

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 401**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 47/02** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2006.01)  
**A61K 47/42** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 38/28** (2006.01)  
**C12N 15/17** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2010 E 10773904 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2496213**

54 Título: **Solución farmacéutica de albúmina unida no covalentemente e insulina acilada**

30 Prioridad:

**02.11.2009 EP 09174762**  
**10.11.2009 US 259659 P**  
**23.08.2010 EP 10173750**  
**10.09.2010 US 381760 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.11.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NAVER, HELLE;**  
**HAVELUND, SVEND y**  
**MADSEN, PETER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 552 401 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**

Solución farmacéutica de albúmina unida no covalentemente e insulina acilada

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una solución farmacéutica inyectable de una insulina acilada que, después de la inyección subcutánea, no precipita o precipita sólo en una cantidad inferior o poco importante.

## 10 ANTECEDENTES DE ESTA INVENCION

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico en el cual la posibilidad de utilizar la glucosa se ha perdido parcialmente o por completo (designadas diabetes 2 y diabetes 1, respectivamente). En todo el mundo, aproximadamente 5% de toda la población padecen diabetes y el trastorno se aproxima a proporciones epidémicas. Desde la introducción de la insulina a principios de los años 1920, se han realizado esfuerzos continuos para mejorar el tratamiento de la diabetes mellitus. Dado que muchas personas que padecen diabetes están sometidas a tratamiento crónico durante varias décadas, existe gran necesidad de formulaciones de insulina seguras, cómodas, y que mejoren la calidad de vida.

En el tratamiento de la diabetes mellitus, se han sugerido y utilizado muchas variedades de formulaciones de insulina, tales como insulina regular, insulina isófana (designada NPH), suspensiones insulina-cinc, tales como Semilente®, Lente® y Ultralente®) e insulina isófana bifásica. Algunas de las formulaciones de insulina comerciales disponibles se caracterizan por un comienzo de acción rápido y otras formulaciones tienen un comienzo relativamente lento pero exhiben una acción más o menos prolongadas. Las proporciones de insulina de acción rápida son usualmente soluciones de insulina, mientras que las soluciones de insulina de acción retardada pueden ser suspensiones que contienen insulina en forma cristalina y/o amorfa precipitada por adición de sales de cinc solas o por adición de protamina o por una combinación de ambas. Recientemente, se han puesto también en el mercado formulaciones de insulina soluble de acción prolongada, y en tales formulaciones la insulina puede ser una insulina acilada.

Algunas insulinas y análogos de insulina inventados con anterioridad que están acilados con una cadena de ácido graso con afinidad alta para albúmina tienen - debido a su diseño análogo - alta hidrofobicidad o valor pI modificado (comparado con el de la insulina humana). La inyección subcutánea de una insulina acilada de este tipo puede dar como resultado precipitación por salado o formación de oligómeros de la insulina acilada. Lamentablemente, la insulina acilada precipitada se solubiliza sólo parcialmente en el subcutis. Un inconveniente de esto es que estas insulinas, una vez inyectadas, tienen biodisponibilidad limitada y, por tanto, es difícil controlar la administración de insulina.

Se ha encontrado que es extremadamente importante para un paciente diabético controlar todo lo posible el nivel de glucosa en sangre. Un buen control del nivel de glucosa en sangre reducirá - además de controlar la enfermedad diabética - el riesgo de complicaciones tales como enfermedades cardiovasculares, amputación de piernas y ceguera.

En J. Histochem. Cytochem. 36 (1988), 359-65, se estudió la dinámica de receptores de complejos oro-insulina, estabilizados con seroalbúmina bovina. En dicho documento no se menciona formulación farmacéutica alguna.

Las reivindicaciones de US 2.789.080 se refieren a una composición acuosa que comprende insulina y una albúmina animal esterificada. Alternativamente, la albúmina puede estar amidificada. Dado que esta patente reivindica prioridad desde 1953, la insulina de que se trata es probablemente insulina de porcino o bovino.

La reivindicación 1 US 4.492.684 se refiere a una composición que comprende una matriz de albúmina parcialmente reticulada e insulina, consiguiéndose dicha reticulación por el uso de aldehído glutárico, que da como resultado enlaces covalentes.

La reivindicación 1 de 4.963.526 se refiere a una composición útil como forma de dosificación oral de insulina, derivándose dicha composición de una composición líquida bifásica de coacervato. Conforme a la reivindicación 3 de dicho documento, dicha composición puede contener, por ejemplo, albúmina. Aparentemente, no se menciona en el mismo insulina acilada alguna.

La reivindicación 1 de US 6.051.551 se refiere a un método de tratamiento de la diabetes, que comprende administrar una insulina o análogo de insulina humana acilada con ácido graso por inhalación. Conforme a las columnas 11 y 12 de dicho documento, formulaciones adecuadas para uso con un pulverizador o un nebulizador pueden incluir también un agente para estabilización de la proteína insulina acilada con ácido graso, tal como, por ejemplo, una proteína a granel. Proteínas a granel incluyen, por ejemplo, albúmina. La albúmina no se utiliza en ninguno de los ejemplos prácticos de dicho documento.

La reivindicación 1 de WO 92/19260 se refiere a una solución de hormona peptídica, conteniendo dicha solución seroalbúmina en una cantidad capaz de estabilizar la hormona a fin de prevenir la precipitación de la misma. En el único ejemplo experimental de dicha solicitud, se utiliza la hormona insulina, de una especie desconocida.

5 La reivindicación 20 de WO 02/064115 se refiere a una formulación de insulina en polvo fabricada por liofilización de una dispersión de una formulación líquida de insulina conforme a la reivindicación 1 del documento a la que se ha añadido un crioprotector que, por ejemplo, es albúmina. En el documento no se menciona ninguna insulina acilada.

10 La reivindicación 1 de WO 2008/013938 se refiere a una formulación aerosolizable que comprende un derivado de insulina. En la página 34 del documento, se menciona albúmina como uno de los muchos ingredientes posibles en la formulación aerosolizable.

15 La reivindicación 1 en WO 2008/034881 se refiere a nuevos análogos de insulina resistentes a las proteasas que se han desarrollado para administración oral a pacientes que prefieren dicha ruta de administración. La preparación de formulaciones orales se describe en el documento en las páginas 31-34 y, en la página 34, se menciona albúmina como uno de los muchos ingredientes posibles en la formulación oral.

20 US 2006/0019874 describe ciertos complejos catiónicos de conjugados de compuestos de insulina y su formulación y utilización.

#### OBJETOS DE ESTA INVENCION

25 El objeto de esta invención es superar o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica anterior, o proporcionar una alternativa útil.

Otro aspecto de esta invención se refiere al suministro de una formulación farmacéutica acuosa soluble que puede utilizarse para tratar la diabetes y que puede utilizarse fácilmente para controlar o prevenir la diabetes.

30 Otro aspecto de esta invención se refiere al suministro de una formulación farmacéutica acuosa soluble que contiene una insulina acilada que, después de la inyección subcutánea, no precipita o precipita sólo en una cantidad menor o insignificante.

35 Otro aspecto de esta invención se refiere al suministro de una formulación farmacéutica acuosa soluble que contiene una insulina acilada que, después de la inyección subcutánea, no se oligomeriza con albúmina en el sitio de inyección para formar un oligómero con peso molecular alto, v.g., un peso molecular de 440 kDa, o se oligomeriza sólo en una cantidad poco importante o menor.

40 Otro aspecto de esta invención se refiere al suministro de una formulación farmacéutica acuosa soluble que contiene una insulina acilada que tiene un perfil farmacéutico más prolongado comparado con el perfil de la formulación análoga con un contenido de albúmina relativamente mayor.

45 Otro aspecto de esta invención se refiere al suministro de una formulación que facilita la regulación del grado de prolongación.

Otro aspecto de esta invención se refiere al suministro de una formulación en la cual el grado de prolongación puede estar regulado más convenientemente que en una formulación correspondiente que no contiene albúmina.

50 Otro aspecto de esta invención se refiere al suministro de una formulación de insulina para la cual es más fácil que para las preparaciones de insulina conocidas prever el grado de prolongación.

Otro aspecto de esta invención se refiere al suministro de una formulación acilada de insulina para la cual es más fácil prever el grado de prolongación que para las preparaciones de insulina conocidas.

#### 55 DEFINICIONES

Resumidamente, el término insulina acilada abarca insulina existente naturalmente y análogos de insulina en los cuales un resto que contiene un grupo acilo se ha unido al grupo amino en un residuo lisina. Usualmente, tales grupos acilo se originan a partir de ácidos grasos, tanto mono- como diácidos, que contienen al menos 16 átomos de carbono y, preferiblemente, que contienen no más de 38 átomos de carbono, más preferiblemente no más de 24 átomos de carbono, más preferiblemente no más de 22 átomos de carbono, más preferiblemente no más de 20 átomos de carbono. Dicho resto que contiene un grupo acilo puede contener también otros grupos tales como un resto alquilen-glicol. Preferiblemente, la insulina y/o análogo de la misma existente naturalmente que está acilado contiene solamente un residuo lisina simple. Un residuo lisina de este tipo puede estar unido, por ejemplo, al aminoácido A21, en cuyo caso el residuo lisina se encuentra en la posición A22. Muchas insulinas aciladas han sido

descritas en la última década y las insulinas aisladas son una clase de insulinas que son conocidas por el operario experto en la técnica. Una fórmula general del resto acilo conectado a la insulina o análogo de la misma es:  $-X-CO-(CH_2)_n-R$ , en donde n es un número entero comprendido en el intervalo de 14 a 24, R es etilo o carboxi,  $-(CH_2)_n-R$  es una cadena lineal, y X es un enlace o un enlazador. En una realización, el término "insulina acilada" abarca las insulinas aciladas descritas en WO 2009/022005 y WO 2009/022013, que se incorporan ambas por referencia. En este caso, las insulinas aciladas están, por ejemplo, abarcadas por la reivindicación 1 en cada una de estas publicaciones. La reivindicación 1 en WO 2009/022005 reza como sigue: "Un análogo de insulina acilada en el cual el análogo de insulina comprende un residuo lisina conectado en posición C-terminal al residuo de aminoácido A21 o un residuo peptídico de hasta 4 residuos de aminoácido que comprenden un residuo lisina, residuo peptídico que está conectado en posición C-terminal al residuo de aminoácido A21, caracterizado por que un resto acilo que comprende un resto alquilenglicol está unido al residuo lisina en la posición A22 o unido a un residuo lisina presente en el residuo peptídico que está unido al extremo C-terminal del residuo de aminoácido A21 y en el cual existe solamente una lisina (K, Lys) en el análogo de insulina". Una explicación más detallada de dichas insulinas aciladas puede encontrarse en las dos últimas solicitudes PCT mencionadas que se incorporan por referencia. En una realización, el término "insulina acilada" abarca las insulinas aciladas descritas en WO 2007/096431, por ejemplo en la reivindicación 1 en combinación con la reivindicación 3. Por tanto, en este caso, el término "insulina acilada" abarca un derivado de insulina que comprende una insulina parental y un sustituyente, en el cual el sustituyente está unido a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo Lys presente en la cadena A de la insulina parental en la posición A8, A8, A9, A10, A12, A14, A15, A17, A18, A21, A22, A23 o A24 o a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo Lys en la cadena B de la insulina parental en la posición B1, B2, B3, B4, B20, B21 o B22, en donde el sustituyente comprende un grupo acilo que tiene de 6 a 40 átomos de carbono, y, preferiblemente, el sustituyente tiene la fórmula general  $CH_3-(CH_2)_n-CO-$ , donde n es un número entero comprendido en el intervalo de 4 a 38, y en donde el término "insulina parental" es un análogo de insulina que contiene solamente un residuo Lys en la cadena A y/o la cadena B. Una explicación más detallada de dichas insulinas aciladas puede encontrarse en las últimas solicitudes PCT mencionadas que se incorporan por referencia. En otra realización, el término "insulina acilada" cubre las insulinas aciladas descritas en EP 1.991.576 B1, especialmente en la reivindicación 1 de dicho documento y una explicación más detallada de dichas insulinas aciladas puede encontrarse en la última patente EP mencionada que se incorpora por referencia.

En esta memoria, el término "análogos de insulinas existentes naturalmente" y "análogo de insulina" abarca insulina humana en la cual uno o más residuos de aminoácido de la insulina se han sustituido por otros residuos de aminoácido y/o en la cual se han delecionado uno o más residuos de aminoácido de la insulina y/o en la cual uno o más residuos de aminoácido se han añadido y/o insertado en la insulina. Los aminoácidos a los que se refiere esta invención son, preferiblemente, aminoácidos que pueden estar codificados por un triplete ("codón") de nucleótidos, véase ingeniería genética. En este caso, los aminoácidos son, dados por sus códigos comunes de tres letras, preferiblemente: Gly, Pro, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Gln, Asn, Glu, Asp, Ser y Thr. En una realización, un análogo de insulina comprende menos de 8 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones (con inclusión de inserciones) y cualquier combinación de las mismas) con relación a la insulina parental, alternativamente menos de 7 modificaciones con relación a la insulina parental, alternativamente menos de 6 modificaciones con relación a la insulina parental, alternativamente menos de 5 modificaciones con relación a la insulina parental, alternativamente menos de 4 modificaciones con relación a la insulina parental, alternativamente menos de 3 modificaciones con relación a la insulina parental, alternativamente menos de 2 modificaciones con relación a la insulina parental.

En este caso, se utilizan las abreviaturas siguientes: "OEG" para ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico; "gGlu" (o "yGlu" o "y-Glu") para ácido gamma-glutámico y "HSA" para seroalbúmina humana. "Milli-Q" se refiere a agua que ha sido purificada y desionizada en alto grado por un sistema de purificación de agua fabricado por Millipore Corporation. El sistema monitoriza la concentración iónica por medida de la resistencia eléctrica del agua. La mayoría de los sistemas Milli-Q dispensan el agua a través de un filtro de membrana de 0,22  $\mu$ m.

En este caso, el término constante dímera de insulina se utiliza para la concentración de insulina en la que más de 90% de la insulina se encuentra en la forma dímera. Por debajo de esta concentración, una cantidad creciente de insulina se encuentra en la forma monómera.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

Se ha encontrado que ciertas insulinas aciladas que se describen en la presente invención precipitan en el tejido subcutáneo después de la inyección subcutánea de una formulación soluble con baja concentración iónica, por ejemplo, inferior a NaCl 50 mM. Probablemente, la precipitación está causada por el aumento de concentración iónica hasta NaCl 150 mM en el subcutis y está asociada con biodisponibilidad baja.

Sorprendentemente, se ha encontrado que la adición de albúmina, por ejemplo, seroalbúmina, a la formulación de insulina (antes de administrar la misma) puede evitar la precipitación de las formulaciones de insulina acilada de la invención después de la inyección subcutánea. Probablemente, la razón para el sorprendente efecto obtenido por la presente invención es que la interacción entre albúmina y la cadena acilo de la insulina acilada en la solución propuesta para inyección a un paciente impide la precipitación de la insulina acilada y restablece la biodisponibilidad

de la insulina acilada después que ha tenido lugar la inyección (aunque esta invención no se limita a que esta sea la razón para el efecto de inventiva observado).

5 Adicionalmente, se ha encontrado que la estequiometría de albúmina frente a insulina acilada en la formulación puede utilizarse para controlar el estado de agregación del complejo insulina-albúmina en la formulación, y por tanto, el grado de prolongación después de la inyección subcutánea.

10 En una realización, esta invención aborda insulinas aciladas que interactúan con albúmina con una constante de fijación de al menos 1 mM y, más tarde, precipitan o se agregan después de la inyección subcutánea. Insulinas aciladas incluyen, por ejemplo, las insulinas aciladas en el aminoácido A22K (insulinas aciladas A22K), como se describe en esta memoria.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE ESTA INVENCION

15 Se hace resaltar que la materia objeto que no está abarcada por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención aquí reivindicada.

20 Resumidamente, esta invención se refiere a formulaciones que contienen albúmina y una insulina acilada por salificación en la que la albúmina no está unida covalentemente a la insulina acilada por salificación. Las insulinas aciladas por salificación se pueden dividir en 3 subgrupos de insulinas aciladas. Las insulinas aciladas que tienen una solubilidad baja en una solución de NaCl 150 mM que contiene 3 iones cinc por 6 moléculas de insulina, es decir una solubilidad inferior a 30%, como se define específicamente en el test A más adelante, son insulinas aciladas por salificación. Adicionalmente, también las insulinas aciladas que forman un oligómero insulina-albúmina con un peso molecular superior a 440.000, como se define específicamente en el Test B más adelante, son insulinas aciladas por salificación. Adicionalmente, también las insulinas aciladas que tienen una solubilidad baja en una solución de NaCl 25 150 mM que no contienen cinc, es decir, una solubilidad inferior a 50%, como se define específicamente en el test C más adelante, son insulinas aciladas por salificación.

30 Se ha descubierto que, para ciertas insulinas aciladas, *inter alia*, insulinas aciladas que tienen una solubilidad baja en una solución de NaCl 150 mM con o sin iones cinc como se define en esta memoria, es difícil dar una predicción satisfactoria del perfil de glucosa en sangre en un paciente después de administración subcutánea de las mismas. Es sabido que es muy importante el hecho de que el perfil de glucosa en sangre no varíe mucho durante el día y la noche dado que, en caso contrario, esto pueda dar lugar a complicaciones diabéticas tardías tales como ceguera, amputación de piernas y otras enfermedades graves. Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que si una 35 formulación de insulina acilada de este tipo contiene albúmina, es mucho más fácil predecir el perfil de glucosa en la sangre del paciente.

40 Análogamente, se ha descubierto que para ciertas otras insulinas aciladas, *inter alia*, insulinas aciladas que forman con albúmina un oligómero que tiene un peso molecular superior a 440.000 como se define en esta memoria, es difícil también hacer una predicción satisfactoria del perfil de glucosa en sangre en un paciente después de administración subcutánea de las mismas. Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que si una formulación de insulina acilada de este tipo contiene albúmina, es mucho más fácil predecir el perfil de glucosa en sangre.

45 La nueva formulación de esta invención es una solución farmacéutica acuosa que contiene albúmina y una insulina acilada por salificación en la que la albúmina no está unida covalentemente a la insulina acilada por salificación, formulación que debe administrarse al paciente por inyección.

50 Si una formulación de una insulina acilada como se define en esta memoria que no contiene albúmina se inyecta a un paciente, puede ocurrir precipitación de la insulina acilada, y esta precipitación puede ser debida a la concentración iónica del fluido intersticial combinada con la presencia de la cadena acilo en la superficie de la insulina, por ejemplo el hexámero de insulina. Sorprendentemente, esta reacción puede evitarse cuando se inyecta a un paciente una formulación de una insulina acilada que contiene albúmina.

55 A continuación se da una explicación de las interacciones tal como se supone que tienen lugar. Sin embargo, esta invención no está limitada a las interacciones que tengan lugar exactamente como se expone a continuación.

60 La formulación farmacéutica de esta invención contiene insulina acilada y albúmina. Adicionalmente, la formulación de esta invención puede contener los componentes siguientes: un tampón, un conservante, un agente isotónico, acetato de cinc y/o un estabilizador físico y/o químico. La albúmina tiene hasta 7 sitios de fijación de lípido diferentes, dependiendo del tamaño y la estructura del lípido. La insulina acilada puede unirse a albúmina por la vía de la cadena acilo en uno o más de los sitios de fijación de lípido de la albúmina. La invención es el descubrimiento sorprendente de que la co-formulación con albúmina puede dar como resultado estabilización de la cadena acilo de la insulina acilada, evitando o reduciendo con ello las reacciones indeseables tales como precipitación y agregación de la insulina acilada.

65

Después la inyección a un paciente de una formulación de insulina acilada que no contiene cantidad alguna de albúmina, las insulinas aciladas pueden precipitar y/o agregarse como resultado de la concentración iónica en la formulación o en el subcutis. La concentración iónica en el subcutis es aproximadamente cloruro de sodio 150 mM que define la concentración en una solución isotónica. La precipitación de insulina acilada en el subcutis puede dar como resultado una predictibilidad disminuida del tiempo de acción de la insulina acilada y una disminución de la biodisponibilidad de la insulina acilada. Un problema técnico y trabajo farmacéutico consiste en producir una formulación farmacéutica de una insulina acilada con biodisponibilidad y tiempo de acción predecibles, que dan como resultado un perfil decreciente de glucosa en sangre reproducible para el paciente diabético. Adicionalmente, una formulación farmacéutica que está diseñada para contener insulina acilada soluble en concentración iónica alta puede tener una vida útil limitada, debido a la precipitación física de la insulina acilada en la formulación. Un segundo problema técnico consiste en producir una formulación farmacéutica físicamente estable que contiene insulina acilada en alta concentración iónica.

La solución técnica a los dos problemas es que la presencia de albúmina en las formulaciones evita que la insulina acilada precipite después de la inyección, probablemente como resultado de aumento en la concentración iónica, v.g., por inyección en el subcutis.

La precipitación de insulina acilada en cloruro de sodio 150 mM se evita por adición de albúmina a la formulación en una cantidad estequiométrica comprendida en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moles de insulinas aciladas por mol de albúmina, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 moles de insulinas aciladas por mol de albúmina.

La constante de formación del dímero de insulina está comprendida en el intervalo micromolar de insulina humana. Insulinas aciladas con constantes de formación de dímero en el mismo intervalo que para la insulina humana forman dímeros y las cadenas acilo de las insulinas aciladas interaccionan con moléculas de albúmina diferentes en la ratio de 2 moles de insulina acilada para 2 moles de complejos de albúmina. Cuando están presentes en la formulación átomos de cinc, pueden formarse hexámeros de cinc con insulina acilada y las cadenas acilo de estos hexámeros pueden interaccionar con diferentes moléculas de albúmina con formación de complejos hexámero de insulina-albúmina. El perfil farmacéutico de una formulación con albúmina y un hexámero de insulina de cinc acilada dependerá por tanto de la ratio estequiométrica entre albúmina e insulina acilada, y la existencia resultante de oligómeros de hexámeros de insulina acilada con moléculas de albúmina.

La estabilidad química y física de la insulina acilada en la formulación puede depender, en alto grado, de la formación del hexámero R6. Por tanto, es deseable la presencia de al menos 2 iones cinc, al menos 2 iones cloruro, y al menos 6 moléculas de fenol o cresol por mol de insulina acilada. Una formulación de este tipo contendrá, por tanto, cantidades en exceso de acetato de cinc, cloruro de sodio, fenol y cresol. Dado que la albúmina puede fijar el cinc, la formulación químicamente estable con albúmina contendrá con preferencia desde aproximadamente 3 a aproximadamente 7 iones cinc por 6 moléculas de insulina acilada, lo que puede asegurar la formación del hexámero R6 de insulina acilada y la interacción cinc-albúmina. La estabilidad química de la albúmina está limitada por la formación de dímeros covalentes de albúmina. Por ejemplo, la adición de estabilizadores como caprato de sodio y/o detergentes como polisorbato 20 y polisorbato 80 reducen la formación de dímeros de albúmina. La formulación combinada de insulina acilada/albúmina puede contener, por tanto, caprato de sodio y polisorbato además de cinc, fenol, cresol y cloruro de sodio.

Además, se ha encontrado sorprendentemente que las propiedades de las formulaciones de esta invención pueden mejorarse si se añade nicotinamida a las formulaciones. En una realización, las formulaciones de esta invención contienen desde aproximadamente nicotinamida 20 mM a aproximadamente 200 mM, combinada con carácter opcional con arginina aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, y con preferencia desde nicotinamida aproximadamente 40 mM a aproximadamente 150 mM, combinada opcionalmente con arginina desde aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM.

Aunque esta invención se refiere a una formulación que contiene albúmina y una insulina acilada como se define en esta memoria en la que no existe unión covalente alguna entre la albúmina y dicha insulina acilada, dicha formulación puede contener en una realización específica una insulina acilada a la que está unida albúmina covalentemente. En una realización de este tipo, la secuencia de aminoácidos de la insulina acilada puede ser la misma o diferente de la secuencia de aminoácidos de la insulina a la que la albúmina está unida covalentemente.

En una realización preferida de esta invención, no existe material precipitado alguno en la formulación de esta invención. No obstante, formulaciones de insulina que contienen a la vez insulina en forma disuelta e insulina en forma no disuelta (precipitada) han estado en el mercado durante décadas y son conocidas por el operario experto en la técnica. En este caso, en una realización de esta invención, la formulación contiene a la vez insulina disuelta e insulina no disuelta.

La formulación puede realizarse como sigue: se disuelve polvo de insulina acilada en agua Milli-Q a pH 7,4. Pueden añadirse tampón de fosfato, acetato de cinc, cloruro de sodio, fenol, cresol, glicerol y albúmina en el orden indicado

o en cualquier otro orden deseado o conveniente para producir las concentraciones finales diseñadas para la formulación.

5 El grado de prolongación es, hasta cierto punto, dependiente de la ratio molar entre la insulina acilada y la albúmina. Generalmente, una cantidad relativamente mayor de insulina dará como resultado una tasa de absorción más prolongada, es decir, una mayor duración de acción, debido probablemente al mayor tamaño del agregado insulina-albúmina.

10 En una realización de esta invención, la misma se refiere a una formulación farmacéutica que contiene un análogo de insulina acilada y albúmina en cantidades definidas por la solubilidad de la insulina, lo que significa que no da como resultado precipitación o precipita sólo en un grado inferior o poco importante y en el cual la insulina no está unido covalentemente a albúmina.

15 En otra realización de esta invención, la misma se refiere a una formulación farmacéutica que contiene un análogo de insulina acilada y albúmina en cantidades estequiometrias definidas por el perfil farmacéutico de prolongación, lo que significa que depende del perfil farmacéutico de prolongación deseado y en la cual la insulina no está unida covalentemente a la albúmina o está unida sólo en un grado poco importante.

20 Como se ha mencionado anteriormente, la nueva formulación de esta invención contiene también albúmina. La albúmina puede ser albúmina de cualquier especie, por ejemplo, albúmina humana o albúmina humana des1(Asp), v.g. Albagén. Preferiblemente, la albúmina es de origen recombinante.

25 En la formulación de esta invención, la albúmina no está unida covalentemente a otras moléculas químicas, o la albúmina está unida sólo en una cantidad de aproximadamente 5% (peso/peso) o menos a dichas otras moléculas, preferiblemente menos de 2%, más preferiblemente menos de 1%. En una realización, la albúmina no está unida covalentemente a la insulina acilada o está unida sólo en una cantidad de aproximadamente 5% (peso/peso) o menos a la insulina acilada, preferiblemente menos de 2%, y más preferiblemente menos de 1%.

30 En una realización, la insulina acilada es una insulina acilada en el grupo ε-amino en la cadena lateral lisina presente en una extensión del aminoácido del extremo terminal C de la cadena A de insulina y análogos de la misma como se describe en WO 2009/022005 o WO 2009/022013.

En otra realización, la insulina acilada se selecciona de las siguientes:

Nombre	Nombre alternativo
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -hexadecanodioil-(3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]etoxi}etoxi)propionil-γGlu), B29R, desB30	
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -hexadecanodioil-(2-aminoetil-PEG2000-il-acetil)), B29R desB30	
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -3-(3-{4-[3-(5-carboxipentanoilamino)-propoxi]-butoxi}propilcarbamoil)propionil-γGlu), B29R, desB30	
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -[2-(2-[2-(2-[2-(octadecanodioil-γGlu)amino]-etoxi)-etoxi]acetilamino)etoxi]-etoxi]acetil)), B29R, desB30	Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> (octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -3-(3-{4-[3-(13-carboxitridecanoil-amino)-propoxi]-butoxi}propilcarbamoil)-propionil-γGlu), B29R, desB30	
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -[2-(2-[2-(2-[2-(eicosanodioil-γGlu)amino]etoxi)-etoxi]acetilamino)etoxi]-etoxi]acetil)), B29R, desB30	Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> (eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A14E, A22K(N <sup>ε</sup> -[2-(2-[2-(2-[2-(octadecanodioil-γGlu)-amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]-etoxi]acetil)), B25H, B29R, desB30	Insulina humana A14E, A22K(N <sup>ε</sup> (octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B25H, B29R, desB30
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)-etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]-acetil), desB29, desB30	Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> (octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), desB29, desB30
Insulina humana A14E, A22K(N <sup>ε</sup> -eicosanodioil-γGlu-(3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)etoxi]etoxi}etoxi)propionil)), B25H, B29R, desB30	
Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-amino-etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)-etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> (octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30

ES 2 552 401 T3

Nombre	Nombre alternativo
Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> (octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]-acetil-γGlu), B29R, desB30	Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> (octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG-γGlu)), B29R, desB30
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -eicosanodioil-γGlu-(3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi}etoxi)etoxi]-etoxi]propionil}), B29R, desB30	
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi}etoxi)propionil)), B29R, desB30	
Insulina humana A14E, A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-(3-{2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]etoxi}etoxi)etoxi]propionil)), B25H, B29R, desB30	
Insulina humana A14E, A22K(N <sup>ε</sup> -eicosanodioil-γGlu-γGlu-(3-{2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]etoxi}etoxi)etoxi]propionil)), B25H, B29R, desB30	
Insulina humana A14E, A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi}etoxi)propionil)-γGlu), B25H, B29R, desB30	
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetil), B28E, B29R, desB30	Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> (octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B28E, B29R, desB30
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -octadecano-dioil-γGlu-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A14E, A22K(N <sup>ε</sup> -[2-(2-[2-(2-[2-(eicosanodioil-γGlu)amino]-etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetil]), B25H, B29R, desB30	Insulina humana A14E, A22K(N <sup>ε</sup> (eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B25H, B29R, desB30
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]etoxi}propionil-γGlu), B29R, desB30	
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -eicosanodioil-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]etoxi}etoxi)propionil-γGlu), B29R, desB30	
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-(2-aminoetil-PEG2000-ilacetil)), B29R desB30	
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -eicosanodioil-(2-aminoetil-PEG2000-ilacetil)), B29R desB30	
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -3-(3-{4-[3-(15-carboxipentadecanoil-amino)-propoxi]butoxi}propilcarbamoil)-propionil-γGlu), B29R desB30	
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -3-(3-{4-[3-(17-carboxiheptadecanoil-amino)-propoxi]butoxi}propilcarbamoil)-propionil-γGlu), B29R desB30	
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -Tetradecanodioil-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]etoxi}etoxi)propionil-γGlu), B29R, desB30	
Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}-etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> (octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}-etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> (octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}-etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]-acetil-aminoetoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30	
Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]-	Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> (octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG)),

Nombre	Nombre alternativo
acetilamino}etoxi]etoxi]acetil), B29R, desB30	B29R, desB30
Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> -octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> (octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> -eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> (eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> -eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30	
Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> -eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> (eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil-amino}etoxi)etoxi]acetil-amino}etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> (eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> -eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)-etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> (eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> -eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> (eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> -hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> (hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> -hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> (hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> -hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]-acetil), B29R, desB30	Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> (hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> (hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> -hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}ethoxy]etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> (hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> -hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetilamino}etoxi]-etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> (hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> -hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]-acetil), B29R, desB30	Insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> (hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> -hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A8H, A22K(N <sup>ε</sup> (hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30
Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> -hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30	Insulina humana A18L, A22K(N <sup>ε</sup> (hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30

La albúmina puede unirse covalentemente a una insulina acilada. Sin embargo, es importante que, en las formulaciones de esta invención, nada o menos de 5% de albúmina está unida covalentemente a la insulina acilada. El operario experto en la técnica conoce el modo de unir albúmina covalentemente a insulina. Por ejemplo, la albúmina puede unirse covalentemente a la insulina por el uso de reactivos de reticulación, v.g. aldehídos y ésteres

de N-hidroxisuccinimida. El operario experto en la técnica conoce también el modo de evitar que la albúmina se una covalentemente por completo a la insulina. Si, por ejemplo, se mezclan a la temperatura ambiente insulina acilada que carece de grupos reactivos y albúmina y a valores de pH neutro, v.g. aproximadamente 7, no es de esperar que tenga lugar unión covalente alguna entre la insulina acilada y la albúmina.

5 Adicionalmente, la formulación de esta invención puede contener otros ingredientes utilizados comúnmente en formulaciones de insulina. Ejemplos de tales ingredientes son tampones, por ejemplo, acetato, citrato, fosfatos, ácido malónico, arginina o Tris, conservantes, por ejemplo, fenol, m-cresol o 4-hidroxi-benzoato de metilo, iones cinc y un ácido o una base utilizados para regular el valor del pH, por ejemplo ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, agentes isotónicos, por ejemplo, glicerol, manitol o propilenglicol, estabilizadores, por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80 o caprato de sodio.

10 Los dispositivos de inyección son jeringuillas que cada vez más frecuentemente son dispositivos de tipo pluma. Otra clase de dispositivos de inyección son los dispositivos de bomba que se colocan en el cuerpo y que permanecen estacionarios durante días o semanas.

15 La formulación de esta invención se utiliza análogamente al uso de las formulaciones de insulina conocidas. El médico está familiarizado por el tratamiento de pacientes con diabetes, y el médico conocerá el modo de utilizar la formulación de esta invención, es decir, análogamente a la administración de otras formulaciones de insulina. Asimismo, el médico y muchos pacientes diabéticos conocerán el modo de inyectar las nuevas formulaciones.

#### CARACTERÍSTICAS PREFERIDAS DE ESTA INVENCION

25 Para resumir y complementar las exposiciones anteriores, las características de esta invención son como sigue:

1. Una formulación farmacéutica inyectable que contiene una insulina acilada y albúmina caracterizada por que al menos 80% (peso/peso) de la insulina acilada está disuelto y en la cual no más de 5% (peso/peso) de la insulina está unido covalentemente a albúmina.
- 30 2. Una formulación farmacéutica que contiene una insulina acilada y albúmina en la cual al menos 80% (peso/peso) de la insulina acilada está disuelto y en la cual no más de 5% (peso/peso) de la insulina está unido covalentemente a albúmina para uso por inyección.
- 35 3. Una formulación farmacéutica, opcionalmente inyectable, conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la cual la insulina acilada es una insulina acilada por salificación.
- 40 4. Una formulación farmacéutica, opcionalmente inyectable, conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la cual la insulina acilada por salificación es una insulina acilada que tiene una solubilidad en una solución de NaCl 150 mM que contiene 3 iones cinc por 6 moléculas de insulina inferior a 30%, como se define específicamente en el test A de esta memoria, preferiblemente superior a 50% en una solución cloruro de sodio 150 mM que contiene 3 iones cinc por 6 moléculas de insulina y muy preferiblemente superior a 60% en una solución de cloruro de sodio 150 mM que contiene 3 iones cinc por 6 moléculas de insulina.
- 45 5. Una formulación farmacéutica, opcionalmente inyectable, conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, en la cual la insulina acilada por salificación es una insulina acilada que forma un oligómero insulina-albúmina con un peso molecular superior a 440.000, como se define específicamente en el test B de esta memoria.
- 50 6. Una formulación farmacéutica, opcionalmente inyectable, conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, en la cual la insulina acilada por salificación es una insulina acilada que tiene una solubilidad en una solución de NaCl 150 mM que no contiene cinc o contiene menos de 30%, como se define específicamente en el test C en esta memoria.
- 55 7. Una formulación farmacéutica, opcionalmente inyectable, conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, en la cual la insulina acilada por salificación es una insulina acilada mencionada específicamente en WO 07/096431, es decir, los compuestos mencionados en dicho documento con los nombres insulina humana N<sup>εA8</sup>-miristil LysA8 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA9</sup>-miristil LysA9 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA10</sup>-miristil LysA10 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA12</sup>-miristil LysA12 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA14</sup>-miristil LysA14 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA15</sup>-miristil LysA15 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA17</sup>-miristil LysA17 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA18</sup>-miristil LysA18 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA21</sup>-miristil LysA21 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA22</sup>-miristil LysA22 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB1</sup>-miristil LysB1 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB2</sup>-miristil LysB2 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB3</sup>-miristil LysB3 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB4</sup>-miristil LysB4 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB20</sup>-miristil LysB20 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB21</sup>-miristil LysB21 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB22</sup>-miristil LysB22 ArgB29 desB30,
- 65

5 insulina humana N<sup>εA8</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA8 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA9</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA9 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA10</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA10 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA12</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA12 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA14</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA14 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA15</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA15 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA17</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA17 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA18</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA18 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA21</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA21 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA22</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA22 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB1</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysB1 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB2</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysB2 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB3</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysB3 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB4</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysB4 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB20</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysB20 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB21</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysB21 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εB22</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysB22 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA22</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA22 GlyA21 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA22</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA22 AlaA21 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA22</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA22 GlnA21 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA23</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA23 GlyA21 GlyA22 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA23</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA23 AlaA21 GlyA22 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA23</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA23 GlnA21 GlyA22 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA24</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA24 GlyA21 GlyA22 GlyA23 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA24</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA24 AlaA21 GlyA22 GlyA23 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA24</sup>-ω-carboxipentadecanoil-γ-Glu LysA24 GlnA21 GlyA22 GlyA23 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA22</sup>-ω-carboxiheptadecanoil-γ-Glu LysA22 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA23</sup>-ω-carboxiheptadecanoil-γ-Glu LysA23 GlyA21 GlyA22 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA23</sup>-ω-carboxiheptadecanoil-γ-Glu LysA23 AlaA21 GlyA22 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA23</sup>-ω-carboxiheptadecanoil-γ-Glu LysA23 GlnA21 GlyA22 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA24</sup>-ω-carboxiheptadecanoil-γ-Glu LysA24 GlyA21 GlyA22 GlyA23 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA24</sup>-ω-carboxiheptadecanoil-γ-Glu LysA24 AlaA21 GlyA22 GlyA23 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA24</sup>-ω-carboxiheptadecanoil-γ-Glu LysA24 GlnA21 GlyA22 GlyA23 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA24</sup>-ω-carboxiheptadecanoil-γ-Glu LysA24 AlaA21 GlyA22 GlyA23 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA24</sup>-ω-carboxiheptadecanoil-γ-Glu LysA24 GlnA21 GlyA22 GlyA23 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA22</sup>-3-carboxi-5-hexadecanodioilaminobenzoil LysA22 ArgB29 desB30, insulina humana N<sup>εA22</sup>-10-(3,5-di-carboxifenoxi)decanoil-γ-Glu LysA22 ArgB29 desB30 e insulina humana N<sup>εA22</sup>-4-[10-(3,5-di-carboxifenoxi)decanoilamino]butiril LysA22 ArgB29 desB30.

35 8. Una formulación farmacéutica, opcionalmente inyectable, conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, en la cual la insulina acilada por salificación es cualquiera de las insulinas aciladas mencionadas en la tabla anterior.

40 9. Una formulación farmacéutica, conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible en la cual al menos 85% (peso/peso) de la insulina acilada está disuelto.

45 10. Una formulación, conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, en la cual al menos 90% (peso/peso) de la insulina acilada está disuelto.

11. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, en la cual al menos 95% (peso/peso) de la insulina acilada está disuelto.

50 12. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, en la cual al menos 99% (peso/peso) de la insulina acilada está disuelto.

13. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, en la cual al menos 99,9% (peso/peso) de la insulina acilada está disuelto.

55 14. Una formulación conforme a la cláusula anterior en la cual toda la insulina acilada está disuelta.

15. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en extensión posible, en la cual no más de 1% (peso/peso) de la insulina acilada está unido covalentemente a albúmina.

60 16. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, en la que no más de 0,1% (peso/peso) de la insulina acilada está unida covalentemente a albúmina.

65 17. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, en la que ninguna cantidad de insulina está unida covalentemente a albúmina.

18. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, en la cual la ratio molar entre albúmina e insulina acilada está comprendida en el intervalo que va desde aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:10, con preferencia desde aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:7.
- 5 19. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores que es inyectable.
20. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores que es isotónica.
- 10 21. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas de utilización anteriores en la extensión posible, caracterizado por que la insulina acilada es insulina humana A22K(N<sup>e</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30.
- 15 22. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, caracterizada por que la albúmina es seroalbúmina humana o Albagén.
23. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible, caracterizada por que la albúmina es seroalbúmina humana.
- 20 24. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible que contiene cloruro de sodio, preferiblemente en una cantidad comprendida en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 mM, con preferencia desde aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mM.
- 25 25. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible que contiene glicerol, en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 mM, con preferencia desde aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mM, y de modo aún más preferible aproximadamente 174 mM.
- 30 26. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible que contiene iones cinc, preferiblemente en una cantidad comprendida en el intervalo de aproximadamente 2 átomos de cinc por 6 moléculas de insulina acilada a aproximadamente 10 átomos de cinc por 6 moléculas de insulina acilada, con preferencia desde aproximadamente 3 átomos de cinc por 6 moléculas de insulina acilada a aproximadamente 6 átomos de cinc por 6 moléculas de insulina acilada.
- 35 27. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible que contiene fenol, con preferencia en una cantidad comprendida en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 mM, con más preferencia desde aproximadamente 8 a aproximadamente 30 mM, y con preferencia desde aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mM.
- 40 28. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible que contiene m-cresol, con preferencia en una cantidad comprendida en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mM, con más preferencia desde aproximadamente 8 a aproximadamente 30 mM, y con más preferencia desde aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mM.
- 45 29. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible que contiene caprato de sodio, con preferencia en una cantidad comprendida en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 mM, con más preferencia desde aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mM.
- 50 30. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible que contiene polisorbato 20, preferiblemente en una cantidad comprendida en el intervalo que va desde aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,1%, con preferencia desde aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,05%.
- 55 31. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible que contiene polisorbato 80, preferiblemente en una cantidad comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,1%, con preferencia desde aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,05%.
- 60 32. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible que contiene nicotinamida, preferiblemente en una cantidad comprendida en el intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM y aún más preferiblemente en el intervalo que va desde aproximadamente 40 mM a aproximadamente 150 mM.
- 65 33. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores en la extensión posible que contiene arginina, preferiblemente en una cantidad comprendida en el intervalo de aproximadamente 5 mM a

aproximadamente 50 mM, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM.

34. Una formulación como se describe en una cualquiera de los ejemplos específicos anteriores.

35. Una formulación conforme a una cualquiera de las cláusulas anteriores para administración subcutánea.

36. El uso de albúmina para evitar la precipitación o evitar la precipitación en una cantidad inferior o poco importante en una formulación farmacéutica acuosa de una insulina acilada después de la inyección subcutánea, caracterizado por que se añade albúmina a dicha solución acuosa de una insulina acilada antes que la solución se inyecte subcutáneamente.

37. El uso conforme a la cláusula que antecede, caracterizado por que dicha solución es isotónica.

38. El uso conforme a una cualquiera de las cláusulas de uso precedentes, caracterizado por que dicha solución es isotónica.

39. El uso conforme a una cualquiera de las cláusulas de uso anteriores en la extensión posible, caracterizado por que la insulina acilada es insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eps)-eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, o desB30.

40. El uso de una insulina acilada y albúmina para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la diabetes por inyección, caracterizado por que la solución a inyectar contiene una insulina acilada y albúmina conforme a cualquiera de las cláusulas precedentes.

### Ejemplo 1

Se administraron a cerdos cantidades iguales de Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30, por administración subcutánea. La concentración de insulina en la sangre se midió después de la inyección y el resultado se muestra en las Figuras 1 y 2. El gráfico en Fig. 1 muestra la concentración de insulina medida desde el tiempo 0 a los 1500 minutos después de la inyección, y el gráfico en Fig. 2 muestra la concentración de insulina medida a los primeros 100 minutos después de la inyección. En las figuras, se utilizan las abreviaturas siguientes: "ins" es insulina, "PK" es farmacocinético, y "SEM" es el valor medio del error estándar. Se investigaron las formulaciones siguientes:

1a): 300 μM de Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30, fosfato 7 mM, P37,4, seroalbúmina de cerdo 300 μM, NaCl 150 mM, 0 Zn/hexámero de insulina (designada "Formulación con Albúmina" en Figs. 1 y 2). 1b): Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 600 μM, fosfato 7 mM, pH 7,4, glicerol 174 mM, fenol 30 mM, 3 Zn/hexámero de insulina (designada "Formulación con 3 Zn/6 ins" en Figs. 1 y 2). 1c): Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 600 mM, fosfato 7 mM, pH 7,4, 174 mM glicerol, 0 Zn/6 moléculas de insulina (designado "Formulación With 0 Zn/6ins" en Figs. 1 y 2). 1d): 600 mM A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, Insulina humanadesB30, fosfato 7 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 0 Zn/6 moléculas de insulina (designada "Formulación con NaCl 150 mM" en Figs. 1 y 2). Las conclusiones de la investigación anterior son como sigue:

La insulina acilada en suspensión con cloruro de sodio isotónico da como resultado la concentración mínima de insulina en la sangre de las 4 formulaciones.

La insulina acilada soluble con y sin cinc en la formulación, da como resultado concentraciones de insulina comparables en la sangre.

La insulina acilada soluble co-formulada con albúmina de cerdo y cloruro de sodio isotónico, da como resultado la concentración máxima de insulina en la sangre, es decir, más de dos veces mayor que las otras tres formulaciones. Se ve que la co-formulación con albúmina aumenta la biodisponibilidad de insulina acilada e impide la aplicación de la insulina acilada en cloruro de sodio isotónico.

### Ejemplo 2

Una solución de 45 μL de insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 660 mM, (abreviada como A22K(N(eps)eicosanodioilo) en la Tabla 1) en formulación conforme a la Tabla 1 se mezcló con 5 μL de solución de cloruro de sodio en concentración conforme a la Tabla 1. 48 horas después, se mezclaron las dos soluciones, y se determinó la cantidad de insulina acilada precipitada después de filtración. La determinación de la concentración se llevó a cabo por medida de HPLC de la insulina en solución. La cantidad en porcentaje de insulina acilada soluble en relación con la cantidad total de insulina acilada presente en la solución de test tiene que ser

ES 2 552 401 T3

superior a 30% para una concentración de cloruro de sodio de 150 mM, preferiblemente superior a 50% para cloruro de sodio 150 mM y muy preferiblemente superior a 60% para 160  $\mu$ M.

**Tabla 1**

5

Formulación: insulina 600 $\mu$ M, fosfato 7 mM pH 7,4, fenol 30 mM	concentración de NaCl , en mM	% de insulina en solución
Insulina humana, 3 Zn/ 6 insulina	0	100
	5	76
	10	92
	25	75
	50	75
	75	86
	100	98
	125	87
	150	84
	175	78
	200	84
A22K(N(eps)eicosanodioilo, 0 Zn/ 6 insulina	0	97
	5	82
	10	81
	25	75
	50	62
	75	44
	100	28
	125	20
	150	12
	175	0
	200	0
A22K(N(eps)eicosanodioilo, 3 Zn/ 6 insulina	0	71
	5	66
	10	70
	25	71
	50	74
	75	90
	100	50
	125	34
	150	23
	175	0
	200	0
A22K(N(eps)eicosanodioilo, 0 Zn/ 6 insulina, 600 $\mu$ M HSA	0	77
	5	75
	10	77
	25	65
	50	63
	75	70
	100	84

Formulación: insulina 600 µM, fosfato 7 mM pH 7,4, fenol 30 mM	concentración de NaCl , en mM	% de insulina en solución
	125	68
	150	100
	175	66
	200	77
A22K(N <sup>ε</sup> )eicosanodioilo 3 Zn/ 6 insulina, 600 µM HSA	0	95
	5	86
	10	71
	25	91
	50	Nd
	75	Nd
	100	Nd
	125	89
	150	91
	175	71
	200	80

La conclusión de la investigación anterior es como sigue:

- 5 La investigación de la solubilidad de insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 en cantidades crecientes de cloruro de sodio muestra que la presencia de albúmina previene la precipitación de insulina observada en caso contrario en cloruro de sodio 150 µM (isotonicidad). Una insulina no acilada como la Insulina humana no está precipitada en cloruro de sodio isotónico. Adicionalmente, la solubilidad de la Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 es mayor en presencia de cinc que en ausencia de cinc.
- 10

### Ejemplo 3

- 15 Una solución de 500 µl de insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 en la formulación conforme a la Tabla 2 se mezcló con solución de cloruro de sodio o glicerol en concentración conforme a la Tabla 2, obteniéndose una concentración final de insulina de 600 µM. Una vez que se mezclaron las dos soluciones, la solubilidad de la insulina acilada se juzgó a simple vista, por inspección visual, y determinación de la precipitación. La recuperación de la insulina y el tamaño de los complejos insulina-albúmina formados en las muestras se midieron por filtración en gel nativo (cromatografía de inclusión de tamaños, véase la descripción del método más adelante). Únicamente las muestras que contenían glicerol como agente isotónico se caracterizaron por filtración en gel nativo. La recuperación de la insulina acilada con y sin albúmina se midió como el área del pico cromatográfico con relación al área de las filas de dilución de estándares de albúmina.
- 20

- 25 Cromatografía de Exclusión de Tamaños (SEC), descripción del método: SEC por eluyente no disociante para medir multihexameros mayores que el dihexámero (> tamaño de albúmina). Superosa 6PC 3.2/30 (GE Life Sciences) 3,2 por 300 mm (V<sub>T</sub> = 2,4 mL) se eluyó con solución salina isotónica (NaCl 140 mM + Tris/HCl 10 mM + acida de sodio 0,01%, pH 7,7 a 23°C, correspondiente a 7,3 a 37°C) a 80 µL/min y 37°C. La detección UV se realizó a 276 nm, y el volumen de inyección de 20 µL (bucle de 22,7 µL) se utilizó como volumen de inyección estándar (0,9% de volumen total de columna). Se utilizó un tiempo de ejecución de 32 min seguido por un tiempo de equilibración de 48 min para eluir fenol + m-cresol (tiempo de ejecución total 80 min). Compárese la gráfica de 6 - 32 min. El tamaño de los complejos insulina-albúmina se estimó a partir de los tiempos de retención de los marcadores proteínicos: tiroglobulina, Mw 669 kDa, ferritina, Mw 440 kDa, seroalbúmina humana, Mw 60 kDa, ovoalbúmina 44 kDa, hexámero de insulina de cobalto, Mw 36 kDa, monómero de insulina, Mw 6 kDa.
- 30

35

Tabla 2

Formulación: insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> (eicosanodioil-gGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 600 μM, fosfato 7 mM pH 7,4, fenol 30 mM	Agente isotónico glicerol 174 mM o NaCl 150 mM	Precipitado de insulina	Filtración con gel SEC	Filtración con gel SEC. Tiempo de retención en min	Filtración con gel SEC. Estimación de Mw (kDa)
3 Zn/ 6 insulina	Glicerol	No	20%	Nd	Nd
	NaCl	Sí			
3 Zn/ 6 insulina, 200 μM HSA	Glicerol	No	100%	22,6	70
	NaCl	No			
3 Zn/ 6 insulina, 120 μM HSA	Glicerol	No	100%	19,7	440
	NaCl	No			
3 Zn/ 6 insulina, 80 μM HSA	Glicerol	No	100 %	17,6	669
	NaCl	No			
3 Zn/ 6 insulina, 60 μM HSA	Glicerol	No	100 %	17,6	669
	NaCl	yes			
3 Zn/ 6 insulina, 30 μM HSA	Glicerol	No	Nd	Nd	Nd
	NaCl	yes			
0 Zn/ 6 insulina	Glicerol	No	20 %	Nd	Nd
	NaCl	Sí			
0 Zn/ 6 insulina, 200 μM HSA	Glicerol	No	100 %	21,7	130
	NaCl	No			
0 Zn/ 6 insulina, 120 μM HSA	Glicerol	No	100 %	21,7	130
	NaCl	No			
0 Zn/ 6 insulina, 80 μM HSA	Glicerol	No	100 %	25 / 21,7	6 / 130
	NaCl	No			
0 Zn/ 6 insulina, 60 μM HSA	Glicerol	No	100 %	25 / 21,7	6 / 130
	NaCl	yes			
0 Zn/ 6 insulina, 30 μM HSA	Glicerol	No	30 %	Nd	Nd
	NaCl	Sí			
1 Zn/ 6 insulina	Glicerol	No	Nd	Nd	Nd
	NaCl	Sí			
1 Zn/ 6 insulina, 200 μM HSA	Glicerol	No	Nd	Nd	Nd
	NaCl	No			
1 Zn/ 6 insulina, 120 μM HSA	Glicerol	No	100 %	21,4	130
	NaCl	No			
1 Zn/ 6 insulina, 80 μM HSA	Glicerol	No	100 %	25 / 18,2	6/550
	NaCl	No			
1 Zn/ 6 insulina, 60 μM HSA	Glicerol	No	100 %	25 / 17,8	6 / 669
	NaCl	yes			
1 Zn/ 6 insulina, 30 μM HSA	Glicerol	No	Nd	Nd	Nd
	NaCl	Sí			

ES 2 552 401 T3

Formulación: insulina humana A22K(N <sup>ε</sup> (eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 600 μM, fosfato 7 mM pH 7,4, fenol 30 mM	Agente isotónico glicerol 174 mM o NaCl 150 mM	Precipitado de insulina	Filtración con gel SEC	Filtración con gel SEC. Tiempo de retención en min	Filtración con gel SEC. Estimación de Mw (kDa)
4 Zn/ 6 insulina	Glicerol	No	Nd	Nd	Nd
	NaCl	Sí			
4 Zn/ 6 insulina, 200 μM HSA	Glicerol	No	Nd	Nd	Nd
	NaCl	No			
4 Zn/ 6 insulina, 120 μM HSA	Glicerol	No	100 %	19,4	440
	NaCl	No			
4 Zn/ 6 insulina, 80 μM HSA	Glicerol	No	100 %	18,2	550
	NaCl	No			
4 Zn/ 6 insulina, 60 μM HSA	Glicerol	No	100 %	17,5	669
	NaCl	yes			
4 Zn/ 6 insulina, 30 μM HSA	Glicerol	No	Nd	Nd	Nd
	NaCl	Sí			
6 Zn/ 6 insulina	Glicerol	No	Nd	Nd	Nd
	NaCl	Sí			
6 Zn/ 6 insulina, 200 μM HSA	Glicerol	No	Nd	Nd	Nd
	NaCl	No			
6 Zn/ 6 insulina, 120 μM HSA	Glicerol	No	Nd	Nd	Nd
	NaCl	No			
6 Zn/ 6 insulina, 80 μM HSA	Glicerol	No	100 %	19,2	440
	NaCl	No			
6 Zn/ 6 insulina, 60 μM HSA	Glicerol	No	100 %	18,8	500
	NaCl	No			
6 Zn/ 6 insulina, 30 μM HSA	Glicerol	No	Nd	Nd	Nd
	NaCl	Sí			

La conclusión de la investigación anterior es como sigue:

- 5 La solubilidad de Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 se investigó en cloruro de sodio isotónico (150 μM) como función de la concentración de cinc y albúmina. En presencia de albúmina, la Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 forma un precipitado. En presencia del mínimo de albúmina en la cantidad estequiométrica de 7,5 moles de insulinas aciladas a 1 mol de albúmina, la insulina acilada es soluble en el intervalo de concentraciones de cinc 0-6 átomos de cinc/6 insulinas.
- 10 En filtración con gel nativo, en la que la fase móvil es Tris 10 mM, NaCl 140 mM, la recuperación de Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 se investigó para formulaciones con glicerol como agente isotónico en función de la concentración de cinc y albúmina. En ausencia de albúmina, la recuperación de insulina acilada se reducía, indicando precipitación de insulina en la fase móvil. En presencia de albúmina, la recuperación de la insulina acilada correspondía al 100%. El tiempo de retención de la insulina acilada mezclada con albúmina se reducía con la concentración decreciente de albúmina. Para formulaciones sin cantidad alguna de cinc, se midió el complejo albúmina-insulina acilada, estando constituido por dos moléculas de albúmina oligomerizadas por un dímero de insulina acilada. Para formulaciones con 1 ion cinc por hexámero de insulina, se midió el complejo insulina-albúmina hasta el tamaño de 2 moléculas de albúmina oligomerizadas por un dímero de insulina acilada en la ratio de 5 moléculas de insulina por molécula de albúmina. Para las ratios de 7,5 y 10 moléculas de insulina por molécula de albúmina, se detectaron dos picos, correspondiendo uno de ellos a insulina monómera y
- 15
- 20

correspondiendo el otro al tamaño de varios hexámeros de insulina acilada que fijaban varias moléculas de albúmina.

5 Para formulaciones con 3, 4 y 6 iones cinc por molécula de insulina, se formaban grandes oligómeros correspondientes al tamaño de varios hexámeros de insulina acilada que fijaban varias moléculas de albúmina.

10 Se llega a la conclusión de que, en la ratio mínima de 7,5 moléculas de insulina por molécula de albúmina, la albúmina mantiene la insulina acilada soluble, tanto en una formulación con NaCl 150 mM como también en la filtración con gel nativo.

15 Adicionalmente, se muestra que el dímero de insulina acilada forma un complejo con 2 moléculas de albúmina. En presencia de 1 ion Zn por 6 moléculas de insulina y albúmina, una fracción de la insulina acilada en los hexámeros está fijada a la albúmina, y una fracción de la insulina acilada se encuentra en forma monómera unida a albúmina. En presencia de 3, 4 ó 6 iones cinc por 6 moléculas de insulina, no se detecta insulina monómera alguna y se forman grandes oligómeros hexámero de insulina-albúmina.

**Ejemplo 4**

20 Se disuelve Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 en Milli-Q, obteniéndose muestras conforme a la Tabla 3 que contienen Tris 7 mM de pH 7,4; 1,6% glicerol; fenol 30 mM; 3 Zn por 6 moléculas de insulina; 1 seroalbúmina humana por 4 moléculas de insulina; NaCl 150 mM . La solución de test se filtra a través de un filtro de 0,2 μm, y la concentración de insulina resultante en el sobrenadante se midió por HPLC estándar en fase inversa utilizando Insulina humana como referencia.

25 La cantidad resultante de insulina soluble se consigna en la Tabla 3.

Tabla 3

Concentración de insulina antes de la filtración	Cantidad de insulina en solución después de la filtración, en porcentaje
300 μM	100
600 μM	100
1200 μM	100
1800 μM	100

30 La conclusión del experimento anterior es que la adición de albúmina en cantidades estequiométricas de 1 molécula de albúmina por 4 moléculas de insulina en NaCl 150 mM da como resultado una molécula de insulina soluble en concentraciones de 300 μM, 600 μM, 1200 μM y 1800 μM.

**Ejemplo 5**

35 Se administraron a cerdos cantidades iguales de Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 por administración subcutánea. La concentración de insulina en la sangre se midió después de la inyección, y el resultado se muestra en las Figs. 3 y 4. El gráfico de Fig. 3 muestra el resultado desde el tiempo 0 a los 1500 minutos después de la inyección, y el gráfico de Fig. 4 ilustra los primeros 300 minutos después de la inyección. En las figuras, se utilizan las abreviaturas siguientes: "ins" es insulina, "PK" es farmacocinético, y "SEM" es el valor medio del error estándar. Se investigaron las formulaciones siguientes:

45 1a): Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 600 μM, seroalbúmina de cerdo 150 mM, 3 Zn/hexámero de insulina, 1 Zn/seroalbúmina de cerdo, glicerol 174 mM, fenol 30 mM, pH 7,4.

50 1b): Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 600 μM, seroalbúmina de cerdo 150 mM , 3 Zn/hexámero de insulina , 1 Zn/seroalbúmina de cerdo, arginina 30 mM, nicotinamida 120 mM, fenol 30 mM, pH 7,4.

La conclusión del experimento anterior es que la adición de nicotinamida aumenta adicionalmente la biodisponibilidad de la insulina acilada.

**Ejemplo 6**

55

Se administraron a cerdos cantidades iguales de Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 por administración subcutánea. La concentración de insulina en la sangre se midió después de la inyección, y el resultado se muestra en las Figuras 5 y 6. El gráfico de la Figura 5 muestra el resultado desde el tiempo 0 a 1500 minutos después de la inyección y el gráfico de Fig. 6 ilustra los primeros 300 minutos después de la inyección.

5 En las figuras, se utilizan las abreviaturas siguientes: "ins" es insulina, "PK" es farmacocinético, y "SEM" es el valor medio del error estándar. Se investigaron las formulaciones siguientes:

10 1a): Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 600 μM, seroalbúmina de cerdo 150 μM, 3 Zn/hexámero de insulina, 1 Zn/seroalbúmina de cerdo, glicerol 174 mM, fenol 30 mM, pH 7,4;

1b): Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), B29R, desB30 600 μM, 3 Zn/hexámero de insulina, 1 Zn/seroalbúmina de cerdo, arginina 30 mM, 120 mM nicotinamida, fenol 3 mM, pH 7,4.

15 La conclusión del experimento anterior es que la adición de albúmina aumenta la biodisponibilidad de la insulina acilada.

### Ejemplo 7

20 Una solución de 45 μL de 1) Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG-OEG-OEG)), A18L, B29R, desB30 600 μM abreviada a A22K(N<sup>ε</sup>(C20-γGlu-OEG-OEG-OEG-OEG)), A18L, B29R, 2) Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), A18L, B29R, desB30 (abreviada a A18L, A22K, insulina humana NepsC18, γGlu-OEG-OEG), o 3) Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(eps)eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), desB29-30 abreviada a A22K(N<sup>ε</sup>(C20-γGlu-OEG-OEG)), desB29-30, en formulación conforme a la Tabla 4 se mezcló con 5 μL de solución de cloruro de sodio en concentración conforme a la Tabla 4. 48 horas después, se mezclaron las dos soluciones y se determinó la cantidad de insulina acilada precipitada después de filtración. La determinación de la concentración se llevó a cabo por medida de HPLC de insulina en solución. La cantidad en porcentaje de insulina acilada soluble en relación con la cantidad total de insulina acilada presente en la solución de test tiene que ser superior a 30% para una concentración de cloruro de sodio de 150 mM, preferiblemente superior a 50% para cloruro de sodio 150 M y de modo muy preferible superior a 60% para 150 μM.

Tabla 4

Formulación: insulina 600 μM, acetato de cinc 300 μM, fosfato 7 mM pH 7,4, fenol 30 mM	Concentración de NaCl, en mM	% insulina en solución
A22K(N <sup>ε</sup> (C20-γGlu-OEG, OEG, OEG-OEG)), A18L, B29R	0	100
	5	
	10	
	25	
	50	100
	75	100
	100	
	125	46
	150	
	175	13
	200	13
A18L, A22K, Neps C18-γGlu-OEG-OEG	0	100
	5	
	10	100
	25	
	50	100
	75	
	100	100
	125	75

Formulación: insulina 600 µM, acetato de cinc 300 µM, fosfato 7 mM pH 7,4, fenol 30 mM	Concentración de NaCl, en mM	% insulina en solución
	150	
	175	58
	200	50
A22K(N <sup>ε</sup> (C20-γGlu-OEG-OEG)), desB29-30	0	
	5	100
	10	100
	15	100
	20	100
	34	15
	62	7
	100	3

**Ejemplo 8**

5 Una solución de 45 µL de 1) Insulina humana A22K(N<sup>ε</sup>(octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG)), A18L, B29R, desB30 humana 630 µM (abreviada a A18L, A22K, insulina humana NepsC18-γGlu-OEG-OEG), o 2) Insulina humana  
 10 A22K(N(εps)eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG)), desB29-30 abreviada a A22K(N<sup>ε</sup>(C20-γGlu-OEG-OEG)), desB29-30, en formulación conforme a la Tabla 5 se mezcló con 5 µL de solución de cloruro de sodio en concentración conforme a la Tabla 5. 48 horas después, se mezclaron las dos soluciones y se determinó la cantidad de insulina acilada precipitada después de filtración. La determinación de la concentración se llevó a cabo por medida de HPLC de insulina en solución. La cantidad en porcentaje de insulina acilada soluble en relación con la cantidad total de insulina acilada presente en la solución de test tiene que ser superior a 30% para una concentración de cloruro de sodio de 150 mM, preferiblemente superior a 50% para 150 M cloruro de sodio, y muy preferiblemente superior a 60% para 150 µM.

15

Tabla 5

Formulación: insulina 600 µM, fosfato 7 mM pH 7,4, fenol 30 mM	Concentración de NaCl en mM	% Insulina en solución
A18L, A22K, Neps C18-γGlu-OEG-OEG	0	100
	5	
	10	100
	25	
	50	100
	75	
	100	23
	125	20
	150	20
	175	13
A22K(N <sup>ε</sup> (C20-γGlu-OEG-OEG)), desB29-30	200	7
	0	100
	5	
	10	27
	20	27
	34	23
	50	13

Formulación: insulina 600 $\mu$ M, fosfato 7 mM pH 7,4, fenol 30 mM	Concentración de NaCl en mM	% Insulina en solución
	62	3
	100	3

**Test A**

- 5 Test para solubilidad de una insulina acilada en presencia de cinc.

Este test se realiza como sigue: Se disuelven 4 mg de la insulina acilada a testar en agua Milli-Q obteniéndose una concentración final de 600  $\mu$ M que contiene acetato de cinc suministrado a una concentración final de tres iones cinc por 6 moléculas de insulina y fenol hasta una concentración final de 30 mM. El valor de pH se ajusta a 7,4 utilizando NaOH 1 N. Se añade cloruro de sodio a una concentración final de 150 mM. La solución de test se mezcla por rotación suave y se incuba 1 hora a la temperatura ambiente. La solución de test se filtra a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m y la concentración de insulina en el filtrado se mide por HPLC estándar en fase inversa utilizando Insulina humana como referencia.

- 10  
15 Si la concentración de insulina es inferior a 30% de la concentración inicial después de centrifugación, esta insulina acilada está entre las abarcadas por la presente invención, cuando se mezcla con albúmina.

**Test B**

- 20 Test para el peso molecular de un oligómero insulina-albúmina

Este test se realiza como sigue: Se disuelven 4 mg de la insulina acilada a testar en Milli-Q obteniéndose una concentración final de 600  $\mu$ M que contiene acetato de cinc suministrado a una concentración final de tres iones cinc por 6 moléculas de insulina. Se añade seroalbúmina humana a una concentración final de 150  $\mu$ M y fenol a una concentración final de 30 mM. El valor del pH se ajusta a 7,4 utilizando NaOH 1 N. La solución de test se aplica a una columna de filtración en gel equilibrada en Tris pH 7,4, NaCl 140 mM, y el peso molecular de los oligómeros en la solución de test se mide utilizando los estándares de peso molecular y el método de filtración en gel descrito por Jonassen, I., Havelund, S., Ribel, U., Plum, A., Loftager, M., Hoeg-Jensen, T., Vølund, A., y Markussen, J. en: Pharmaceutical Research, 2006; 23, 1; 49-55.

- 25  
30 Las insulinas aciladas que forman agregados de 440 kDa o mayores en la solución de test descrita están abarcadas por la presente invención, cuando se mezclan con albúmina.

**Test C**

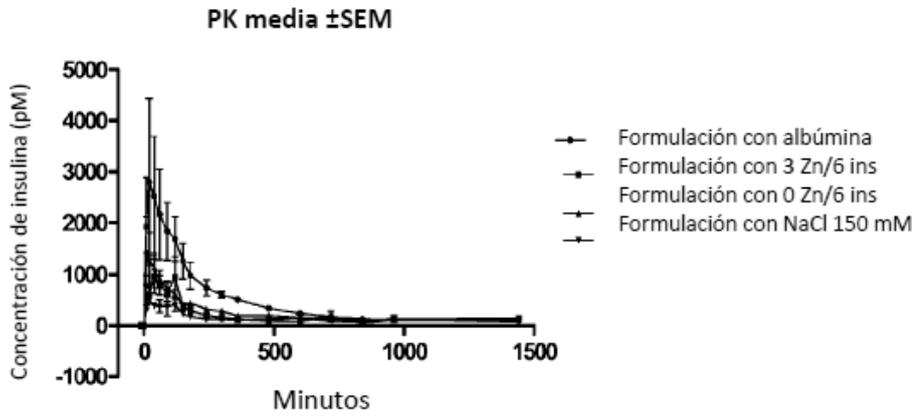
- 35 Test para solubilidad de una insulina acilada en ausencia de cinc.

Este test se realiza como sigue: 4 mg de la insulina acilada a testar se disuelven en Milli-Q obteniéndose una concentración final de 600  $\mu$ M que contiene fenol en una concentración final de 30 mM. El valor del pH se ajusta a 7,4 utilizando NaOH 1 N. Se añade cloruro de sodio a una concentración final de 150 mM. La solución de test se mezcla por rotación suave y se incuba durante 1 hora a la temperatura ambiente. La solución de test se filtra a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m y la concentración de insulina en el filtrado se mide por HPLC estándar en fase inversa utilizando Insulina humana como referencia. Si la concentración de insulina es inferior a 50% de la concentración inicial después de centrifugación, esta insulina acilada se encuentra entre las abarcadas por la presente invención, cuando se mezcla con albúmina.

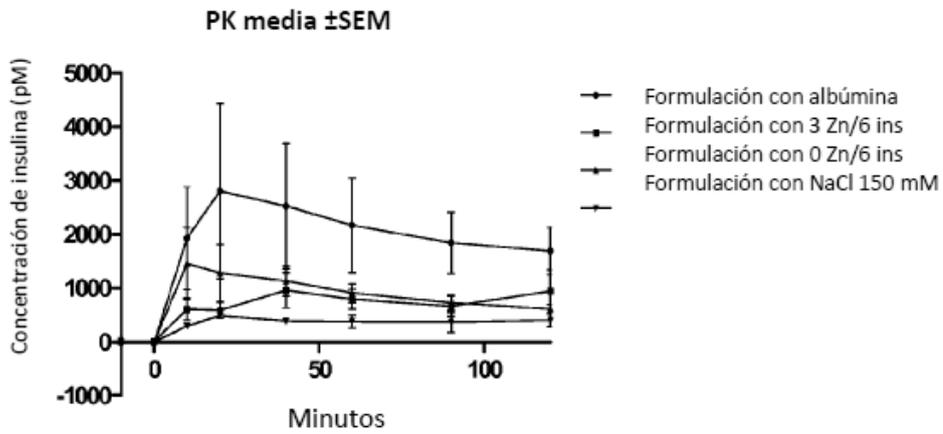
- 40  
45

## REIVINDICACIONES

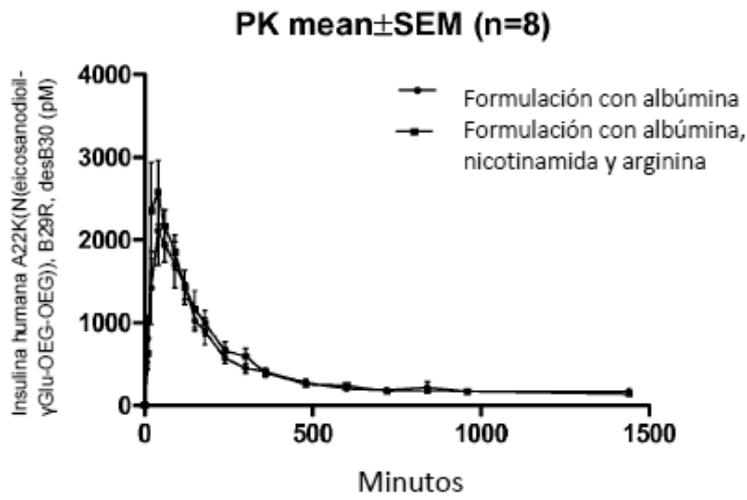
- 5 1. Una formulación farmacéutica inyectable que contiene una insulina acilada y albúmina, **caracterizada por que** al menos 99% (peso/peso) de la insulina acilada está disuelto, en la cual no más de 1% (peso/peso) de la insulina está unido covalentemente a albúmina, en la cual la insulina acilada es una insulina acilada por salificación, que tiene una solubilidad inferior a 30% determinada en una solución de NaCl 150 mM, que contiene 3 iones cinc por 6 moléculas de insulina conforme al test A de esta invención, y en la cual la ratio molar entre albúmina e insulina acilada está comprendida en el intervalo de 1:3 a 1:10.
- 10 2. La formulación farmacéutica inyectable conforme a la reivindicación 1, en la cual la ratio molar entre albúmina e insulina acilada está comprendida en el intervalo de aproximadamente 1:5.
- 15 3. La formulación farmacéutica inyectable conforme a la reivindicación 1, en la cual la ratio molar entre albúmina e insulina acilada está comprendida en el intervalo de aproximadamente 1:7.
4. La formulación farmacéutica inyectable conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la cual al menos 99,9% (peso/peso) de la insulina acilada está disuelto.
- 20 5. La formulación farmacéutica inyectable conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la cual la totalidad de la insulina acilada está disuelto.
6. La formulación farmacéutica inyectable conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la cual no más de 0,1% (peso/peso) de la insulina acilada está unido covalentemente a albúmina.
- 25 7. La formulación farmacéutica inyectable conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la cual no está unida covalentemente cantidad alguna de insulina a albúmina.
- 30 8. La formulación farmacéutica inyectable conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que contiene una insulina acilada y albúmina, en la cual la totalidad de la insulina acilada está disuelto y en la cual no existe unión covalente alguna entre la insulina acilada y la albúmina, para uso por inyección.
- 35 9. Una formulación farmacéutica inyectable que contiene una insulina acilada y albúmina, **caracterizada por que** al menos 99% (peso/peso) de la insulina acilada está disuelto, en la cual no más de 1% (peso/peso) de la insulina está unido covalentemente a albúmina, en la cual la insulina acilada es una insulina acilada por salificación que forma un oligómero insulina-albúmina con un peso molecular superior a 440.000, como se define específicamente en el Test B de esta memoria, y en la cual la ratio molar entre albúmina e insulina acilada está comprendida en el intervalo de 1:3 a 1:10.



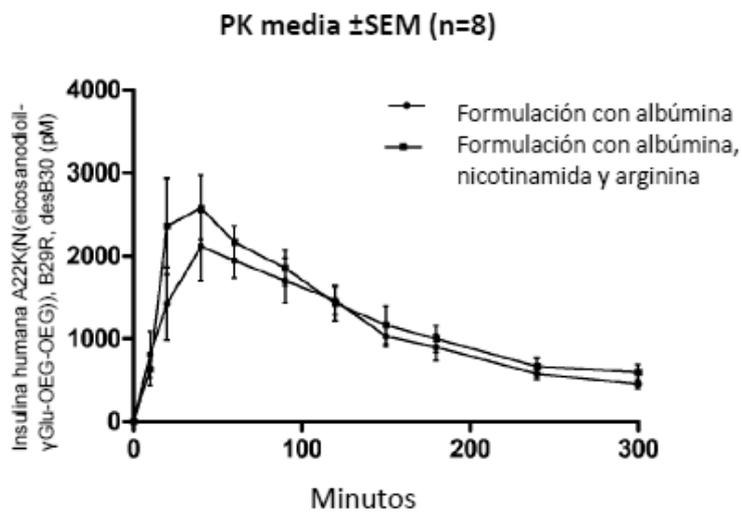
**Fig. 1**



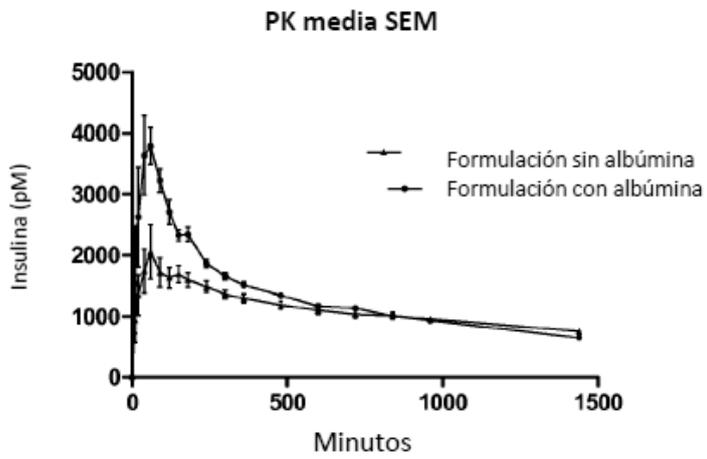
**Fig. 2**



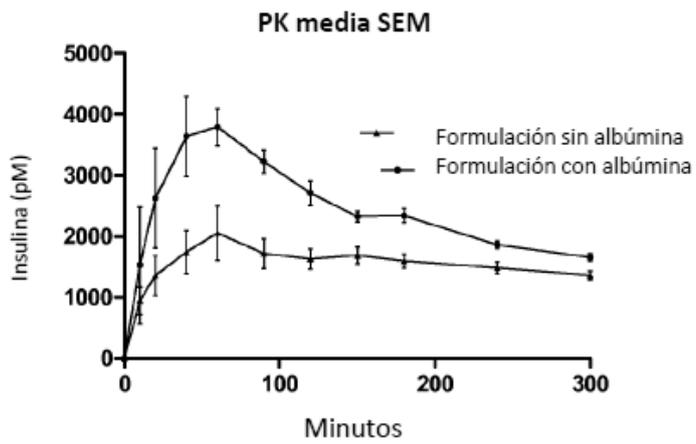
**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**