monómero de insulina aspart se realizó en una columna Waters insulin (300 x 7.8 mm, N° de pieza wat 201549) con un eluyente que contenía ácido acético 2.5 M, L-arginina 4 mM y 20% (V/V) de acetonitrilo a una velocidad de flujo de 1 ml/min y 40 °C. La detección se realizó en un detector de absorbancia sintonizable (Waters 486) a 276 nm. El volumen de inyección fue de 40 µl y un estándar de insulina humana 600 µM. Se midieron las HMWP y la concentración de las preparaciones en cada punto de toma de muestra.

Cromatografía en fase reversa (UPLC)

10 La determinación de las impurezas relacionadas con la insulina aspart se llevó a cabo en un sistema UPLC utilizando una columna BEH RP C8 2.1 x 100 mm, tamaño de partícula de 1.7 µm. Waters N° de pieza 186002878. con una velocidad de flujo de 0.5 ml/min a 40 °C, detección a 220 nm. La elución se llevó a cabo con una fase móvil que consistía en lo siguiente:

A. 10% (p/v) de acetonitrilo, 2.8% (p/p) de sulfato de sodio, 0.3% (p/p) de ácido o-fosfórico, pH 3.5.

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

La cantidad de B28iso-aspartato, desamido y otras impurezas relacionadas se determinó como el área de absorbancia medida en porcentaje del área de absorbancia total determinada después de la elución de los conservantes. El método RP-UPLC es equivalente al método analítico utilizado para el control de calidad de los productos farmacéuticos de insulina aspart comercializados por Novo Nordisk.

20 La adición de arginina reduce la cantidad de productos de degradación formados, especialmente las HMWP y las formas desamido, el aumento de la concentración de arginina en el intervalo de 10 a 50 mM conduce a una reducción adicional de la degradación. La estabilidad física medida como el retraso en el tiempo en el ensayo de ThT se reduce luego de la adición de arginina y se reduce de manera creciente cuando aumenta la concentración de arginina. El rendimiento general de arginina 50 mM es superior a glicina 50 mM, ácido glutámico 50 mM o histidina 50 mM con respecto a la reducción de la formación de productos de degradación, como se muestra en la tabla 3 siguiente.

Tabla 3. Datos de estabilidad física y química para las preparaciones de insulina 1-9 de la tabla 2 (Ejemplo 1).

Preparación	Estabilidad física, tiempo de retraso (min) en el ensayo de ThT	Estabilidad química Contenido de productos de degradación (%) medido como la diferencia entre el contenido después de la incubación durante 2 semanas a 37 °C y a 4 °C			
		B28 IsoAsp	formas desamido	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

## ES 2 543 705 T3

Preparación	Estabilidad física, tiempo de retraso (min) en el ensayo de ThT	Estabilidad química Contenido de productos de degradación (%) medido como la diferencia entre el contenido después de la incubación durante 2 semanas a 37 °C y a 4 °C			
		B28 IsoAsp	formas desamido	Otras impurezas relacionadas	HMWP
9	0	1.75	6.99	2.22	1.01

### Ejemplo 3

Estudios fármacocinéticos (FC)/farmacodinámicos (FD) en modelo de cerdos LYD y ensayo de análisis plasmático

Estudios FC/FD en cerdos LYD

- 5 Los estudios FC/FD se realizaron en cerdas domésticas, cruce LYD, que pesaban entre 55 y 110 kg. Las cerdas se cateterizaron en la vena yugular a través de una vena del oído al menos 2 días antes del inicio del estudio. La última comida antes del inicio del estudio se sirvió a los animales aprox. 18 horas antes de la inyección de la preparación de prueba, y los animales tuvieron acceso libre al agua todo el tiempo durante el período de ayuno y el período de prueba.
- 10 A las 0 horas la preparación de prueba se administró por vía subcutánea en el costado del cuello. Se extrajo una muestra de sangre antes de la dosificación y se extrajeron muestras del catéter a intervalos regulares después de la dosificación que se pasaron a tubos de vidrio de 1.5 ml recubiertos previamente con heparina. Las muestras de sangre se mantuvieron en agua helada hasta la separación del plasma por centrifugación durante 10 min a 3000 rpm a 4 °C, que se llevó a cabo en los primeros 30 minutos. Las muestras de plasma se almacenaron a 4 °C durante un
- 15 plazo corto (2 a 3 horas) o a -18 °C para el almacenamiento a largo plazo y se analizaron para determinar glucosa en YSI o Konelab 30i y la concentración de insulina Aspart por LOCI.

Inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente (LOCI) para la cuantificación de insulina Aspart

- 20 El análisis LOCI de insulina Aspart es un inmunoensayo sándwich a base de anticuerpos monoclonales y aplica la proximidad de dos perlas, las perlasceptoras recubiertas de europio y las perlas dadoras recubiertas de estreptavidina. Las perlasceptoras se recubren con un anticuerpo específico anti-insulina humana y reconocen la insulina Aspart en muestras plasmáticas. Un segundo anticuerpo biotinilado se une específicamente a la insulina Aspart y junto con las perlas recubiertas de estreptavidina, forman el sándwich. La iluminación del inmunocomplejo de agregado de perlas libera oxígeno singulete de las perlas dadoras que canaliza en las perlasceptoras y desencadena la quimioluminiscencia. Se midió la quimioluminiscencia y la cantidad de luz generada es proporcional
- 25 a la concentración de insulina Aspart.

En comparación con el producto comercializado NovoRapid®, la velocidad inicial de reducción de la glucosa plasmática es mayor para las preparaciones de la presente invención (figuras 3 y 4). Asimismo, en comparación con NovoRapid®, la velocidad de absorción inicial del componente insulínico de las preparaciones de la presente invención, es marcadamente mayor (Figura 5).

### 30 Ejemplo 4

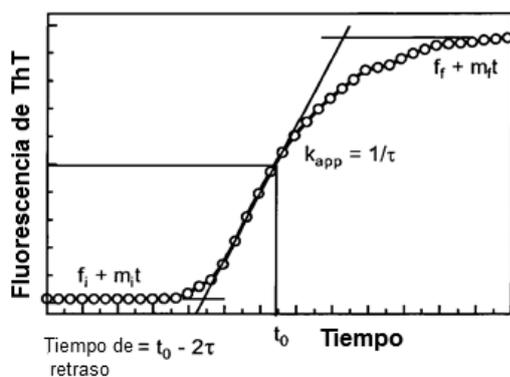
Introducción general al análisis de fibrilación de ThT para la evaluación de la estabilidad física de formulaciones de proteínas

- 35 La baja estabilidad física de un péptido puede conducir a la formación de fibrillas amiloides, que se observan en la muestra como estructuras macromoleculares bien ordenadas, filiformes, que con el tiempo dan por resultado la formación de un gel. Esto se ha medido tradicionalmente mediante inspección visual de la muestra. Sin embargo, esa clase de medición es muy subjetiva y depende del observador. Por consiguiente, la aplicación de una sonda indicadora de molécula pequeña es mucho más ventajosa. La tioflavina T (ThT) es una sonda de ese tipo y tiene una fluorescencia identificativa distintiva cuando se une a las fibrillas [Naiki et al. (1989) Anal. Biochem. 177, 244-249; LeVine (1999) Methods. Enzymol. 309, 274-284].

- 40 El curso del tiempo para la formación de fibrillas se puede describir por una curva sigmoideal con la expresión siguiente [Nielsen et al. (2001) Biochemistry 40, 6036-6046]:

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

En ella, F es la fluorescencia de ThT en el tiempo t. La constante  $t_0$  es el tiempo necesario para alcanzar el 50% de la fluorescencia máxima. Los dos parámetros importantes que describen la formación de fibrillas son el tiempo de retraso calculado por  $t_0 - 2\tau$  y la constante de velocidad aparente  $k_{app} = 1/\tau$ .



5

La formación de un producto intermedio parcialmente plegado del péptido es sugerido como un mecanismo general de iniciación de la fibrilación. Pocos de esos productos intermedios se nuclean para formar una plantilla en la que más productos intermedios pueden ensamblarse y se produce la fibrilación. El tiempo de retraso corresponde al intervalo en el que se construye la masa crítica del núcleo y la constante de velocidad aparente es la velocidad a la cual se forma la fibrilla en sí misma.

10

#### Preparación de la muestra

Se prepararon muestras en el momento antes de cada ensayo. Cada composición de la muestra se describe en cada ejemplo. El pH de la muestra se ajustó al valor deseado usando cantidades apropiadas de NaOH y HClO<sub>4</sub> o HCl concentrados. Se agregó tioflavina T a las muestras desde una solución madre en H<sub>2</sub>O hasta una concentración final de 1  $\mu$ M.

15

Se colocaron alícuotas de las muestras de 200  $\mu$ l en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Packard OptiPlate™-96, de poliestireno blanco). Por lo general, se colocaron cuatro u ocho réplicas de cada muestra (que corresponden a una condición de la prueba) en una columna de pocillos. La placa se selló con Scotch Pad (Qiagen).

#### Incubación y medición de la fluorescencia

20

La incubación a una temperatura dada, la agitación y la medición de la emisión de fluorescencia de ThT se hicieron en un lector de placas de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL o un lector de placas Varioskan (Thermo Labsystems). La temperatura se ajustó a 37 °C. La agitación orbital se ajustó a 960 rpm con una amplitud de 1 mm en todos los datos presentados. La medición de la fluorescencia se hizo empleando excitación a través de un filtro de 444 nm y medición de la emisión a través de un filtro de 485 nm.

25

Cada corrida se inició incubando la placa a la temperatura del ensayo durante 10 min. La placa se midió cada 20 minutos para un período de tiempo deseado. Entre cada medición, la placa se agitó y se calentó como se describe.

#### Manejo de los datos

30

Los puntos de medición se guardaron en formato Excel de Microsoft para el procesamiento posterior y el trazado y el ajuste de la curva se realizaron usando GraphPad Prism. La emisión de fondo de ThT en ausencia de fibrillas fue insignificante. Los puntos de datos son habitualmente una media de cuatro u ocho muestras y se muestran con barras de error de desviación estándar. Sólo los datos obtenidos en el mismo experimento (es decir, las muestras de la misma placa) se presentan en el mismo gráfico asegurando una medida relativa de fibrilación entre experimentos.

35

El conjunto de datos puede ajustarse a la ecuación (1). Sin embargo, puesto que no siempre se consiguen curvas sigmoideas completas durante el tiempo de medición, aquí los tiempos de retraso se determinaron visualmente a partir de la curva de fluorescencia de ThT como el momento en el cual la fluorescencia de ThT es diferente de la del nivel de fondo.

#### Medición de las concentraciones iniciales y finales

5 Se midió la concentración de péptido en cada una de las formulaciones probadas tanto antes de la aplicación en el ensayo de fibrilación de ThT ("inicial") como después de completarse la fibrilación de ThT ("después del ensayo de ThT"). Las concentraciones se determinaron por métodos de HPLC en fase reversa usando estándares de pramlintida como referencia. Antes de la medición posterior a completarse el ensayo, se recogieron 150 µl de cada una de las réplicas y se transfirieron a un tubo Eppendorf. Estos se centrifugaron a 30 000 G durante 40 min. Los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de 0.22 µm antes de la aplicación en el sistema de HPLC.

**REIVINDICACIONES**

1. Una preparación de insulina que contiene:
  - un compuesto insulínico,
  - un compuesto nicotínico, y
- 5       • arginina.
2. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho compuesto insulínico es una insulina de acción rápida.
3. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el compuesto insulínico es insulina humana o un análogo de la insulina.
- 10   4. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto insulínico es B28Asp insulina humana o B28LysB29Pro insulina humana o B3LysB29Glu insulina humana.
5. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.2 mM y 2.0 mM.
- 15   6. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto insulínico está presente en una cantidad entre 0.3 mM y 1.2 mM.
7. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto nicotínico se elige del grupo que consiste en nicotinamida, ácido nicotínico, niacina, niacinamida y vitamina B3 y/o sus sales y/o sus combinaciones.
- 20   8. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto nicotínico es nicotinamida y/o sus sales.
9. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, compuesta por 5 mM a 200 mM del compuesto nicotínico.
10. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, compuesta por 80 mM a 200 mM del compuesto nicotínico.
- 25   11. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, compuesta por 20 mM a 90 mM de arginina.
12. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, compuesta por 10 mM a 40 mM de arginina.
13. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, compuesta por 20 mM de arginina.
14. La preparación de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, compuesta por 20 mM de arginina, y 80 mM a 200 mM del compuesto nicotínico.
- 30   15. Una preparación de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para usar en el tratamiento de la diabetes mellitus, la hiperglucemia, la hiperglucemia inducida por estrés, la diabetes tipo 2, la intolerancia a la glucosa, la diabetes tipo 1, quemaduras, heridas quirúrgicas, el infarto de miocardio, un accidente cerebrovascular, una coronariopatía y trastornos cardiovasculares.

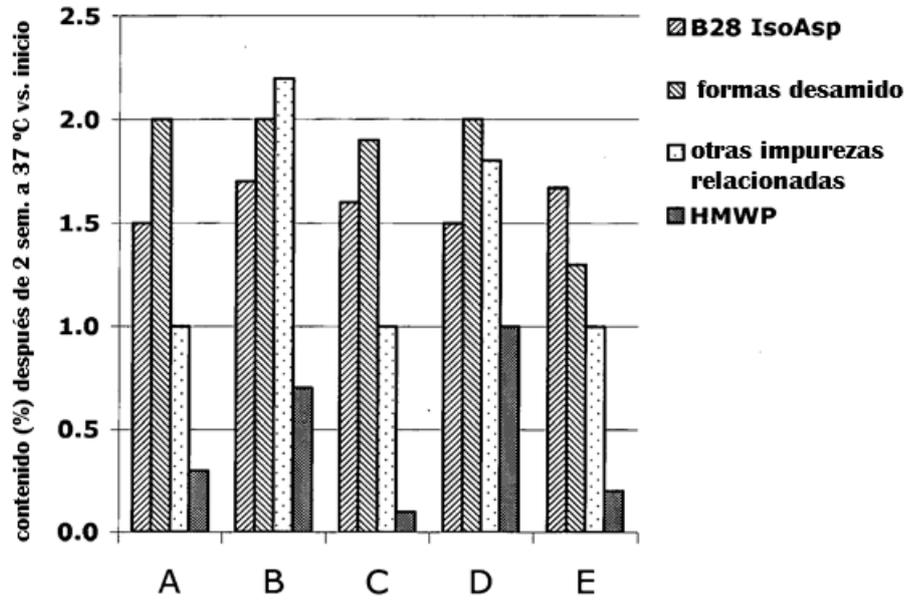


Fig. 1

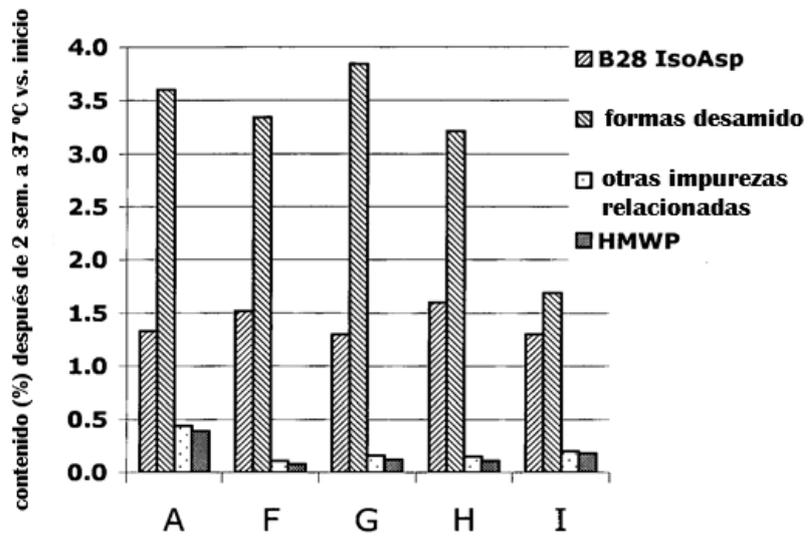


Fig. 2

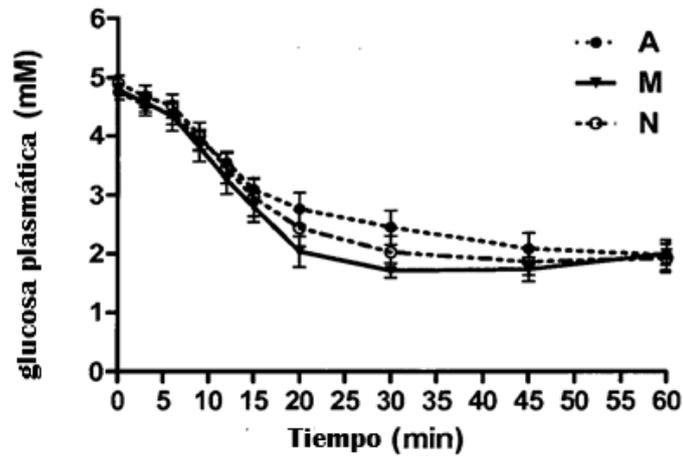


Fig. 3

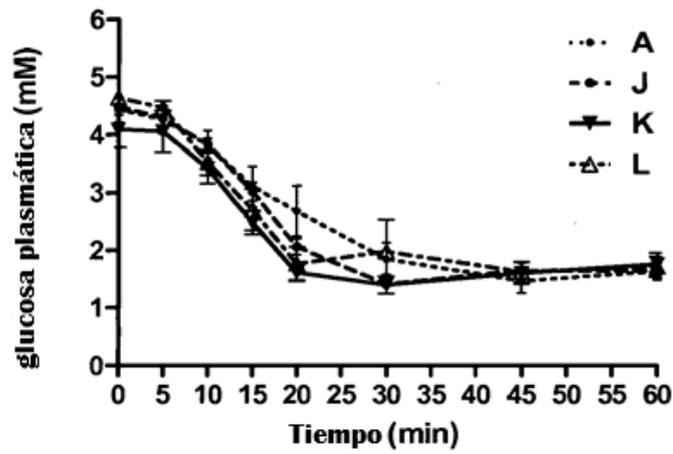


Fig. 4

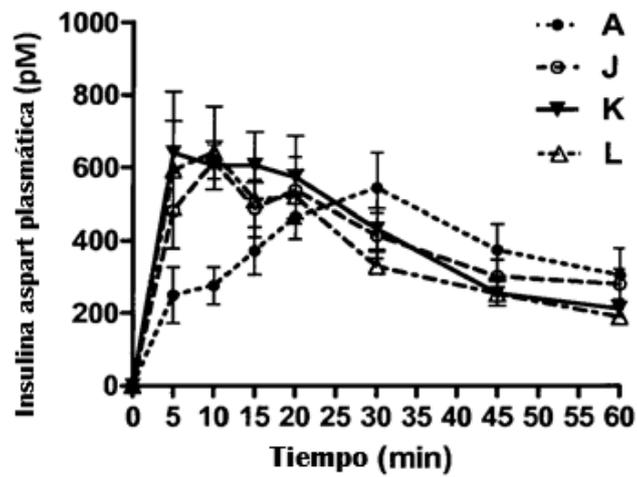


Fig. 5