

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 984**

51 Int. Cl.:

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2005 E 05803458 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 1814581**

54 Título: **Formulaciones estables de péptidos que contienen un análogo de GLP-1 acilado y una insulina basal**

30 Prioridad:

12.11.2004 DK 200401752

13.05.2005 EP 05104049

19.09.2005 DK 200500589

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2016

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsvård, DK

72 Inventor/es:

LUDVIGSEN, SVEND;

SCHLEIN, MORTEN y

BØVING, TINE ELISABETH GOTTSCHALK

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 575 984 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones estables de péptidos que contienen un análogo de GLP-1 acilado y una insulina basal

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas. Más específicamente la invención compete a formulaciones farmacéuticas estables al almacenamiento que contienen péptido insulínico e insulina.

10 Antecedentes de la invención

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico en el cual se perdió la capacidad de utilizar la glucosa parcial o totalmente. Alrededor del 5% de todas las personas sufren de diabetes y el trastorno se acerca a proporciones epidémicas. Desde la introducción de la insulina en la década de 1920, se han hecho continuos esfuerzos para mejorar el tratamiento de la diabetes mellitus. Puesto que las personas que sufren de diabetes están sujetas a tratamiento crónico durante varias décadas, existe una importante necesidad de formulaciones de insulina seguras, convenientes 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, como la insulina regular, la insulina isófana (denominada NPH), las suspensiones de insulina zinc (como Semilente[®], Lente[®] y Ultralente[®]) y la insulina isófana bifásica. Algunas de las formulaciones de insulina disponibles en el comercio se caracterizan por un inicio rápido de la acción y otras formulaciones tienen un inicio relativamente lento pero muestran una acción más o menos prolongada. Las formulaciones de insulina de acción rápida son generalmente soluciones de insulina, en tanto las formulaciones de insulina de acción retardada pueden ser suspensiones que contienen la insulina en forma cristalina y/o amorfa precipitada por adición de sales de zinc solas o por adición de protamina o por una combinación de ambas.

Normalmente, las formulaciones de insulina se administran mediante inyección subcutánea. Lo que es importante para el paciente es el perfil de acción de la formulación de insulina, 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 hasta el inicio, el valor máximo y la duración total de la acción son importantes. Los pacientes desean y solicitan diversas formulaciones de insulina con diferentes perfiles de acción.

La insulina humana consta de dos cadenas polipeptídicas, las denominadas cadenas A y B que contienen 21 y 30 residuos de aminoácidos, respectivamente. Las cadenas A y B están interconectadas por dos puentes disulfuro entre cisteínas. La insulina de la mayoría de las otras especies tiene una construcción similar, pero puede no contener los mismos residuos de aminoácidos en las mismas posiciones. En la última década se han desarrollado una serie de análogos de la insulina humana. Se designan por sus perfiles de acción particulares, es decir, de rápida acción o de acción prolongada.

Otro péptido que se espera que se torne muy importante en el tratamiento de la diabetes es el péptido similar al glucagón-1 (GLP-1). El GLP-1 humano es un péptido de 37 residuos de aminoácidos que se origina a partir del preproglucagón que se sintetiza entre otros en las células L de la porción distal del íleon, en el páncreas y en el cerebro. GLP-1 es una hormona intestinal importante con una función reguladora en el metabolismo de la glucosa, y en la secreción y el metabolismo gastrointestinales. GLP-1 estimula la secreción de insulina de manera dependiente de la glucosa, estimula la biosíntesis de insulina, promueve el rescate de las células beta, disminuye la secreción de glucagón, el vaciado gástrico y la ingesta de alimentos. Se utiliza un sistema simple para describir fragmentos y análogos de este péptido. Así, por ejemplo, Gly⁸-GLP-1 (7-37) designa un análogo de GLP-1 (7-37) derivado formalmente de GLP-1 (7-37) sustituyendo el residuo de aminoácido de origen natural de la posición 8 (Ala) por Gly. Análogamente, Lys³⁴(N⁶-tetradecanoil)-GLP-1(7-37) designa un GLP-1 (7-37) en el que el grupo ε-amino del residuo de Lys de la posición 34 ha sido tetradecanoilado. Las publicaciones PCT WO 98/08871 y WO 99/43706 dan a conocer derivados estables de análogos de GLP-1, que tienen un sustituyente lipófilo. Estos derivados estables de análogos de GLP-1 tienen un perfil de acción prolongada en comparación con los análogos de GLP-1 correspondientes. Aparte de los péptidos GLP-1, el péptido de lagarto exendina-4 también tiene un fuerte efecto insulínico.

Como la población con diabetes tipo 2 está creciendo rápidamente en el mundo, existe una necesidad mucho mayor de una administración más simple de fármacos más eficaces. Se espera que los efectos de GLP-1 proporcionen a los pacientes una disminución muy eficaz y segura de la glucemia. Sin embargo, algunos pacientes se pueden beneficiar de una insulina basal extra para ayudar a normalizar los niveles de glucemia postprandiales. Una formulación de combinación que contenga una insulina basal y un péptido insulínico, puede ser un tratamiento muy eficaz así como uno que requiera menos inyecciones al paciente. Dado que sólo una dosis baja de insulina es administrada con la inyección y la contraparte de GLP-1 de la formulación controla la glucosa durante el resto del día y la noche, y puesto que GLP-1 no conduce a hipoglucemia, también puede ser un tratamiento muy seguro.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de composiciones farmacéuticas estable al almacenamiento que contengan un péptido insulínico y una insulina basal en una formulación combinada.

5 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Mezclas de detemir 2.4 mM y liraglutida 1.2 mM en una formulación que contiene acetato de Zn 1.2 mM, glicilglicina 5 mM, cloruro de sodio 20 mM, fenol 60 mM y 14 mg/ml de propilenglicol a pH 7.7 (diamantes) y la misma formulación pero con el agregado de 300 ppm de polisorbato 20 (tween 20).

10 Figura 2. Mezclas de detemir 2.4 mM y liraglutida 1.2 mM en una formulación que contiene acetato de Zn 1.2 mM, glicilglicina 5 mM, cloruro de sodio 20 mM, fenol 60 mM y 14 mg/ml de propilenglicol a pH 7.7 (diamantes) y la misma formulación pero con el agregado de 300 ppm de polisorbato 20 (tween 20) a 3 valores de pH diferentes, triángulos a pH 7.4, cuadrados a pH 7.7 y círculos a pH 8.1.

15 Figura 3. Mezclas de detemir 2.4 mM y liraglutida 2.4 mM en una formulación que contiene acetato de Zn 1.2 mM, tampón de fosfato de sodio 8 mM, cloruro de sodio 20 mM, fenol 60 mM y 14 mg/ml de propilenglicol a pH 7.7 (cuadrados) y la misma formulación pero con el agregado de 300 ppm de polisorbato 20 que se muestra con símbolos de estrellas.

20 Figura 4. Mezclas de detemir 2.4 mM y liraglutida 2.4 mM en una formulación que contiene acetato de Zn 1.2 mM, tampón de fosfato de sodio 8 mM, cloruro de sodio 20 mM, fenol 60 mM y 14 mg/ml de propilenglicol a pH 7.7 (cuadrados) y la misma formulación pero con el agregado de 2 niveles de poloxámeros 188, 100 ppm que se muestran con cruces y 500 ppm con triángulos.

25 Figura 5. La formulación A consiste en: insulina N^{εB29}-(N^α(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 insulina humana 0.6 mM, Zn²⁺ 0.3 mM (correspondiente a 3 iones de Zn²⁺ por hexámero de insulina), fenol 60 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fosfato 5 mM de pH 7.7 y liraglutida 1.2 mM, y la misma formulación con el agregado de 200 ppm de polisorbato-20 o 1000 ppm de poloxámero-188.

Figura 6. La formulación B consiste en: N^{εB29}-(N^α(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 insulina humana 0.6 mM, Zn²⁺ 0.5 mM (correspondiente a 5 iones de Zn²⁺ por hexámero de insulina), fenol 60 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fosfato 5 mM de pH 7.7 y liraglutida 1.2 mM. También se muestra con el agregado de 2000 ppm de poloxámero-188.

30 Descripción de la invención

La siguiente es una definición detallada de los términos utilizados en esta memoria.

35 La expresión "composición farmacéutica estable al almacenamiento" según se usa en este documento significa una composición farmacéutica que es estable durante al menos el período requerido por los organismos reguladores en relación con las proteínas terapéuticas. Preferentemente, una composición farmacéutica estable al almacenamiento es estable durante al menos un año a 5 °C. Estabilidad incluye la estabilidad química así como la estabilidad física.

40 La expresión "cantidad eficaz" según se usa en este documento significa una dosis suficiente para que el tratamiento del paciente sea eficaz en comparación con la falta de tratamiento.

El término "medicamento" según se usa en este documento significa una composición farmacéutica adecuada para la administración de los principios farmacéuticamente activos a un paciente.

45 La expresión "composición farmacéutica" según se usa en este documento significa un producto que contiene un principio activo o una sal de éste junto con excipientes farmacéuticos como un tampón, un conservante y un modificador de la tonicidad, donde dicha composición farmacéutica es útil para tratar, prevenir o disminuir la gravedad de una enfermedad o un trastorno mediante administración de dicha composición farmacéutica a una persona. Por lo tanto una composición farmacéutica también se conoce como una formulación farmacéutica. Se debe entender que el pH de una composición farmacéutica destinada a ser reconstituida, es el valor de pH que se mide en la composición reconstituida producida por reconstitución en el líquido de reconstitución prescrito a temperatura ambiente.

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

55 El término "tampón" según se usa en este documento se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que reduce la tendencia del pH de la composición a cambiar con el tiempo, como ocurriría de lo contrario debido a reacciones químicas. Los tampones incluyen productos químicos como fosfato de sodio, TRIS, glicina y citrato de sodio.

60 El término "conservante" según se usa en este documento se refiere a un compuesto químico que se agrega a una composición farmacéutica para prevenir o retardar la actividad microbiana (la multiplicación y el metabolismo). Los ejemplos de conservantes farmacéuticamente aceptables son fenol, m-cresol y una mezcla de fenol y m-cresol.

La expresión "agente de isotonicidad" según se usa en este documento se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que sirve para modificar la presión osmótica de la composición farmacéutica de modo que la presión osmótica se aproxime a la del plasma humano. Los agentes de isotonicidad incluyen NaCl, glicerol, manitol, etc.

El término "estabilizante" según se usa en este documento se refiere a productos químicos agregados a composiciones farmacéuticas que contienen un péptido para estabilizar al péptido, es decir para aumentar la vida útil y/o el tiempo de uso de dichas composiciones. Los ejemplos de estabilizantes utilizados en formulaciones farmacéuticas son L-glicina, L-histidina, arginina, polietilenglicol y carboximetilcelulosa.

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.

Los surfactantes aniónicos se pueden elegir del grupo de: ácido quenodesoxicólico, sal de sodio del ácido quenodesoxicólico, ácido cólico, ácido deshircólico, ácido desoxicólico, éster metílico del ácido desoxicólico, digitonina, digitoxigenina, N,N-dimetildodecilamina N-óxido, docusato sódico, sal de sodio del ácido glicoquenodesoxicólico, ácido glicocólico hidratado, ácido glicodesoxicólico monohidratado, sal de sodio del ácido glicodesoxicólico, sal de sodio del ácido glicodesoxicólico, sal disódica de 3-sulfato ácido glicolítico, éster etílico del ácido glicolítico, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, N-lauroilsarcosina, N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, Lugol, sal de sodio del ácido 1-octanosulfónico, sal de sodio del ácido 1-octanosulfónico, 1-butanosulfonato de sodio, 1-decanosulfonato de sodio, 1-dodecanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio, 1-nonanosulfonato de sodio, 1-propanosulfonato de sodio monohidratado, 2-bromoetanosulfonato de sodio, colato de sodio hidratado, bilis de buey o de oveja, colato de sodio hidratado, colato de sodio, desoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio, dodecil sulfato de sodio, hexanosulfonato de sodio, octil sulfato de sodio, pentanosulfonato de sodio, taurocolato de sodio, sal de sodio del ácido tauroquenodesoxicólico, sal de sodio del ácido taurodesoxicólico monohidratada, sal disódica de 3-sulfato ácido tauroglucosídico, sal de sodio del ácido tauroursodesoxicólico, dodecil sulfato de Trizma®, DSS (docusato de sodio, N° de reg. CAS [577-11-7]), docusato de calcio, N° de reg. CAS [128-49-4]), docusato de potasio, N° de reg. CAS [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio), dodecilsulfocolina (FOS-Colina-12), decilsulfocolina (FOS-Colina-10), nonilsulfocolina (FOS-Colina-9), ácido dipalmitoil fosfatídico, caprilato de sodio y/o ácido ursodesoxicólico.

Los surfactantes catiónicos se pueden elegir del grupo de: bromuro de alquiltrimetilamonio

cloruro de benzalconio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, cloruro de bencildimetiltetradecilamonio, tetracloroyodato de benciltrimetilamonio, bromuro de dimetildiodecildodecilamonio, bromuro de dodecildodecildodecilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de etilhexadecildimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, polioxietileno 10-N-sebo-1,3-diaminopropano, bromuro de tonzonio y/o bromuro de trimetil(tetradecil)amonio.

Los surfactantes no iónicos se pueden elegir del grupo de: BigCHAP, Bis(polietilenglicol bis[imidazol carbonil]), copolímeros en bloque como óxido de polietileno/óxido de polipropileno, copolímeros en bloque como poloxámeros, poloxámero 188 y poloxámero 407, Brij® 35, Brij® 56, Brij® 72, Brij® 76, Brij® 92V, Brij® 97, Brij® 58P, Cremophor® EL, decaetilenglicol monododecil éter, N-decanoil-N-metilglucamina, N-dodecanoil-N-metilglucamida, alquilpoliglucósidos, aceite de ricino etoxilado, heptaetilenglicol monododecil éter, heptaetilenglicol monododecil éter, heptaetilenglicol monotetradecil éter, hexaetilenglicol monododecil éter, hexaetilenglicol monohexadecil éter, hexaetilenglicol mono-octadecil éter, hexaetilenglicol monotetradecil éter, Igepal CA-630, Igepal CA-630, metil-6-O-(N-heptilcarbamol)-beta-D-glucopiranosido, nonaetilenglicol monododecil éter, N-nonanoil-N-metilglucamina, N-nonanoil-N-metilglucamina, octaetilenglicol monododecil éter, octaetilenglicol monododecil éter, octaetilenglicol monotetradecil éter, octil-beta-D-glucopiranosido, pentaetilenglicol monododecil éter, pentaetilenglicol monododecil éter, pentaetilenglicol monohexadecil éter, pentaetilenglicol monohexadecil éter, pentaetilenglicol monohexadecil éter, pentaetilenglicol monooctadecil éter, pentaetilenglicol monooctadecil éter, pentaetilenglicol mono-octil éter, polietilenglicol diglicidil éter, polietilenglicol éter W-1, polioxietileno 10 tridecil éter, estearato de polioxietileno 100, polioxietileno 20 isohexadecil éter, polioxietileno 20 oleil éter, estearato de polioxietileno 40, estearato de polioxietileno 50, estearato de polioxietileno 8, polioxietileno bis(imidazol carbonil), estearato de polioxietileno 25 propilenglicol, saponina de corteza de Quillaja, Span® 20, Span® 40, Span® 60, Span® 65, Span® 80, Span® 85, Tergitol, tipo 15-S-12, Tergitol, tipo 15-S-30, Tergitol, tipo 15-S-5, Tergitol, tipo 15-S-7, Tergitol, tipo 15-S-9, Tergitol, tipo NP-10, Tergitol, tipo NP-4, Tergitol, tipo NP-40, Tergitol, tipo NP-7, Tergitol, tipo NP-9,

- tetradecil- β -D-maltósido, tetraetilenglicol monodecil éter, tetraetilenglicol monododecil éter, tetraetilenglicol monotetradecil éter, trietilenglicol monodecil éter, trietilenglicol monododecil éter, trietilenglicol monohexadecil éter, trietilenglicol monoocetil éter, trietilenglicol monotetradecil éter, Triton CF-21, Triton CF-32, Triton DF-12, Triton DF-16, Triton GR-5M, Triton QS-15, Triton QS-44, Triton X-100, Triton X-102, Triton X-15, Triton X-151, Triton X-200, Triton X-207, Triton[®] X-100, Triton[®] X-114, solución de Triton[®] X-165, solución de Triton[®] X-305, Triton[®] X-405, Triton[®] X-45, Triton[®] X-705-70, TWEEN[®] 20, TWEEN[®] 40, TWEEN[®] 60, TWEEN[®] 6, TWEEN[®] 65, TWEEN[®] 80, TWEEN[®] 81, TWEEN[®] 85, Tiloxapol, esfingofosfolípidos (esfingomielina) y esfingoglucolípidos (ceramidas, gangliósidos), fosfolípidos y/o n-undecil β -D-glucopiranosido.
- Los surfactantes zwitteriónicos se pueden elegir del grupo de: CHAPS, CHAP-SO, sal interna de 3-(decildimetilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetilmiristilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetiloctadecilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(N,N-dimetiloctilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio)propanosulfonato, N-alkuil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonato, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, dodecilsulfocolina, miristoil lisofosfatidilcolina, Zwittergent 3-12 (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato), Zwittergent 3-10 (sal interna de 3-(decildimetilamonio)propanosulfonato), Zwittergent 3-08 (3-(octildimetilamonio)propanosulfonato), glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas, fosfatidilserina), gliceroglucolípidos (galactopiranosido), derivados alquil, alcoxil (alquil éster), alcoxi (alquil éter) de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ej. derivados lauroil y miristoil de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, acilcarnitinas y derivados, derivados N ^{β} -acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados de cadena lateral acilada de lisina o arginina, derivados N ^{β} -acilados de dipéptidos que contengan cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivados N ^{β} -acilados de un tripéptido que contengan cualquier combinación de un aminoácido neutro o dos aminoácidos cargados, o el surfactante se puede elegir del grupo de los derivados de imidazolina, ácidos grasos de cadena larga y sus sales C₆-C₁₂ (por ej. ácido oleico y ácido caprílico), N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, surfactantes aniónicos monovalentes (alquil-aril-sulfonatos), palmitoil lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (por ej. ésteres 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina), o sus mezclas.
- La expresión "tratamiento de una enfermedad" según se usa en este documento significa el manejo y la atención de un paciente que presenta una enfermedad, una afección o un trastorno. 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.
- La expresión "prevención de una enfermedad" según se usa en este documento se define como el manejo y la atención de un individuo que corre riesgo de sufrir la enfermedad antes del inicio clínico de la misma. El propósito de la prevención es combatir el avance de la enfermedad, la afección o el trastorno, e incluye la administración de los principios activos para prevenir o retrasar el inicio de los síntomas o las complicaciones y para prevenir o retrasar la aparición de enfermedades, afecciones o trastornos relacionados.
- La expresión "péptido insulínico" según se usa en este documento significa un péptido que es insulina humana o una insulina humana modificada químicamente, como un análogo o uno de sus derivados.
- 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, a saber, la cadena A y la cadena B. La cadena A es un péptido de 21 aminoácidos y la cadena B es un péptido de 30 aminoácidos, donde 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 las 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 expresión "péptido insulínico relacionado con las comidas" según se usa en este documento se refiere a un péptido insulínico que tiene un tiempo de acción menor de 8 horas en modelos estándar de diabetes. Preferentemente, la insulina humana relacionada con las comidas tiene un tiempo de acción menor de aproximadamente 5 horas. Preferentemente, la insulina humana relacionada con las comidas tiene un tiempo de acción en el intervalo entre 0 horas y aproximadamente 4 horas. Preferentemente, la insulina relacionada con las comidas tiene un tiempo de acción similar al observado para las composiciones farmacéuticas comerciales de Actrapid[®], Novolog[®] y Humalog[®]. El término aproximadamente en relación con el tiempo de acción de las insulinas significa + o - 30 minutos.
- El término "análogo" según se usa en este documento por referencia a un péptido, significa un péptido modificado en el que uno o más residuos de aminoácidos del péptido han sido sustituidos por otros residuos de aminoácidos y/o en el que uno o más residuos de aminoácidos han sido eliminados del péptido y/o en el que uno o más residuos de

aminoácidos han sido eliminados del péptido y/o en el que uno o más residuos de aminoácidos han sido agregados al péptido. Dicha adición o eliminación de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el extremo N-terminal del péptido y/o en el extremo C-terminal. En una realización, un análogo contiene menos de 6 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones) con respecto al péptido natural. En otra realización, un análogo contiene menos de 5 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones) con respecto al péptido natural. En otra realización, un análogo contiene menos de 4 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones) con respecto al péptido natural. En otra realización, un análogo contiene menos de 3 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones) con respecto al péptido natural. En otra realización, un análogo contiene menos de 2 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones) con respecto al péptido natural. En otra realización, un análogo contiene una única modificación (sustitución, eliminación, adición) con respecto al péptido natural.

El término "derivado" según se usa en este documento en relación con un péptido parental significa una proteína parental modificada químicamente o un análogo de ésta, en el que al menos un sustituyente no está presente en la proteína parental o un análogo de ésta, es decir, una proteína parental que ha sido modificada covalentemente. Las modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres, PEGilaciones y similares. Los ejemplos de derivados de la insulina humana son éster metílico de treonina^{B30} insulina humana y N^{εB29}-tetradecanoil des(B30) insulina humana.

La expresión "insulina basal" según se usa en este documento significa un péptido insulínico que tiene un tiempo de acción mayor de 8 horas en modelos estándar de diabetes. Preferentemente, la insulina basal tiene un tiempo de acción de al menos 9 horas. Preferentemente, la insulina basal tiene un tiempo de acción de al menos 10 horas. Preferentemente, la insulina basal relacionada con las comidas tiene un tiempo de acción en el intervalo entre 9 horas y 15 horas. Preferentemente, la insulina relacionada con las comidas tiene un tiempo de acción similar al observado para las composiciones farmacéuticas comerciales de insulina NPH y N^{εB29}-tetradecanoil des(B30) insulina humana.

La expresión "compuesto de GLP-1" según se usa en este documento significa GLP-1(7-37) (SEC. ID N° 1), sus análogos insulínicos y sus derivados insulínicos. Los ejemplos no limitantes de análogos de GLP-1 son GLP-1 (7-36) amida, Arg³⁴-GLP-1(7-37), Gly⁸-GLP-1 (7-37), Val⁸-GLP-1 (7-36)-amida y Val⁸Asp²²-GLP-1(7-37). Los ejemplos no limitantes de derivados de GLP-1 son desamino-His⁷, Arg²⁶, Lys³⁴(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37), desamino-His⁷, Arg²⁶, Lys³⁴(N^ε-octanoil)-GLP-1 (7-37), Arg^{26,34}, Lys³⁸(N^ε-(ω-carboxipentadecanoil)))-GLP-1(7-38), Arg^{26,34}, Lys³⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-36) y Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37).

La expresión "protegido contra la dipeptidil aminopeptidasa IV" según se usa en este documento en relación con un péptido insulínico significa un péptido insulínico que es más resistente a la peptidasa plasmática dipeptidil aminopeptidasa IV (DPP-IV) que el péptido insulínico natural. La resistencia de un péptido insulínico a la degradación por la dipeptidil aminopeptidasa IV se determina mediante el ensayo de degradación siguiente:

Se incuban alícuotas del péptido insulínico (5 nmol) a 37 °C con 1 μL de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada, correspondiente a una actividad enzimática de 5 mU, durante 10-180 minutos en 100 μL de tampón de trietilamina-HCl 0.1 M, pH 7.4. Las reacciones enzimáticas se terminan por adición de 5 μL de ácido trifluoroacético al 10%, y los productos de degradación del péptido se separan y se cuantifican usando análisis de HPLC. Un método para realizar este análisis es: las mezclas se aplican en una columna Vydac C18 de poro ancho (poros de 30 nm, partículas de 5 μm) de 250 x 4.6 mm y se eluyen a una velocidad de flujo de 1 ml/min con gradientes lineales, en etapas, de acetonitrilo en 0.1 % de ácido trifluoroacético (0% de acetonitrilo durante 3 min, 0-24% de acetonitrilo durante 17 min, 24-48% de acetonitrilo durante 1 min) según Siegel et al., Regul. Pept. 1999; 79:93-102 y Mentlein et al. Eur. J. Biochem. 1993; 214:829-35. Los péptidos y sus productos de degradación se pueden seguir por su absorbancia a 220 nm (enlaces peptídicos) o 280 nm (aminoácidos aromáticos), y se cuantifican por integración de las áreas de sus picos con relación a las de los estándares. La velocidad de hidrólisis de un péptido insulínico por la dipeptidil aminopeptidasa IV se calcula a tiempos de incubación que resulten en menos de 10% del compuesto de GLP-1 que se está hidrolizando.

El término "insulínico" según se usa en este documento por referencia a un péptido, significa la capacidad de estimular la secreción de insulina en respuesta a un mayor nivel plasmático de glucosa. Los péptidos y los compuestos insulínicos son agonistas del receptor de GLP-1. La propiedad insulínica de un compuesto se puede determinar mediante ensayos *in vitro* o *in vivo* conocidos en el área. El ensayo *in vitro* siguiente, se puede utilizar para determinar la naturaleza insulínica de un compuesto como un péptido. Preferentemente los compuestos insulínicos tienen un valor de CE₅₀ en el ensayo siguiente menor de 5 nM, incluso preferentemente valores de CE₅₀ menores de 500 pM.

Se cultivan células de riñón de hámster recién nacido (BHK) que expresan el receptor de GLP-1 humano clonado (BHK 467-12A) en medio DMEM con el agregado de 100 IU/mL de penicilina, 100 μL/mL de estreptomycin, 10% de suero fetal de ternero y 1 mg/mL de Geneticin G-418 (Life Technologies). Se preparan membranas plasmáticas por

homogeneización en tampón (Tris-HCl 10 mM, NaCl 30 mM y ditioneitol 1 mM, pH 7.4, que contiene, además, 5 mg/mL de leupeptina (Sigma), 5 mg/L de pepstatina (Sigma), 100 mg/L de bacitracina (Sigma) y 16 mg/L de aprotinina (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA)). El homogeneizado se centrifuga sobre una capa de 41% p/v de sacarosa. La banda blanca entre las dos capas se diluye en tampón y se centrifuga. Las membranas plasmáticas se almacenan a -80 °C hasta que se utilizan.

El ensayo funcional del receptor se lleva a cabo midiendo el AMPc como una respuesta a la estimulación por el péptido insulínico o el compuesto insulínico. Las incubaciones se llevan a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen total de 140 mL y con las concentraciones finales siguientes: Tris-HCl 50 mM, EGTA 1 mM, MgSO₄ 1.5 mM, ATP 1.7 mM, GTP 20 mM, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 2 mM, 0.01% p/v de Tween-20, pH 7.4. Los compuestos se disuelven y diluyen en tampón. GTP se prepara en el momento para cada experimento: se agregan 2.5 µg de membrana a cada pocillo y la mezcla se incuba durante 90 min a temperatura ambiente, en la oscuridad, con agitación. La reacción se detiene por adición de 25 mL de HCl 0.5 M. El AMPc formado se mide con un ensayo de centelleo por proximidad (RPA 542, Amersham, Reino Unido). Se grafica una curva de dosis-respuesta para el compuesto y se calcula el valor de CE₅₀ empleando el software GraphPad Prism.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica estable al almacenamiento que contiene un análogo de GLP-1 acilado y una insulina basal, un conservante farmacéuticamente aceptable, un surfactante no iónico a una concentración entre 10 mg/L y 500 mg/L, y opcionalmente un modificador de la tonicidad farmacéuticamente aceptable, donde dicha composición tiene un pH en el intervalo entre 7.0 y 8.5, donde dicho análogo de GLP-1 acilado es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))^ε-GLP-1(7-37) y dicha insulina basal es N^{εB29}-tetradecanoil des(B30) insulina humana o N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 insulina humana. Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica estable al almacenamiento que contiene un análogo de GLP-1 acilado, una insulina basal, un conservante farmacéuticamente aceptable, un surfactante no iónico a una concentración entre 10 mg/L y 500 mg/L, y opcionalmente un modificador de la tonicidad farmacéuticamente aceptable, donde dicha composición tiene un pH en el intervalo entre 7.0 y 8.5, donde dicho análogo de GLP-1 acilado es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))^ε-GLP-1(7-37) y dicha insulina basal es N^{εB29}-tetradecanoil des(B30) insulina humana o N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 insulina humana.

Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según las realizaciones anteriores, en la que la concentración del surfactante es entre 20 mg/L y 400 mg/L.

Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la concentración del surfactante es entre 20 mg/L y 300 mg/L.

Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la concentración del surfactante es entre 50 mg/L y 200 mg/L.

Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el surfactante es poloxámero 188.

Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el surfactante se elige del grupo que consiste en poloxámero 407, poloxámero 124, poloxámero 181, poloxámero 182, poloxámero 237, poloxámero 331 y poloxámero 338.

Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que el surfactante es polisorbato 20.

Una realización de la invención comprende una composición según la realización anterior, en la que dicha composición tiene un pH en el intervalo entre 7.0 y 8.5.

Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores, que contiene además un surfactante adicional.

Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según la realización anterior, en la que al menos un surfactante es un surfactante no iónico.

Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según las realizaciones anteriores, en la que dos surfactantes diferentes son surfactantes no iónicos.

Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que todos los surfactantes son surfactantes no iónicos.

- Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores, que contiene poloxámero 188 y polisorbato 20 o tween 80.
- 5 Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones previas, en la que el pH está en el intervalo entre 7.4 y 8.0.
- Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones previas, que contiene un tampón que es un tampón de fosfato.
- 10 Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores, que contiene un tampón que es un tampón zwitteriónico.
- Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según la realización anterior, en la que el tampón se elige del grupo que consiste en glicilglicina, TRIS, bicina, HEPES, MOBS, MOPS, TES y sus mezclas.
- 15 Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones previas, en la que el modificador de la tonicidad se elige del grupo que consiste en glicerol, propilenglicol y manitol.
- Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones previas, en la que el conservante se elige del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol, tiomersal y sus mezclas.
- 20 Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones previas, en la que la concentración de dicho análogo de GLP-1 acilado está en el intervalo entre 0.1 mg/ml y 25 mg/ml, en el intervalo entre 1 mg/ml y 25 mg/ml, en el intervalo entre 2 mg/ml y 15 mg/ml, en el intervalo entre 3 mg/ml y 10 mg/ml o en el intervalo entre 3 mg/ml y 5 mg/ml.
- 25 Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la concentración de dicho análogo de GLP-1 acilado en la composición farmacéutica es entre 5 µg/mL y 10 mg/mL, entre 5 µg/mL y 5 mg/mL, entre 5 µg/mL y 5 mg/mL, entre 0.1 mg/mL y 3 mg/mL o entre 0.2 mg/mL y 1 mg/mL.
- 30 Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según la realización anterior, en la que dicha insulina basal es N^{εB29}-tetradecanoil des(B30) insulina humana o N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 insulina humana.
- 35 Una realización de la invención comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones previas, en la que la concentración de dicho insulina basal está en el intervalo entre 1.6 mg/mL y 5.6 mg/mL, o entre 2.6 mg/mL y 4.6 mg/mL, o entre 3.2 mg/mL y 4.0 mg/mL.
- 40 Una realización de la invención comprende un método para la preparación de una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones previas, que consiste en disolver dicho péptido insulínico y mezclar el conservante y el modificador de la tonicidad, y finalmente mezclar la insulina basal disuelta.
- 45 Una realización de la invención comprende un método para la preparación de una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores, que consiste en disolver o suspender dicha insulina basal y mezclar el conservante y el modificador de la tonicidad, y finalmente mezclar el péptido insulínico disuelto.
- 50 Una realización de la invención comprende el uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la hiperglucemia que consiste en la administración parenteral de dicho tratamiento a un mamífero que lo necesita.
- 55 Una realización de la invención comprende el uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones anteriores para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la obesidad, la deficiencia de células beta, IGT o dislipidemia, que consiste en la administración parenteral de dicho tratamiento a un mamífero que lo necesita.
- 60 El uso de excipientes como conservantes, agentes isotónicos y surfactantes en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a Edición, 1995.
- El péptido semejante al glucagón parental se puede producir por síntesis peptídica, por ejemplo síntesis peptídica en fase sólida empleando química de t-Boc o F-Moc u otras técnicas bien establecidas. El péptido semejante al

glucagón parental también se puede producir mediante un método que consiste en cultivar una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y es capaz de expresar el polipéptido en un medio nutritivo adecuado, en las condiciones que permiten la expresión del péptido, tras lo cual se recupera el péptido resultante del cultivo.

5 El medio utilizado para el cultivo de las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para multiplicar las células huésped, como medios mínimos o complejos que contengan los complementos adecuados. Los medios adecuados se pueden adquirir a proveedores comerciales o se pueden preparar según fórmulas publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). El péptido producido por las células se puede recuperar después del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células huésped del medio por centrifugación o filtración, la precipitación de los componentes proteicos del sobrenadante o del filtrado por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, la purificación por diversos procedimientos cromatográficos, por ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad o similares, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.

15 La secuencia de ADN que codifica el péptido parental puede ser adecuadamente de origen genómico o de ADNc, obtenida por ejemplo preparando una genoteca genómica o de ADNc y detectando las secuencias de ADN que codifican todo el polipéptido o parte de éste, mediante hibridación con sondas de oligonucleótidos sintéticos de conformidad con las técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de ADN que codifica el péptido también se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ej. el método de la fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. La secuencia de ADN también se puede preparar por reacción en cadena de la polimerasa empleando cebadores específicos, por ejemplo los descritos en US 4,683,202 o Saiki et al., Science 239 (1988), 487 - 491.

20 La secuencia de ADN se puede insertar en cualquier vector que pueda ser sometido convenientemente a procedimientos de recombinación del ADN, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la cual se va a introducir. Por lo tanto, el vector puede ser un vector que se replica autónomamente, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el cromosoma o los cromosomas en los que ha sido integrado.

30 El vector es preferentemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica el péptido está unida operablemente a segmentos adicionales necesarios para la transcripción del ADN, como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que tenga actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se pueda derivar de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula huésped. Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el péptido de la invención en diversas células huésped son bien conocidos en el área, cf. por ejemplo Sambrook *et al.*, supra.

35 La secuencia de ADN que codifica el péptido también puede, si es necesario, ser conectada operablemente a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras de la transcripción y secuencias potenciadoras de la traducción. El vector recombinante de la invención puede además contener una secuencia de ADN que permita al vector replicarse en la célula huésped en cuestión.

40 El vector también puede contener un marcador seleccionable, por ejemplo un gen cuyo producto complemente un defecto en la célula huésped o uno que le confiera resistencia a un fármaco, por ej. ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

45 Para dirigir un péptido parental de la presente invención a la vía secretora de las células huésped, se debe proporcionar una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, prepro secuencia o pre secuencia) en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras se ubican comúnmente 5' respecto a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser la que normalmente se asocia al péptido o puede ser de un gen que codifica otra proteína segregada.

50 Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican el péptido de la presente, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contengan la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por los expertos en el área (cf., por ejemplo, Sambrook *et al.*, supra).

La célula huésped en la cual se introduce la secuencia de ADN o el vector recombinante puede ser cualquier célula que sea capaz de producir el péptido de la presente e incluye bacterias, levaduras, hongos y células eucariotas superiores. Los ejemplos de células huésped adecuadas conocidas y usadas en el área son, sin limitación, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* o líneas celulares BHK o CHO de mamíferos.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, los cuales, no obstante, no deben considerarse limitantes del alcance de la protección. Las características dadas a conocer en la descripción precedente y en los ejemplos siguientes pueden, tanto separadamente como en cualquier combinación de ellas, ser material para realizar la invención en sus diversas formas.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes ilustran composiciones farmacéuticas producidas según la invención.

Detemir designa la insulina basal que tiene la estructura: N^εB29-tetradecanoil des(B30) insulina humana.

Liraglutida designa un péptido insulínico que tiene la estructura: Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1(7-37).

Procedimiento general para el ensayo de fibrilación de tioflavina T (ThT):

Principio

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 firma de fluorescencia bien definida cuando se une a las fibrillas [Naiki et al. (1989) Anal. Biochem. 177, 244-249; LeVine (1999) Methods. Enzymol. 309, 274-284].

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

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

Aquí, F es la fluorescencia de ThT en el tiempo t. La constante t₀ 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 t₀ - 2τ y la constante de velocidad aparente k_{app} = 1/τ.

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 se pueden ensamblar 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.

Preparación de la muestra

Las muestras se prepararon en el momento antes de cada ensayo. La composición de cada muestra se describe en las leyendas. El pH de la muestra se ajustó al valor deseado usando cantidades apropiadas de NaOH y HClO₄ concentrados. Se agregó tioflavina T a las muestras de una solución madre en H₂O hasta una concentración final de 1 μM. Se colocaron alícuotas de las muestras de 200 μl en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Packard OptiPlate™-96, de poliestireno blanco). Por lo general, se colocaron ocho réplicas de cada muestra (que corresponden a una condición de prueba) en una columna de pocillos. La placa se selló con Scotch Pad (Qiagen).

Incubación y medición de la fluorescencia

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 Varioskan (Thermo Labsystems). La temperatura se ajustó a 37 °C. La agitación orbital se ajustó 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.

Cada corrida se inició incubando la placa a la temperatura del ensayo durante 10 min. La placa se midió cada 20 minutos durante normalmente 45 horas. Entre cada medición, la placa se agitó y se calentó como se describe.

Manipulación de los datos

5 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 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 la fibrilación entre muestras individuales de un ensayo, en vez de la comparación entre ensayos diferentes. El conjunto de datos se puede ajustar a la ecuación (1). Sin embargo, puesto que en este caso las curvas sigmoidales completas generalmente no se alcanzan durante el tiempo de la medición, el grado de fibrilación se expresa como la fluorescencia de ThT a diversos tiempos, calculada como la media de las ocho muestras y mostrada con la desviación estándar

15 Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

Ejemplo 1

20 Un ejemplo de una mezcla de una insulina basal y liraglutida podría ser una preparación de detemir 1.2 mM y liraglutida 1.2 mM en una formulación que contenga acetato de Zn 0.5 mM, tampón de fosfato de sodio 8 mM, cloruro de sodio 20 mM, fenol 60 mM y 14 mg/ml de propilenglicol a pH 7.7 con 200 ppm de polisorbato 20.

Ejemplo 2.

25 Otro ejemplo de una mezcla de una insulina basal y liraglutida podría ser una preparación de detemir 2.4 mM y liraglutida 3.0 mM en una formulación que contenga acetato de Zn 1.2 mM, tampón de fosfato de sodio 8 mM, cloruro de sodio 10 mM, fenol 20 mM, *m*-cresol 20 mM y 14 mg/ml de propilenglicol a pH 7.7 con 300 ppm de polisorbato 20.

Ejemplo 3

35 Otro ejemplo de una mezcla de una insulina basal y liraglutida podría ser una preparación de detemir 1.2 mM y liraglutida 1.67 mM en una formulación que contenga acetato de Zn 0.8 mM, tampón de glicilglicina 8 mM, cloruro de sodio 10 mM, fenol 20 mM, *m*-cresol 20 mM y 14 mg/ml de propilenglicol a pH 7.7 con 100 ppm de poloxámero 188.

Ejemplo 4

40 Otro ejemplo de una mezcla de una insulina basal y liraglutida podría ser una preparación de detemir 2.4 mM y liraglutida 1.2 mM en una formulación que contenga acetato de Zn 2.0 mM, tampón de fosfato de sodio 8 mM, cloruro de sodio 10 mM, fenol 20 mM, *m*-cresol 20 mM y 14 mg/ml de propilenglicol a pH 7.7 con 300 ppm de polisorbato 20.

Ejemplo 5

45 Mezclas de detemir 2.4 mM y liraglutida 1.2 mM en una formulación que contiene acetato de Zn 1.2 mM, glicilglicina 5 mM, cloruro de sodio 20 mM, fenol 60 mM y 14 mg/ml de propilenglicol a pH 7.7 (figura 1, diamantes) y la misma formulación pero con el agregado de 300 ppm de polisorbato 20 (tween 20). La fluorescencia de ThT se siguió mediante el procedimiento general descrito antes. Esta mezcla también se muestra con el agregado de 200 ppm de polisorbato-20 o 1000 ppm de poloxámero-188.

Ejemplo 6

55 Mezclas de detemir 2.4 mM y liraglutida 1.2 mM en una formulación que contiene acetato de Zn 1.2 mM, glicilglicina 5 mM, cloruro de sodio 20 mM, fenol 60 mM y 14 mg/ml de propilenglicol a pH 7.7 (figura 2, diamantes) y la misma formulación pero con el agregado de 300 ppm de polisorbato 20 (tween 20) a tres valores de pH diferentes, triángulos (fig. 2) a pH 7.4, cuadrados (fig. 2) a pH 7.7 y círculos (fig. 2) a pH 8.1. La fluorescencia de ThT se siguió mediante el procedimiento general descrito antes.

Ejemplo 7

60 Mezclas de detemir 2.4 mM y liraglutida 2.4 mM en una formulación que contiene acetato de Zn 1.2 mM, tampón de fosfato de sodio 8 mM, cloruro de sodio 20 mM, fenol 60 mM y 14 mg/ml de propilenglicol a pH 7.7 (figura 3, cuadrados) y la misma formulación pero con el agregado de 300 ppm de polisorbato 20 que se muestra con

símbolos de estrellas (fig. 3). La fluorescencia de ThT se siguió mediante el procedimiento general descrito antes.

Ejemplo 8

5 Mezclas de detemir 2.4 mM y liraglutida 2.4 mM en una formulación que contiene acetato de Zn 1.2 mM, tampón de fosfato de sodio 8 mM, cloruro de sodio 20 mM, fenol 60 mM y 14 mg/ml de propilenglicol a pH 7.7 (figura 4, cuadrados) y la misma formulación pero con el agregado de 2 niveles de poloxámero 188, 100 ppm que se muestran con cruces (fig. 4) y 500 ppm con triángulos (fig. 4).

La fluorescencia de ThT se siguió mediante el procedimiento general descrito antes.

10

Ejemplo 9

La formulación A consiste en: N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 insulina humana 0.6 mM, Zn²⁺ 0.3 mM (correspondiente a 3 iones de Zn²⁺ por hexámero de insulina), fenol 60 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fosfato 5 mM de pH 7.7 y liraglutida 1.2 mM. La mezcla comienza a formar fibrillas con un tiempo de retraso corto de aproximadamente una hora. Sin embargo, el agregado de 200 ppm de polisorbato-20 o 1000 ppm de poloxámero-188 prolonga el tiempo de retraso a más de 30 horas. (fig. 5).

15

Ejemplo 10

La formulación B consiste en: N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 insulina humana 0.6 mM, Zn²⁺ 0.5 mM (correspondiente a 5 iones de Zn²⁺ por hexámero de insulina), fenol 60 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fosfato 5 mM de pH 7.7 y liraglutida 1.2 mM. Se muestra la misma formulación con el agregado de 500 ppm de polisorbato-20 y de 2000 ppm de poloxámero-188 (fig 6).

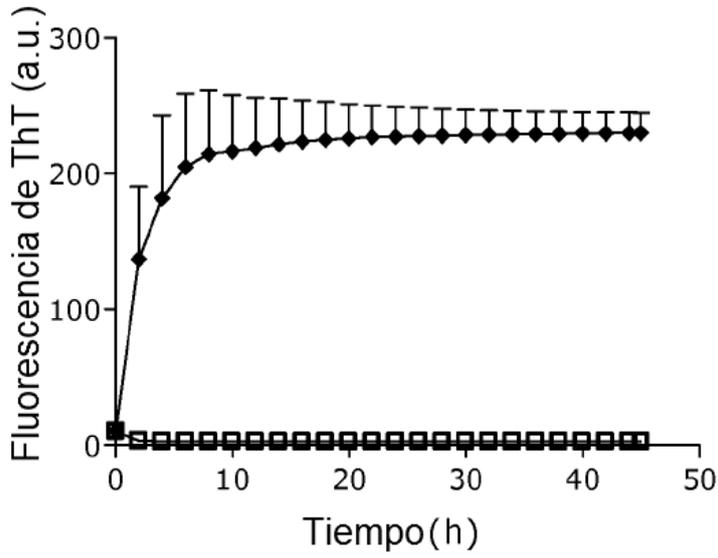
20

25

REIVINDICACIONES

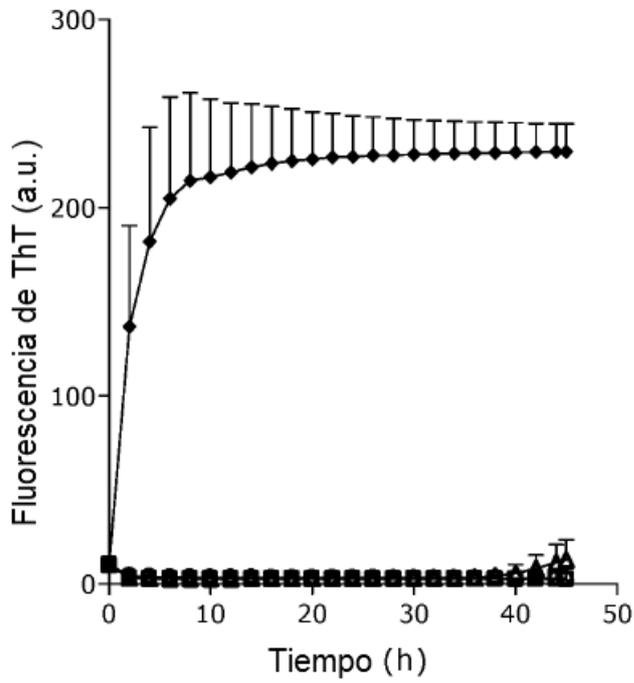
- 5 1. Una composición farmacéutica estable al almacenamiento que contiene un análogo de GLP-1 acilado y una insulina basal, un conservante farmacéuticamente aceptable, un surfactante no iónico a una concentración entre 10 mg/L y 500 mg/L, y opcionalmente un modificador de la tonicidad farmacéuticamente aceptable, donde dicha composición tiene un pH en el intervalo entre 7.0 y 8.5, donde dicho análogo de GLP-1 acilado es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))²⁹-GLP-1(7-37) y dicha insulina basal es N^{εB29}-tetradecanoil des(B30) insulina humana o N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 insulina humana.
- 10 2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el surfactante es poloxámero 188.
3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el surfactante se elige del grupo que consiste en poloxámero 407, poloxámero 124, poloxámero 181, poloxámero 182, poloxámero 237, poloxámero 331 y poloxámero 338.
- 15 4. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el surfactante es polisorbato 20.
5. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que contiene además un surfactante adicional.
- 20 6. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en la que el pH está en el intervalo entre 7.4 y 8.0.
7. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, que contiene un tampón que es un tampón de fosfato.
- 25 8. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en la que la concentración de dicho análogo de GLP-1 acilado está en el intervalo entre 0.1 mg/mL y 25 mg/mL.
- 30 9. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en la que la concentración de dicho análogo de GLP-1 acilado está en el intervalo entre 1 mg/mL y 25 mg/mL.
10. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en la que la concentración de dicha insulina basal está en el intervalo entre 1.6 mg/mL y 5.6 mg/mL.
- 35

Figura 1



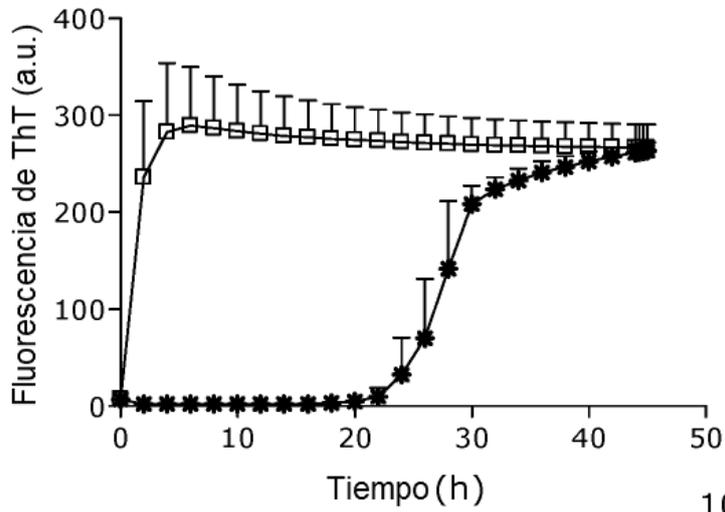
	20 h	SD	45 h	SD
◆ 0 ppm de polisorbato 20	226	25	230	15
■ + 300 ppm de polisorbato 20	3.0	0.1	2.5	0.1

Figura 2



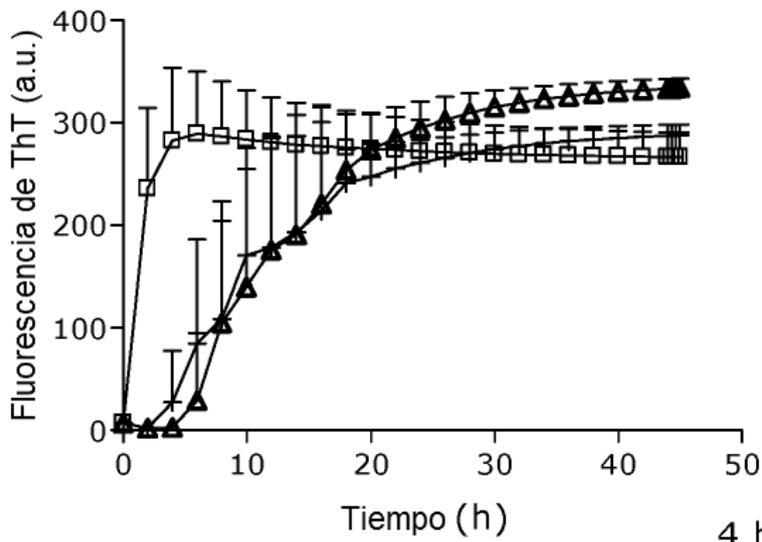
◆ 0 ppm de polisorbato 20	20 h	SD	45 h	SD
▲ + 300 de polisorbato 20 a pH 7.4	226	25	230	15
■ + 300 de polisorbato 20 a pH 7.7	3.1	0.1	13	11
◻ + 300 de polisorbato 20 a pH 8.1	3.0	0.1	2.5	0.1
○ + 300 de polisorbato 20 a pH 8.1	3.3	0.1	3.0	0.1

Figura 3



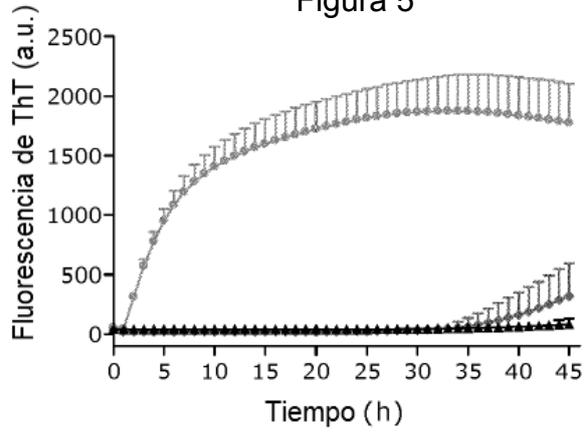
	10 h	SD	40 h	SD
—□— 0 ppm de polisorbato 20	284	48	267	25
—*— + 300 ppm de polisorbato 20	2.1	0.1	252	10

Figura 4

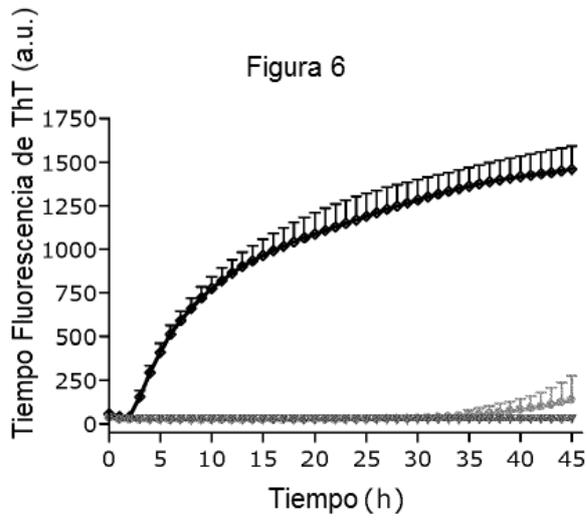


	4 h	SD	20 h	SD
—□— 0 ppm de poloxámero 188	283	71	274	32
—+— + 100 ppm de poloxámero 188	27	50	247	32
—▲— + 500 ppm de poloxámero 188	3	2	273	37

Figura 5



	10 h	SD	25 h	SD	45 h	SD
—○— Formulación A	1405	169	1816	244	1775	333
—●— Formulación A + 200 ppm de polisorbato 20	22	0	25	3	321	270
—▲— Formulación A + 1000 ppm de poloxámero 188	39	1	41	2	83	48



	10 h	SD	25 h	SD	45 h	SD
● Formulación B	775	67	1189	132	1459	133
□ Formulación B + 500 ppm de polisorbato 20	23	2	26	4	138	140
△ Formulación B + 2000 ppm de poloxámero 188	26	0	26	0	28	2