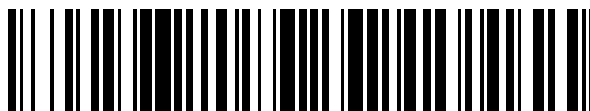


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 303**

51 Int. Cl.:

A61K 47/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2013 PCT/EP2013/057196**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13153000**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2013 E 13714303 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2836508**

54 Título: **Formulaciones de insulina**

30 Prioridad:

11.04.2012 EP 12163730
16.04.2012 US 201261624463 P
05.03.2013 EP 13157748
13.03.2013 US 201361778554 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

NAVER, HELLE;
SCHLEIN, MORTEN;
STEENSGAARD, DORTE BJERRE y
PETTERSON, INGRID VIVIKA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 594 303 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 de insulina

Campo de esta invención

5 Esta invención se refiere a formulaciones farmacéuticas de insulina que se pueden emplear para prevenir, tratar y curar la diabetes, y a aspectos relacionados con la misma de forma natural.

Antecedentes de esta invención

La insulina es una hormona polipeptídica secretada por las células β del páncreas.

10 La insulina se utiliza para el tratamiento de la diabetes y enfermedades relacionadas con la misma o que son el resultado de la misma. La insulina es esencial para mantener una regulación metabólica normal. Desde la introducción de la terapia con insulina hace 90 años, se ha salvado, prolongado y mejorado la vida de millones de pacientes con diabetes. En las últimas décadas, ha quedado de manifiesto que para un paciente diabético es extremadamente importante mantener un control estricto del nivel de glucosa en sangre.

En Prog. Biophys. Mole. Biol. 91 (2006), 199 y ss., hay una visión general de las diferentes formas de insulina.

15 Por lo general, la insulina se administra por medio de inyecciones (por vía subcutánea). En Nat. Reviews Drug Disc. 1 (2002), 529 y ss., hay una visión general de rutas alternativas para la administración de insulina.

En el documento WO 2009/115469, se mencionan análogos de insulina acilados en los que un aminoácido hidrófobo ha sido sustituido por aminoácidos hidrófilos. En el documento WO 2009/115469, no se mencionan formulaciones farmacéuticas de insulina específicas inyectables.

20 En el documento WO 2008/015099, se mencionan insulinas extendidas, PEGiladas. En el documento WO 2008/015099, no se mencionan formulaciones farmacéuticas de insulina específicas.

En resumen, el documento WO 02/067969 se refiere a formulaciones de insulina que están estabilizadas ya que contienen dos especies de insulina diferentes y, al parecer, la descripción se centra en la insulina lispro que es una de las dos especies de insulina.

25 Durante décadas, se han desarrollado y comercializado formulaciones de insulina con diferentes propiedades y esas formulaciones se han preparado utilizando una gran variedad de aditivos. Se presume que en las formulaciones comercializadas de insulina neutra, ninguna contiene insulina que esté en forma monómera.

Muchos pacientes tienen que administrarse de 2-4 inyecciones de insulina al día, por ejemplo, para el tratamiento basal y el tratamiento prandial.

30 En 2007 había 246 millones de diabéticos en el mundo. En 2025, se espera que el número ascienda a aproximadamente 380 millones.

Objetos de esta invención

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

35 Otro aspecto de esta invención se refiere a proporcionar formulaciones de insulina que tienen un contenido relativamente alto en insulina, por ejemplo, una concentración de insulina superior a aproximadamente insulina 1,5 mM, preferiblemente superior a aproximadamente insulina 3 mM, y más preferiblemente superior a aproximadamente 4 mM y una concentración inferior a aproximadamente insulina 9 mM.

Otro aspecto de esta invención se refiere a proporcionar formulaciones de insulina que tienen una estabilidad química suficiente.

40 Otro aspecto de esta invención se refiere a proporcionar formulaciones de insulina que tienen una estabilidad física suficiente.

Otro aspecto de esta invención se refiere a proporcionar formulaciones de insulina que tienen una viscosidad suficientemente baja.

45 Otro aspecto de esta invención se refiere a proporcionar formulaciones de insulina que tienen una solubilidad suficiente.

Otro aspecto de esta invención se refiere a proporcionar formulaciones de insulina que tienen un patrón de oligomerización suficientemente estable.

Otro aspecto de esta invención se refiere a proporcionar formulaciones de insulina en donde la insulina que está pre-

sente en una concentración relativamente alta, está en forma disuelta con un valor de pH de aproximadamente 6 o superior a aproximadamente 6, preferiblemente con un valor de pH de aproximadamente 6,5 o superior a aproximadamente 6,5, más preferiblemente con un valor de pH de aproximadamente 7 o superior a aproximadamente 7, incluso más preferiblemente con un valor de pH de aproximadamente 7,4 o superior a aproximadamente 7,4 e inferior a un valor de pH de aproximadamente 8,2.

Definiciones

El término "diabetes" o "diabetes mellitus" incluye la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2, la diabetes gestacional (durante el embarazo) y otras afecciones que provocan hiperglucemia. El término se utiliza para un trastorno metabólico en el que el páncreas produce una cantidad insuficiente de insulina, o en el que las células del cuerpo no responden adecuadamente a la insulina, evitando de ese modo que las células absorban la glucosa. Como resultado, la glucosa se acumula en la sangre.

La diabetes de tipo 1, también denominada diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) y diabetes de comienzo juvenil, está causada por la destrucción de las células β , lo que conduce por lo general a una carencia absoluta de insulina. La diabetes de tipo 2, también conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) y diabetes de comienzo en la edad adulta, se asocia con una resistencia predominante a la insulina y, por lo tanto, con una carencia relativa de insulina y/o un defecto predominantemente en la secreción de insulina con resistencia a la insulina.

En este documento, el término "formulación" se emplea como sinónimo del término "composición".

La fuerza iónica de una solución es una medida de la concentración de iones en esa solución. Los compuestos iónicos, cuando se disuelven en agua, se disocian en iones. La concentración total de electrolitos en solución afectará a propiedades importantes, tales como la disociación o la solubilidad de diferentes sales. Una de las principales características de una solución con iones disueltos es la fuerza iónica. La fuerza iónica (de aquí en adelante designada "I") de una solución es una función de la concentración de *todos* los iones presentes en esa solución:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

en donde c_i es la concentración molar del ion i ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), z_i es el número de carga de ese ion, y la suma se toma de todos los iones en la solución. Para un electrolito 1:1 tal como cloruro de sodio, la fuerza iónica es igual a la concentración, pero para MgSO_4 la fuerza iónica es cuatro veces mayor. Generalmente, los iones multivalentes contribuyen fuertemente a la fuerza iónica.

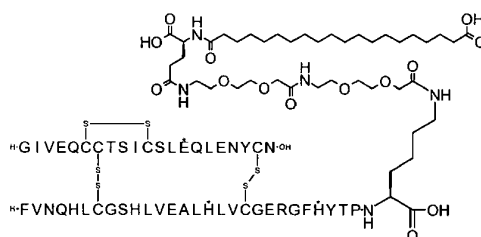
En este documento, se emplean las siguientes abreviaturas: "Ac" para acetato, " γ Glu" o "gGlu" para gamma L-glutamilo con la fórmula $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COOH})-\text{NH}-$; "HMWP" para péptidos de alto peso molecular; "OEG" para el aminoácido con la fórmula $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ correspondiente al grupo $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, también designado [2-(2-aminoetoxi)etoxi]metilcarbonylo; y "ThT" se utiliza para tioflavina T.

Descripción detallada de esta invención

Se ha encontrado de manera sorprendente que formulaciones de los derivados de insulina de acuerdo con la presente invención, cumplen muchos de los objetos anteriores. Por ejemplo, tales formulaciones son solubles y tienen un perfil farmacocinético deseado.

Los derivados de insulina que han de ser estabilizados de acuerdo con la presente invención, se seleccionan a partir del grupo que consiste en insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^E-eicosanodioil- γ Glu-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetilo)), desB30; insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^E-hexadecanodioil- γ Glu), desB30; insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^E-eicosanodioil- γ Glu), desB30; e insulina humana A14E, B25H, desB27, B29K(N^E-octadecanodioil- γ Glu), desB30.

El derivado de insulina, insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^E-eicosanodioil- γ Glu-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetilo)), desB30, también se puede designar insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^E-eicosanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30 que tiene la siguiente fórmula:



La formulación farmacéutica que contiene el derivado de insulina para uso de acuerdo con la invención comprende además de 1 a 2% (peso/peso) de glicerol; de 16 a 35 mM de fenol; de 16 a 35 mM de *m*-cresol; de 3,5 a 5,5 moles de iones de zinc por seis moles de dicho derivado de insulina; y no más de 75 mM de cloruro de sodio.

Las formulaciones farmacéuticas se pueden preparar mezclando el derivado de insulina para uso de acuerdo con la invención con fenol, *m*-cresol, iones de zinc, opcionalmente, uno o varios compuestos que proporcionan la fuerza iónica deseada y, opcionalmente, glicerol, todos en las cantidades mencionadas en esta memoria descriptiva.

5 La fuerza iónica deseada se puede obtener mediante la adición de cloruro de sodio y/o acetato de sodio, y/o TRIS (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) y/o arginina en cantidades apropiadas en las cantidades mencionadas en esta memoria descriptiva.

10 En un aspecto de la presente invención, las formulaciones farmacéuticas se pueden preparar mezclando el derivado de insulina para uso de acuerdo con la invención, con glicerol, fenol, *m*-cresol, iones de zinc y, opcionalmente, cloruro de sodio en cantidades apropiadas, y estos ingredientes pueden estar presentes en las cantidades indicadas en las reivindicaciones, preferiblemente 4,2 mM del derivado de insulina, aproximadamente 1,6% (peso/peso) de glicerol, aproximadamente 25 mM de fenol, aproximadamente 25 mM de *m*-cresol, aproximadamente 4,5 Zn/6 moles de derivado de insulina, aproximadamente 20 mM de cloruro de sodio y teniendo un valor de pH de aproximadamente 7,4.

Las formulaciones farmacéuticas se preparan de forma isotónica mediante la adición de cloruro de sodio y glicerol.

15 Dentro del campo de la insulina, es común proporcionar las cifras para la cantidad de zinc presente, como la cantidad de iones de zinc que están presentes por seis moles de la insulina o del derivado de insulina que está presente en la preparación. A veces, dichos seis moles de insulina o de derivado de insulina se refieren, de forma incorrecta, a un hexámero, a pesar de que no todas las moléculas de insulina participan en la formación de una configuración de hexámero y, en tales casos, la cantidad de zinc presente en realidad es la cantidad de iones de zinc presentes por seis moles de insulina o del derivado de insulina, independientemente de si dichas insulinas o derivados de insulina participan en la formación de una configuración de hexámero o no. Para este cálculo, no se tiene que considerar en qué forma están presentes dichos iones de zinc.

25 Es deseable que, después de la inyección de la formulación de insulina, los derivados de insulina se asocien entre sí para formar, en particular, dímeros, hexámeros, dihexámeros (dodecámeros) y multihexámeros. En esta memoria, el término multihexámeros incluye conjuntos de insulina que contienen más de 12 moléculas del derivado de insulina. Se cree que después de la inyección de la formulación de esta invención en seres humanos, los multihexámeros se disociarán debido a una difusión de los aditivos en la formulación y que los dímeros liberados se disociarán rápidamente en monómeros.

30 Un modelo de oligomerización suficiente de una formulación significa que el patrón permanece sustancialmente sin cambios, a través de la vida útil de la formulación. Además, dicha formulación puede consistir en varios componentes, es decir, dodecámero más monómero o hexámero más monómero, pero no dodecámero, hexámero, dímero más monómero y no oligómeros diferentes no especificados que varían desde dodecámeros a monómeros.

35 Las formulaciones de insulina se administran a los pacientes de una manera conocida de por sí, por ejemplo, dependiendo de los conocimientos generales del paciente combinados con los conocimientos generales del médico. Esta invención es mejor utilizarla según convenga al paciente. El modo de uso final depende por tanto de las capacidades del producto y de la disposición y las preferencias del paciente. Esto es debido al hecho de que el efecto de cualquier producto de insulina depende de la necesidad de insulina del paciente individual y de la sensibilidad a las acciones farmacodinámicas de dicha insulina y, por último, también de las preferencias del paciente en una situación dada. Estas condiciones pueden cambiar con el tiempo, tanto en términos de períodos más largos (años) como del día a día. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores que incluyen la edad, el peso corporal, la actividad física y la dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos, y de la gravedad de la afección que se va a tratar. Se recomienda que el régimen de dosificación sea determinado para cada paciente de forma individual por los expertos en la técnica de una manera similar a como se hace ahora para formulaciones conocidas de insulina.

45 Las enfermedades y afecciones que son los objetivos principales de esta invención son la diabetes mellitus (tipo 1 o 2) u otros trastornos caracterizados por hiperglucemia, pero también enfermedades metabólicas y trastornos en general, en donde los efectos metabólicos de la insulina tienen una relevancia clínica o son de interés, tales como pre-diabetes, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico, obesidad, caquexia, pérdida/muerta de células beta *in vivo*, apetito excesivo e inflamación. Todos estos tipos de trastornos son conocidos porque se benefician o se cree que se benefician de un estado metabólico estable en el sujeto que tiene la enfermedad o el trastorno.

50 Para poner en práctica esta invención, se puede administrar una preparación de insulina por vía parenteral a pacientes que requieren un tratamiento de este tipo. La administración parenteral se puede realizar mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Otras opciones son administrar la composición de insulina por vía nasal o pulmonar, preferiblemente en composiciones, polvos o líquidos, diseñados específicamente para esa finalidad.

Características preferidas de esta invención

Para resumir y complementar las afirmaciones anteriores, las características y cláusulas de esta invención son las siguientes:

1. Una formulación en la que el derivado de insulina se selecciona a partir del grupo que consiste en insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetilo)), desB30, insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^ε-hexadecanodioil-γGlu), desB30; insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^ε-eicosanodioil-γGlu), desB30; e insulina humana A14E, B25H, desB27, B29K(N^ε-octadecanodioil-γGlu), desB30, preferiblemente insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetilo)), desB30.
5
2. La formulación de acuerdo con la cláusula 1, que contiene una cantidad de un derivado de insulina que es superior a aproximadamente 1,2 mM, preferiblemente superior a aproximadamente 2,1 mM, y más preferiblemente superior a 3,8 mM.
10
3. La formulación de acuerdo con una de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de un derivado de insulina, que es inferior a aproximadamente 9 mM, preferiblemente inferior a aproximadamente 7,1 mM, y más preferiblemente inferior a aproximadamente 6 mM.
4. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene aproximadamente 2,1 mM de un derivado de insulina para uso de acuerdo con la invención.
15
5. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene aproximadamente 4,2 mM de un derivado de insulina de la fórmula general I.
6. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de glicerol en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 2% (peso/peso).
7. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene aproximadamente 1,6% (peso/peso) de glicerol.
20
8. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de fenol que es superior a aproximadamente 16, preferiblemente superior a aproximadamente 20 mM.
9. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de fenol que es inferior a aproximadamente 35 mM, preferiblemente inferior a aproximadamente 30 mM.
25
10. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene aproximadamente 25 mM de fenol.
11. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de m-cresol, que es superior a aproximadamente 16 mM, preferiblemente superior a 20.
12. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de m-cresol, que es inferior a aproximadamente 35 mM, preferiblemente inferior a aproximadamente 30 mM.
30
13. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene aproximadamente 25 mM de m-cresol.
14. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de iones de zinc por seis moles de derivado de insulina que es superior a aproximadamente 3,5, preferiblemente superior a aproximadamente 4, más preferiblemente superior a aproximadamente 4,2.
35
15. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de iones de zinc por seis moles de derivado de insulina que es inferior a aproximadamente 5,5, preferiblemente inferior a aproximadamente 5,1, más preferiblemente inferior a aproximadamente 5, y aún más preferible inferior a aproximadamente 4,8.
40
16. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene aproximadamente 4,5 iones de zinc por seis moles de derivado de insulina.
17. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que tiene una fuerza iónica superior a aproximadamente 1, preferiblemente superior a 10.
18. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que tiene una fuerza iónica inferior a aproximadamente 150 mM, preferiblemente inferior a aproximadamente 120, más preferiblemente inferior a aproximadamente 100.
45
19. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de cloruro de sodio, que es superior a aproximadamente 1 mM, preferiblemente superior a aproximadamente 10 mM.
50
20. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de cloruro de sodio, que es inferior a aproximadamente 75 mM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50

mM, más preferiblemente inferior a aproximadamente 30 mM.

21. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene aproximadamente 20 mM de cloruro de sodio.
- 5 22. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de acetato de sodio que es superior a aproximadamente 1 mM, preferiblemente superior a aproximadamente 10 mM.
23. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de acetato de sodio que es inferior a aproximadamente 150 mM, preferiblemente inferior a aproximadamente 120 mM, más preferiblemente inferior a aproximadamente 100 mM.
- 10 24. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que tiene un valor de pH que es superior a aproximadamente 6,5, preferiblemente superior a aproximadamente 6,8, más preferiblemente superior a aproximadamente 7, y aún más preferiblemente superior a aproximadamente 7,2.
25. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que tiene un valor de pH que es inferior a aproximadamente 8, preferiblemente inferior a aproximadamente 7,8, más preferiblemente inferior a aproximadamente 7,6.
- 15 26. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que tiene un valor de pH de aproximadamente 7,4.
27. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de Zn por seis moles de derivado de insulina en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 5,1, y que tiene un valor de pH en el intervalo de aproximadamente 7 a aproximadamente 8,2.
- 20 28. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene una cantidad de Zn por seis moles de derivado de insulina en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 5,1, y que tiene un valor de pH en el intervalo de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,8.
29. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene desde aproximadamente 2,1 a aproximadamente 6 mM del derivado de insulina, desde aproximadamente 3 a aproximadamente 5 iones de zinc por seis moles del derivado de insulina, y que tiene una fuerza iónica desde aproximadamente 10 a aproximadamente 100.
- 25 30. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene desde aproximadamente 2,1 a aproximadamente 6 mM del derivado de insulina, desde aproximadamente 3 a aproximadamente 5 iones de zinc por seis moles del derivado de insulina, y que tiene una fuerza iónica desde aproximadamente 20 a aproximadamente 80.
- 30 31. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene aproximadamente 4,2 mM del derivado de insulina, aproximadamente 1,6% (peso/peso) de glicerol, aproximadamente 25 mM de fenol, aproximadamente 25 mM de *m*-cresol, aproximadamente 4,5 iones de zinc por seis moles de derivado de insulina, aproximadamente 20 mM de cloruro de sodio, y que tiene un valor de pH de aproximadamente 7,4.
- 35 32. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, que contiene aproximadamente 3,8-5,2 mM del derivado de insulina, aproximadamente 1,3-1,8% (peso/peso) de glicerol, aproximadamente 22-28 mM de fenol, aproximadamente 22-28 mM de *m*-cresol, aproximadamente 3,8-5 iones de zinc por seis moles de derivado de insulina, aproximadamente 10-30 mM de cloruro de sodio, y que tiene un valor de pH de aproximadamente 7,2-8,2.
- 40 33. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, en donde una parte principal de la misma, por ejemplo, 50% (peso/peso), del derivado de insulina está en forma de monómero.
34. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, en donde el análogo de insulina para uso de acuerdo con la invención es insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^ε-hexadecanodioil-γGlu), desB30.
- 45 35. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, en donde el análogo de insulina para uso de acuerdo con la invención es insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^ε-eicosanodioil-γGlu), desB30.
36. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, en donde el análogo de insulina para uso de acuerdo con la invención es insulina humana A14E, B25H, desB27, B29K(N^ε-octadecanodioil-γGlu), desB30.
- 50 37. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, en donde el análogo de insulina para uso de acuerdo con la invención es insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-eicosanodioil-glu-

[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo)), desB30.

- 5 38. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, en donde el derivado de insulina, después de la inyección, está en una forma multihexámera o una parte principal del mismo, preferiblemente más del 50% del mismo, incluso más preferiblemente más del 75% (peso/peso) del mismo, está en forma multihexámera.
39. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas precedentes, cuyas formulaciones contienen menos del 5%, preferiblemente menos del 1%, incluso más preferiblemente menos del 0,1%, (peso/peso) de material sólido.

Ejemplo 1

Objetivo

El objetivo de este experimento era medir la estabilidad química y física como una función de la concentración de zinc en la formulación con insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-eicosanodioil-gGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo)), desB30.

Formulación

- 15 La insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-eicosanodioil-gGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo)), desB30 se disolvió en agua MilliQ hasta tener una concentración final de 26,2 mM con un valor de pH de aproximadamente 8. Se añadió fenol, cresol, cloruro de zinc (Zn) y glicerol en el orden mencionado de acuerdo con la concentración de Zn/6 insulinas (en lo sucesivo abreviado como "ins") en la tabla de abajo, proporcionando una concentración final de insulina de 7,1 mM.

- 20 **La distribución de las especies según lo observado por SEC a pH neutro, se midió utilizando el Método 1.**

La estabilidad física de las formulaciones se midió como tiempo de retardo en el ensayo de tioflavina T.

- 25 **La estabilidad química** de las formulaciones se midió como aumento de proteína de alto peso molecular (HMWP) y desamidaciones después de un almacenamiento durante dos semanas a 37°C, con respecto a la cantidad de HMWP y desamidación medida después de dos semanas de almacenamiento a 4°C. El contenido en HMWP después de dos semanas de almacenamiento a 4°C es de 0,6%. El contenido en desamidaciones después de dos semanas de almacenamiento a 4°C es de 5,4%.

HMWP se midió utilizando el método 1 de HMWP.

La formación de impurezas relacionadas con la insulina tales como desamidaciones, se midió usando cromatografía de fase inversa (UPLC).

- 30 La cantidad de desamido A21 y B3 se determinó como el área de absorbancia medida en porcentaje del área total de absorbancia determinada después de la elución de los conservantes.

Tabla 1

Insulina 7,1 mM fenol 16 mM cresol 20 mM 1,6% de glicerol pH 7,4	Dihexámeros (% del total)	Hexámero (% del total)	Oligómeros más pequeños que el hexámero (% del total)	Tiempo de retardo en horas en el ensayo THT	Formación de HMWP Aumento de HMWP después de almacenamiento a 37°C durante dos semanas. Se restan los valores a 4°C	Formación de desamidación Incremento de la desamidación después de almacenamiento a 37°C durante dos semanas. Se restan los valores a 4°C
0 Zn/6 ins	0	3	97	3	3,2	13,8
1,2 Zn/6 ins	2	62	37	6,7	1,4	4,7
2,3 Zn/6 ins	11	81	7	45	0,4	1,2
3,5 Zn/6 ins	50	41	8	45	0,4	0,9
4,7 Zn/6 ins	74	18	8	45	0,5	1,1
5,9 Zn/6 ins	53	13	33	45	0,5	1,3
7,1 Zn/6 ins	29	41	29	45	0,7	1,6

Se puede concluir lo siguiente

Basándose en la tabla anterior, se puede concluir que la oligomerización aumenta y disminuye como una función de la concentración de zinc. La mayor cantidad de hexámero está en formulaciones que contienen 2,3 Zn/6 insulinas. La mayor cantidad de dihexámeros está en formulaciones que contienen entre 3,5 Zn/6 ins y 5,9 Zn/6 ins. Un aumento de la concentración de Zn desde 5,9 Zn/6 insulinas a 7,1 Zn/6 insulinas disminuye la cantidad de dihexámeros.

La estabilidad física es óptima en una formulación que es superior a 2,3 Zn/6 ins, puesto que el tiempo de retardo en el ensayo ThT aumenta como una función de la concentración de zinc, y es óptima cuando es superior a 2,3 Zn/6 ins y la recuperación después del ensayo ThT aumenta al 100% cuando la formulación contiene 2,3 Zn/6 ins o más.

La estabilidad química aumenta como una función de la concentración de zinc; ya que la formación de HMWP es óptima en formulaciones que contienen de 2,3 Zn/6 insulinas a 5,9 Zn/6 ins. La formación de desamidación es igualmente óptima en formulaciones que contienen de 2,3 Zn/6 insulinas a 5,9 Zn/6 ins.

La oligomerización de la insulina está ligada con la estabilidad física y química de la muestra. Las formulaciones que contienen principalmente monómeros de insulina (0 y 1,2 Zn/6 ins) tienen una estabilidad física y química baja. Las formulaciones que contienen especies de dihexámeros parece que son la conformación más estable químicamente.

Ejemplo 2

Objetivo

El objetivo de este experimento era medir la estabilidad química y física como una función de la concentración de insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-eicosanodioil-gGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo)), desB30 en una formulación fija. Se ha mostrado que la estabilidad de la insulina depende del grado de oligomerización; la insulina hexámera con zinc es más estable que la insulina sin zinc (Brange y Langkjaer 1992). Puesto que la oligomerización también está impulsada por la dilución, la concentración de insulina en la muestra puede influir en la estabilidad.

Formulación

Insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-eicosanodioil-gGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo)), desB30 se disolvió en agua MilliQ hasta un valor de pH de aproximadamente 8. Se añadió fenol, cresol, cloruro de zinc (Zn) y glicerol en el orden mencionado, dando como resultado una formulación final que contenía: 4,7 Zn/6 insulinas, 1,6% de glicerol, fenol 16 mM, cresol 20 mM, NaCl 20 mM, pH, 7,4 y la concentración de insulina indicada en la tabla a continuación.

La estabilidad física de las formulaciones se midió como el tiempo de retardo en horas en el ensayo de tioflavina T (ThT) y la recuperación de insulina se midió por HPLC después del ensayo ThT de muestras recién preparadas.

La estabilidad química de las formulaciones se midió como incremento de HMWP y desamidaciones después de dos semanas de almacenamiento a 37°C, con respecto a la cantidad de HMWP y desamidación medida después de dos semanas de almacenamiento a 4°C. HMWP se midió utilizando el método 1 de HMWP. La formación de desamidación se midió utilizando cromatografía de fase inversa. El contenido en HMWP después de un almacenamiento durante dos y cinco semanas a 4°C es del 0,4-0,5%. El contenido en desamidación después de dos semanas de almacenamiento a 4°C es del 5,4%.

Tabla 2

Insulina fenol 16 mM cresol 20 mM 1,6% de glicerol 4,7 Zn/6 ins. NaCl 20 mM pH 7,4	Tiempo de retar- do en horas en el ensa- yo ThT	Formación de HMWP Incremento después de almacenamiento a 37°C durante dos semanas. Se restan los valores a 4°C	Aumento de HMWP después de almacena- miento a 30°C durante cinco semanas. Se restan los valores a 4°C	Aumento de HMWP después de almacena- miento a 37°C durante 45 días. Se restan los valores a 4°C	Formación de desamidación Incremento de la desamidación después de alma- cenamiento a 37°C durante dos semanas. Se restan los valores a 4°C	Formación de desamidación Incremento de la desamidación después de alma- cenamiento a 30°C durante dos semanas. Se restan los valores a 4°C
insulina 0,51 mM	45	0,3				
insulina 3,5 mM	45	0,5	0,6	1	1,4	1,5
insulina	45	0,3	0,5	1	1,2	1

Insulina fenol 16 mM cresol 20 mM 1,6% de glicerol 4,7 Zn/6 ins. NaCl 20 mM pH 7,4	Tiempo de retar- do en horas en el ensa- yo ThT	Formación de HMWP Incremento después de almacenamiento a 37°C durante dos semanas. Se restan los valores a 4°C	Aumento de HMWP después de almacena- miento a 30°C durante cinco semanas. Se restan los valores a 4°C	Aumento de HMWP después de almacena- miento a 37°C durante 45 días. Se restan los valores a 4°C	Formación de desamidación Incremento de la desamidación después de alma- cenamiento a 37°C durante dos semanas. Se restan los valores a 4°C	Formación de desamidación Incremento de la desamidación después de alma- cenamiento a 30°C durante dos semanas. Se restan los valores a 4°C
5,1 mM						
insulina 7,1 mM	45	0,5	0,4	1	1	1,3
Degludec	10	0,03	0,07	0,29		

Basándose en la tabla anterior, se puede concluir que la estabilidad física de las formulaciones era similar en el intervalo de concentración de insulina 0,51-7,1 mM.

- 5 La formación de HMWP es similar para la insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N⁶-eicosanodioil-gGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetilo)), desB30 en el intervalo analizado de concentración de insulina 0,51-7,1 mM después de dos semanas a 37°C. La desamidación y el desarrollo de HMWP también son similares en el intervalo de concentración de insulina 3,5 mM-7,1 mM y el intervalo de tiempo de 5 semanas a 30°C y 45 días a 37°C. Por otra parte, el desarrollo de HMWP es bajo, ya que el 1% de HMWP se forma solo en 45 días y las desamidaciones son igualmente bajas, ya que solo se forma 1-1,5% de HMWP.

10 Ejemplo 3

- El objetivo del estudio era investigar la estabilidad en condiciones de formulación que variaban el pH, NaCl y Zn como se especifica a continuación en la tabla de resultados. Las formulaciones que tenían los números 1-12 en la Tabla 3, contenían insulina 7 4,2 mM, fenol 25 mM, m-cresol 20 mM, así como los ingredientes mencionados en la Tabla 3 a continuación. El control de excipiente de NovoRapid® (formulación n° 13 en la Tabla 3) consistía en insulina aspart 600 μM, acetato de zinc 0,3 mM, NaCl 20 mM, fenol 16 mM, cresol 16 mM, 1,6% de glicerol y fosfato 7 mM (pH 7,4).

Tabla 3

Diferentes formulaciones para los experimentos en esta prueba y resultados medidos de la estabilidad física y química				
insulina 4,2 mM fenol 25 mM cresol 20 mM	Tiempo de retardo en horas medido en el ensayo de tiofla- vina T (ThT)	% de HMWP des- pués de 12 semanas a 4°C	% de HMWP después de 12 semanas a 30°C	Estabilidad química medida como % de formación de HMWP. Diferencia a las 12 semanas entre 30°C- 4°C
1) 2 Zn/6 ins, NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol, pH 6,6	7	0,6	2,4	1,8
2) 2 Zn/6 ins, NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol, pH 8,2	22	0,7	1,2	0,5
3) 2 Zn/6 ins, NaCl 75 mM, 1% de glicerol, pH 7,4	9	0,7	1,9	1,2
4) 2 Zn/6 ins, NaCl 150 mM, pH 8,2	25	0,6	1,2	0,6
5) 3 Zn/6 ins, NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol, pH 6,6	14	0,6	2,2	1,6
6) 4 Zn/6 ins, NaCl 75 mM, 1% de glicerol,	45	0,6	1,6	1

Diferentes formulaciones para los experimentos en esta prueba y resultados medidos de la estabilidad física y química				
insulina 4,2 mM fenol 25 mM cresol 20 mM	Tiempo de retardo en horas medido en el ensayo de tioflavina T (ThT)	% de HMWP después de 12 semanas a 4°C	% de HMWP después de 12 semanas a 30°C	Estabilidad química medida como % de formación de HMWP. Diferencia a las 12 semanas entre 30°C- 4°C
pH 8,2				
7) 4 Zn/6 ins, NaCl 150 mM, pH 7,4	45	0,6	1,6	1
8) 5 Zn/6 ins, NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol, pH 6,6	29	0,5	1,6	1,1
9) 5 Zn/6 ins, NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol, pH 7,4	45	0,6	1,4	0,8
10) 5 Zn/6 ins, NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol, pH 8,2	45	0,7	1,9	1,2
11) 5 Zn/6 ins, NaCl 100 mM, pH 6,6	45	0,6	2	1,4
12) 5 Zn/6 ins, NaCl 100 mM, pH 8,2	45	0,7	2,2	1,5
13) NovoRapid® control de excipiente	1	1	1,8	0,8

La conclusión a partir de las tablas anteriores es que el tiempo de retardo en ThT de la formulación se incrementa como una función del contenido en zinc y es óptimo cuando la formulación contiene más de 4 átomos de Zn por 6 moléculas de insulina. Otra conclusión es que la formación de HMWP de la insulina 7 está dentro del intervalo de NovoRapid en las formulaciones sometidas a ensayo.

Ejemplo 4

Objetivo

El objetivo de este experimento era medir la estabilidad química y física como una función de la concentración de zinc en la formulación con insulina 7, insulina 3, insulina 6, insulina 2 e insulina 8, a una concentración de insulina de 4,2 mM.

Formulación

La insulina 7, la insulina 3, la insulina 6, la insulina 2 y la insulina 7 se disolvieron en agua MilliQ hasta tener una concentración final de aproximadamente 9 mM a un valor de pH de aproximadamente 8. Se añadió fenol, cresol, acetato de zinc (Zn), cloruro de sodio y glicerol en el orden mencionado de acuerdo con la concentración de Zn/6 insulinas (en lo sucesivo abreviado como "ins") en la tabla siguiente, dando como resultado una concentración final de la insulina de insulina 4,2 mM, cloruro de sodio 20 mM, fenol 25 mM, cresol 25 mM, pH 7,4.

Tendencia a la fibrilación medida por el tiempo de retardo en ThT en horas como se ha especificado en la "sección métodos".

La estabilidad química de las formulaciones se midió como un aumento de la proteína de alto peso molecular (HMWP) aumento de impurezas relacionadas con la insulina, después de un almacenamiento durante ocho semanas (s) a 37°C con respecto a la cantidad de HMWP después de un almacenamiento a 4°C. HMWP se midió usando el método 1. En este documento, la letra "s" se utiliza como una abreviatura de semana.

Tabla 4

La cantidad de monómero se midió utilizando filtración en gel natural, Método 2.						
Insulina	hexámero de Zn	% de monómero 4°C 4 s	% de monómero 37°C 4 s	% de formación de HMWP 8 s 37°C	% de formación de impurezas 8 s 37°C	Tiempo de retardo en ThT en horas
insulina 7	3	21,7	19,7	0,8	3	4
	3,5	30,4	27,5	0,9	4	4,3
	4,5	45,4	41,4	0,9	4	6,7
	5,5	54,7	45,3	0,9	5	16
	6	58,3	47,0	0,9	4	22
insulina 3	3	2,3	1,9	1,2	2,6	45
	3,5	2,2	1,6	1,1	2,5	45
	4,5	2,4	1,4	0,8	2,5	45
	5,5	6,7	1,4	0,9	2,4	45
	6	13,1	1,3	0,9	1,1	45
insulina 6	3	2,3	2,2	1,1	4,4	9
	3,5	2,1	1,8	0,9	3,4	20,6
	4,5	3,7	1,4	0,8	2,8	45
	5,5	25,0	1,1	0,7	2,0	45
	6	33,8	1,2	0,6	1,7	45
insulina 2	3	74,0	71,1	2,1	9,2	7,3
	3,5	66,3	64,7	1,9	8,6	9,7
	4,5	58,9	57,9	1,6	7,2	13
	5,5	60,8	50,9	1,3	8,4	28,3
	6	64,1	44,6	1,2	8,8	45
insulina 8	3	2,1	2,0	0,5	4,4	6,7
	3,5	1,6	1,6	0,4	3,7	10
	4,5	2,0	1,3	0,4	2,8	45
	5,5	16,3	1,4	0,4	2,7	45
	6	17,4	1,4	0,4	2,5	45
NovoRapid				1,6	11,6	

Conclusión.

- 5 Cuando la insulina 7, la insulina 3, la insulina 6, insulina 2 y la insulina 8 se formulan como insulina 4,2 mM con zinc en el intervalo de 3 zinc/6 ins a 6 zinc/6 ins, tienen tiempos de retardo más largos en ThT, menos formación de HMWP y menos formación de impurezas que NovoRapid.

Ejemplo 5

Objetivo

- 10 El objetivo de este experimento era medir la estabilidad química y física como una función de la concentración de insulina con una concentración fija de zinc en la formulación que contenía insulina 7, insulina 3 insulina 6, insulina 2 e insulina 8. Se ha mostrado que la estabilidad de la insulina depende del grado de oligomerización; la insulina hexámera con zinc es más estable que la insulina sin zinc (Brange y Langkjaer 1992). Ya que la oligomerización también está impulsada por la dilución, la concentración de insulina en la muestra puede influir en la estabilidad.

Formulación

La insulina 7, la insulina 3, la insulina 6, la insulina 2 y la insulina 8 se disolvieron en agua MilliQ con un valor de pH de aproximadamente 8. Se añadió fenol, cresol, acetato de zinc (Zn), cloruro de sodio y glicerol en el orden mencionado, dando como resultado una formulación final que contenía: 4,5 Zn/6 insulinas, 1,6% de glicerol, fenol 25 mM, cresol 25 mM, NaCl 20 mM, pH 7,4 y la concentración de insulina indicada en la siguiente tabla.

La estabilidad química de las formulaciones se midió como un incremento de la proteína de alto peso molecular (HMWP) incremento de impurezas relacionadas con la insulina, después de un almacenamiento durante ocho semanas a 37°C con respecto a la cantidad de HMWP después de un almacenamiento a 4°C. HMWP se midió utilizando el Método 1.

La cantidad de impurezas de tipo desamidación se midió como un aumento de impurezas medido por cromatografía de fase inversa después de ocho semanas a 37°C, con respecto a la cantidad de impurezas medida después de un almacenamiento durante ocho semanas a 4°C.

Tendencia a la fibrilación medida por el tiempo de retardo en ThT en horas como se ha especificado en la "sección métodos".

Tabla 5

<u>La cantidad de monómero se midió en el Método 2 de filtración en gel natural en eluyente con fenol.</u>					
Insulina	Concentración de insulina	% de monómero a 4°C 4 s	% de HMWP formada en 8 s a 37°C	% de Pureza en 8 s a 37°C	ThT
insulina 7	2,1	80,7	0,85	7	3
	4,2	60,0	0,83	5	5,7
	8,4	25,4	0,64	4	10
insulina 3	2,1	4,1	0,49	3	45
	4,2	2,4	0,40	3	45
	8,4	1,6	0,29	3	45
insulina 6	2,1	21,7	0,42	4	38
	4,2	16,7	0,45	3	33
	8,4	3,9	0,55	2	23
insulina 2	2,1	88,8	1,27	9	13,7
	4,2	69,3	1,36	9	10
	8,4	40,3	1,32	7	6,3
insulina 8	2,1	4,4	0,40	4	45
	4,2	2,6	0,16	4	45
	8,4	1,9	0,29	3	45
NovoRapid	0,6		1,39	12	

Conclusión

Cuando la relación de zinc se fija a 4,5 Zn/6 ins, la insulina 7, la insulina 3, la insulina 6, la insulina 2 y la insulina 8 tienen mayor cantidad de monómero a una concentración más baja de insulina que una mayor. Esto se corresponde con tiempos de retardo en ThT en general más largos a concentraciones de insulina más altas y mayor estabilidad química a concentraciones de insulina más altas.

Además, la insulina 7, la insulina 3, la insulina 6, insulina 2 y la insulina 8 tienen tiempos de retardo más largos en el ensayo ThT, menor formación de HMWP y de impurezas que NovoRapid, a pesar de un contenido en monómeros de hasta el 80% cuando se analizaban por filtración en gel natural.

Ejemplo 6

Objetivo

El objetivo de este experimento era investigar la oligomerización mediante cromatografía de exclusión por tamaño como una función del contenido en NaCl en la formulación que contenía insulina 7 con insulina 4,2 mM y cantidades fijas de zinc/6 insulinas. Por otra parte, el objetivo era medir la estabilidad física y química.

Formulación

- 5 La insulina 7 se disolvió en agua MilliQ con un valor de pH de aproximadamente 8. Se añadió fenol, cresol, acetato de zinc (Zn) y glicerol en el orden mencionado, dando como resultado una formulación final que contenía: 4,5 Zn/6 insulinas, fenol 25 mM, cresol 25 mM, pH 7,4 una concentración de insulina de 4,2 mM y cloruro de sodio (NaCl), acetato de zinc y glicerol como se indica en la siguiente tabla.

La estabilidad física se evaluó mediante la medición de

- 10 **1. Tendencia a la fibrilación.** Medida por el ensayo de tioflavina T. La tendencia a la fibrilación se midió en el ensayo de tioflavina T (THT) como el tiempo de retardo hasta la fibrilación. El ensayo THT se midió como se ha descrito sobre muestras recién preparadas.

2. Radios de los oligómeros en nm y formación de agregados inferiores a 4 µm mediante dispersión de luz dinámica.

- 15 **La estabilidad química** de las formulaciones se midió como el incremento de proteína de alto peso molecular (HMWP) incremento de impurezas relacionadas con la insulina después de un almacenamiento durante cuatro semanas (4 s) a 37°C, con respecto a la cantidad de HMWP después de un almacenamiento a 4°C.

La HMWP se midió utilizando el método 2 de HMWP.

- 20 La formación de impurezas relacionadas con la insulina del tipo desamidaciones se midió utilizando cromatografía de fase inversa (UPLC)

La cantidad de monómero se midió en el Método 2 de filtración en gel natural en eluyente sin fenol.

Tabla 6

Formación de HMWP y tiempo de retardo hasta la fibrilación en el ensayo THT de la insulina 7					
Zinc/6 ins, contenido en NaCl y contenido en glicerol	% de monómero SEC sin fenol	% de monómero SEC con fenol	Formación de HMWP en % 4 s 37°C	Tiempos de retardo en THT en horas	Formación de HMWP en % 4 s 37°C
4 Zn/6 ins NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol	61	48	0,4	15,6	0,89
4 Zn/6 ins NaCl 50 mM, 1,1% de glicerol	49	33	0,39	19,2	0,8
4 Zn/6 ins NaCl 75 mM, 0,7% de glicerol	46	30	0,43	22,0	0,81
4 Zn/6 ins NaCl 120 mM	45	29	0,49	23,0	0,87
5 Zn/6 ins NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol	78	48	0,52	22,0	0,85
5 Zn/6 ins NaCl 50 mM 1,1% de glicerol	68	36	0,41	27,7	0,84

Formación de HMWP y tiempo de retardo hasta la fibrilación en el ensayo THT de la insulina 7					
Zinc/6 ins, contenido en NaCl y contenido en glicerol	% de monómero SEC sin fenol	% de monómero SEC con fenol	Formación de HMWP en % 4 s 37°C	Tiempos de retardo en THT en horas	Formación de HMWP en % 4 s 37°C
5 Zn/6 ins NaCl 75 mM 0,7% de glicerol	62	32	0,40	30,9	0,79
5 Zn/6 ins NaCl 120 mM	64	32	0,35	29,6	0,77
6 Zn/6 ins NaCl 20 mM 1,6% de glicerol	86	44	0,35	34,2	0,8
6 Zn/6 ins NaCl 50 mM 1,1% de glicerol	77	37	0,28	40,4	0,73
6 Zn/6 ins NaCl 75 mM 0,7% de glicerol	77	35	0,33	45,0	0,73
6 Zn/6 ins NaCl 120 mM	62	28	0,40	45,0	0,73
7 Zn/6 ins NaCl 20 mM 1,6% de glicerol	58	34	0,45	45,0	0,95

Conclusión

La cantidad de monómero de insulina 7 disminuye como una función de la concentración de cloruro de sodio con un gran efecto de la adición, tan solo hasta NaCl 50 mM.

- 5 La degradación química medida como formación de HMWP y formación de impurezas es baja en todas las formulaciones a pesar del contenido en monómeros.

Los tiempos de retardo en THT aumentan con el contenido en zinc y el contenido en cloruro de sodio.

Tabla 7

Promedio de los radios hidrodinámicos R_h prom. en nm e intensidad normalizada I_{norm} prom. en 10^6 cuentas/s (4°C). Nota: Las muestras no se midieron en $t = 0$.					
Insulina	Zinc/6 ins, contenido en NaCl y contenido en glicerol	R_h prom. (nm)		I_{norm} prom. (10^6 cts)	
		2 s	4 s	2 s	4 s
Degludec		1,14	1,15	1,44	1,76
NovoRapid		2,49	2,49	1,94	2,27
Insulina 7	4 Zn/6 ins NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol	2,35	2,32	7,52	7,53
	4 Zn/6 ins NaCl 50 mM, 1,1% de glicerol	2,96	3,02	14,7	16,1

Promedio de los radios hidrodinámicos R_h prom. en nm e intensidad normalizada I_{norm} prom. en 10^6 cuentas/s (4°C).					
Nota: Las muestras no se midieron en $t = 0$.					
Insulina	Zinc/6 ins, contenido en NaCl y contenido en glicerol	R_h prom. (nm)		I_{norm} prom. (10^6 cts)	
		2 s	4 s	2 s	4 s
	4 Zn/6 ins NaCl 75 mM, 0,7% de glicerol	3,41	3,49	18,0	19,5
	4 Zn/6 ins NaCl 120 mM	4,11	4,16	21,7	23,4
	5 Zn/6 ins NaCl 50 mM, 1,1% de glicerol	3,07	3,11	13,3	14,8
	5 Zn/6 ins NaCl 75 mM 0,7% de glicerol	3,39	3,49	20,0	20,1
	5 Zn/6 ins NaCl 120 mM	3,79	3,94	21,9	22,2
	6 Zn/6 ins NaCl 50 mM 1,6% de glicerol	2,90	3,03	15,6	16,7
	6 Zn/6 ins NaCl 75 mM 1,1% de glicerol	3,23	3,41	17,9	19,8
	6 Zn/6 ins NaCl 120 mM 0,7% de glicerol	3,88	3,85	24,3	23,1
	7 Zn/6 ins NaCl 20 mM 1,6% de glicerol	2,52	2,14	18,0	8,24
	5 Zn/6 ins NaCl 20 mM 1,6% de glicerol	2,18	2,28	7,85	6,56
	6 Zn/6 ins NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol	2,04	1,99	5,64	4,65

Tabla 8

Promedio de los radios hidrodinámicos R_h prom. en nm e intensidad normalizada I_{norm} prom. en 10^6 cuentas/s (37°C).					
	Zinc/6 ins, contenido en NaCl y contenido en glicerol	R_h prom. (nm)		I_{norm} prom. (10^6 cts)	
		2 s	4 s	2 s	4 s
Insulina					
Degludec		1,14	1,14	1,44	1,50
NovoRapid		2,49	2,46	1,94	1,94
Insulina 7	4 Zn/6 ins NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol	2,35	2,26	7,52	10,6
	4 Zn/6 ins NaCl 50 mM, 1,1% de glicerol	2,96	2,99	14,7	15,6
	4 Zn/6 ins NaCl 75 mM, 0,7% de glicerol	3,41	3,43	18,0	18,9
	4 Zn/6 ins NaCl 120 mM	4,11	4,03	21,7	23,0
	5 Zn/6 ins	3,07	3,02	13,3	16,4

Promedio de los radios hidrodinámicos R_h prom. en nm e intensidad normalizada I_{norm} prom. en 10^6 cuentas/s (37°C).					
	Zinc/6 ins, contenido en NaCl y contenido en glicerol	R_h prom. (nm)		I_{norm} prom. (10^6 cts)	
	NaCl 50 mM 1,1% de glicerol				
	5 Zn/6 ins NaCl 75 mM 0,7% de glicerol	3,39	3,47	20,0	19,6
	5 Zn/6 ins NaCl 120 mM	3,79	3,88	21,9	21,5
	6 Zn/6 ins NaCl 50 mM 1,6% de glicerol	2,90	2,90	15,6	15,7
	6 Zn/6 ins NaCl 75 mM 1,1% de glicerol	3,23	3,23	17,9	18,1
	6 Zn/6 ins NaCl 120 mM 0,7% de glicerol	3,88	3,87	24,3	22,4
	7 Zn/6 ins NaCl 20 mM 1,6% de glicerol	2,52	2,40	18,0	12,7
	5 Zn/6 ins NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol	2,18	2,11	7,85	10,7
	6 Zn/6 ins NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol	2,04	1,96	5,64	9,73

Conclusión

- El radio hidrodinámico se incrementa al aumentar la concentración de sal.
- La concentración de Zn tiene un impacto menor sobre el tamaño, excepto a 7 Zn por 6 Ins.
- No hay un efecto significativo sobre el tamaño de los oligómeros y la estabilidad física por la temperatura de incubación.

Ejemplo 7

Objetivo

El objetivo de este experimento era medir la estabilidad química y física en función de la concentración de cloruro de sodio y acetato de sodio en la formulación con insulina 7 4,2 mM.

Formulación

La insulina 7 se disolvió en agua MilliQ hasta una concentración final de aproximadamente 9 mM con un valor de pH de aproximadamente 8. Se añadió fenol, cresol, acetato de zinc (Zn), cloruro de sodio, acetato de sodio y glicerol en el orden mencionado, dando como resultado una formulación final que contenía: 4,5 Zn/6 insulinas, fenol 25 mM, cresol 25 mM, pH 7,4 una concentración de insulina de 4,2 mM y cloruro de sodio (NaCl), acetato sódico (NaAc) y glicerol como se indica en la siguiente tabla.

La estabilidad física se valoró mediante la medición de

3. Tendencia a la fibrilación. Medida por el ensayo de tioflavina T. La tendencia a la fibrilación se midió en el ensayo de tioflavina T (THT) como el tiempo de retardo hasta la fibrilación. El ensayo THT se midió como se ha descrito en muestras preparadas recientemente.

4. Radios de los oligómeros en nm y formación de agregados inferiores a 4 μ m mediante dispersión de luz dinámica.

La estabilidad química de las formulaciones se midió como el incremento de proteína de alto peso molecular (HMWP) incremento de impurezas relacionadas con la insulina después de un almacenamiento durante cuatro semanas (4 s) a 37°C, con respecto a la cantidad de HMWP después de un almacenamiento a 4°C.

La HMWP se midió utilizando el método 2 de HMWP.

La formación de impurezas relacionadas con la insulina del tipo desamidaciones se midió utilizando cromatografía de fase inversa (UPLC)

La cantidad de monómero se midió en el Método 2 de filtración en gel natural en eluyente con fenol

5

Tabla 9

Formación de HWMP, Formación de impurezas y tiempo de retardo hasta la fibrilación en el ensayo THT					
Insulina	Contenido en NaCl, NaAc	% de monómero SEC con fenol 4 s	Formación de impurezas 4 s 37°C	Formación de HMWP 4 s 37°C	Tiempo de retardo en THT en horas
Insulina 7	NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol	70%	5	0,65	17,3
	NaCl 50 mM, 1,24% de glicerol	68%	5	0,54	25,3
	NaCl 75 mM, 0,85% de glicerol	45%	4	0,52	27,3
	NaCl 100 mM, 0,46% de glicerol	42%	4	0,53	31,3
	NaCl 20 mM, acetato 30 mM, 1,24% de glicerol	45%	5	0,51	25,6
	NaCl 50 mM, acetato 30 mM, 0,46% de glicerol	38%	4	0,52	29,6
NovoRapid			6,6	0,95	2

Tabla 10

Promedio de los radios hidrodinámicos R_h prom, en nm e intensidad normalizada I_{norm} prom, en 10^6 cuentas/s (4°C)							
Insulina	Contenido en NaCl, NaAc	R_h prom, (nm)			I_{norm} prom, (10^6 cts)		
		0 s	4 s	8 s	0 s	4 s	8 s
NovoRapid		2,37	2,27	2,36	2,35	2,61	3,13
Insulina 7	NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol	2,04	2,00	1,99	4,17	9,91	9,71
	NaCl 50 mM, 1,24% de glicerol	3,09	2,91	2,93	7,79	15,1	13,6
	NaCl 75 mM, 0,85% de glicerol	3,52	3,37	3,42	17,8	18,2	17,6
	NaCl 100 mM, 0,46% de glicerol	3,61	3,54	3,51	18,9	19,4	17,9
	NaCl 20 mM, acetato 30 mM, 1,24% de glicerol	3,09	2,98	2,95	14,6	13,4	14,5
	NaCl 50 mM, acetato 30 mM, 0,46% de glicerol, fenol 25 mM, cresol 20 mM	3,53	3,51	3,70	17,0	17,8	19,2
	NaCl 50 mM, acetato 30 mM, 0,46% de glicerol,	3,55	3,48	3,09	10,8	16,8	17,7

Tabla 11

Promedio de los radios hidrodinámicos R_h prom. en nm e intensidad normalizada I_{norm} prom. en 10^6 cuentas/s (37°C)							
Insulina	Contenido en NaCl, NaAc	R_h prom. (nm)			I_{norm} prom. (10^6 cts)		
		0 s	4 s	8 s	0 s	4 s	8 s
NovoRapid		2,37	2,26	2,34	2,35	2,34	3,35
Insulina 7	NaCl 20 mM, 1,6% de glicerol	2,04	2,08	1,98	4,17	8,04	5,20
	NaCl 50 mM, 1,24% de glicerol	3,09	3,00	2,92	7,79	15,1	13,5
	NaCl 75 mM, 0,85% de glicerol	3,52	3,45	3,41	17,8	17,2	9,95
	NaCl 100 mM, 0,46% de glicerol	3,61	3,60	3,56	18,9	19,3	12,2
	NaCl 20 mM, acetato 30 mM, 1,24% de glicerol	3,09	3,06	2,98	14,6	16,0	15,4
	NaCl 50 mM, acetato 30 mM, 0,46% de glicerol, fenol 25 mM, cresol 20 mM	3,53	3,64	3,58	17,0	18,6	18,1
	NaCl 50 mM, acetato 30 mM, 0,46% de glicerol	3,55	3,56	3,54	10,8	18,9	17,7

Conclusión:

- El radio hidrodinámico se incrementa con el aumento de la fuerza iónica.
- Cambio muy pequeño en el tamaño y la intensidad de la dispersión a lo largo del tiempo (similar o mejor que NovoRapid)
- Ningún efecto significativo sobre el tamaño de los oligómeros y la estabilidad física por la temperatura de incubación.

Conclusión

- 10 Cuando la insulina 7 a una concentración de insulina 4,2 mM y 4,5 de zinc/6 moles de insulina se formula con un aumento de la concentración de cloruro de sodio o cloruro de sodio combinado con acetato, disminuye el contenido en monómero cuando se analiza por filtración en gel natural.

El efecto del cloruro de sodio y el acetato de sodio es similar, la fuerza iónica total disminuye la cantidad de monómeros.

15 **Ejemplo 8****Objetivo**

El objetivo de este experimento era medir la estabilidad química y física de la insulina 7 como una función de la concentración de cloruro de sodio.

Formulación

- 20 La insulina 7 se disolvió en agua MilliQ hasta un valor de pH de aproximadamente 8. Se añadió fenol, cresol, acetato de zinc (Zn) y glicerol en el orden mencionado, dando como resultado una formulación final que contenía: 4,5 Zn/6 insulinas, fenol 25 mM, cresol 25 mM, pH 7,4 y cloruro de sodio como se indica en la siguiente tabla.

La estabilidad física de las formulaciones se midió usando tres ensayos diferentes que abordaban diferentes aspectos de la estabilidad física.

- 25 1. El tiempo de retardo hasta la fibrilación se midió como tiempo de retardo en horas en el ensayo de tioflavi-

na T (ThT) y la recuperación de la insulina se midió mediante HPLC después del ensayo THT.

2. La agregación y la formación de partículas en un intervalo de tamaño inferior a 4 µm se midió mediante dispersión de luz dinámica (DLS).

5 3. La agregación y la formación de partículas en un intervalo de tamaño superior a 4 µm se midió mediante formación de imágenes por microscopía de flujo (MFI) de las formulaciones mediante una estimación de la concentración de partículas de proteína por partícula de MFI en función del tiempo de incubación y la temperatura.

10 La estabilidad química de las formulaciones se midió como un incremento de proteína de alto peso molecular (HMWP) incremento de impurezas relacionadas con insulina después de un almacenamiento durante cuatro semanas (4 s) a 37°C con respecto a la cantidad de HMWP después de un almacenamiento a 4°C.

HMWP se midió utilizando el Método 2 de HMWP.

La formación de impurezas relacionadas con la insulina de tipo desamidaciones se midió usando cromatografía de fase inversa (UPLC).

Tabla 12

Medición mediante formación de imágenes por microscopía de flujo de la formación de partículas.								
	[NaCl]	Temp	7 días	10 días	14 días	28 días	59 días	96 días
API	(mM)	(°C)	(n°/mL) (ECD> 4 µm, Cir*AR*IntSTD <70)					
NovoRapid	20	4	38	57	71	59	308	522
		30				61	54	688
		37	57	107	94	168	206	678
		45	119	80	46	126	162	1424
Insulina 7	20	4	50	27	40	46	25	21
		30				27	88	63
		37	36	101	84	48	184	38
		45	32	48	78	88	149	208
	50	4	42	75	134	61	38	
		30				117	180	
		37	36	84	90	55	157	
		45	59	71	71	161	130	
	75	4	19	36	157	52	73	61
		30				15	166	201
		37	32	48	36	40	134	61
		45	57	34	29	55	120	182

15

Tabla 13

Promedio de los radios hidrodinámicos R_h prom, en nm e intensidad normalizada I_{norm} prom, en 10^6 cuentas/s (4°C).														
Insulina	NaCl en mM	Glicerol en %	R_h prom, (nm)						I_{norm} prom, (10^6 cts)					
			0 d	5 d	10 d	2 s	4 s	8 s	0 d	5 d	10 d	2 s	4 s	8 s
NovoRapid			2,51	2,51	2,46	2,43	2,36	2,40	2,34	2,25	1,98	1,97	2,01	1,48
Insulina 7	20	1,6	2,15	2,11	2,18	2,06	2,29	2,22	6,72	9,52	9,37	1,0,9	8,51	10,2
	50	1,1	3,07	3,04	3,00	3,01	3,09	3,09	13,9	16,6	16,7	16,7	13,5	15,0
	75	0,7	3,37	3,37	3,38	3,38	3,48	3,44	18,0	18,1	19,2	19,0	19,1	18,8

Tabla 14

Promedio de los radios hidrodinámicos R_h prom. en nm e intensidad normalizada I_{norm} prom. en 10^6 cuentas/s (30°C).								
Insulina	NaCl en mM	Glicerol en %	R_h prom. (nm)			I_{norm} prom. (10^6 cts)		
			0 s	4 s	8 s	0 s	4 s	8 s
NovoRapid			2,51	2,36	2,41	2,34	1,56	1,71

Promedio de los radios hidrodinámicos R_h prom. en nm e intensidad normalizada I_{norm} prom. en 10^6 cuentas/s (30°C).								
Insulina	NaCl en mM	Glicerol en %	R_h prom. (nm)			I_{norm} prom. (10^6 cts)		
Insulina 7	20	1,6	2,15	2,13	2,22	6,72	9,07	9,16
	50	1,1	3,07	3,24	3,06	13,9	17,4	16,1
	75	0,7	3,37	3,27	3,47	18,0	17,2	18,6

Tabla 15

Promedio de los radios hidrodinámicos R_h prom. en nm e intensidad normalizada I_{norm} prom. en 10^6 cuentas/s (37°C).														
Insulina	NaCl en mM	Glicerol en %	R_h prom. (nm)						I_{norm} prom. (10^6 cts)					
			0 d	5 d	10 d	2 s	4 s	8 s	0 d	5 d	10 d	2 s	4 s	8 s
NovoRapid			2,51	2,46	2,49	2,44	2,50	2,45	2,34	2,80	1,96	1,51	2,46	2,05
Insulina 7	20	1,6	2,15	2,13	2,16	2,09	2,24	2,20	6,72	9,48	9,17	8,93	8,34	8,58
	50	1,1	3,07	3,06	3,05	3,06	3,03	3,03	13,9	15,9	16,4	16,4	16,9	13,8
	75	0,7	3,37	3,48	3,42	3,46	3,43	3,39	18,0	18,4	18,5	18,5	18,0	18,7

En esta memoria, la letra "d" es una abreviatura para días.

5

Tabla 16

Promedio de los radios hidrodinámicos R_h prom. en nm e intensidad normalizada I_{norm} prom. en 10^6 cuentas/s (45°C).														
Insulina	NaCl en mM	Glicerol en %	R_h prom. (nm)						I_{norm} prom. (10^6 cts)					
			0 d	5 d	10 d	2 s	4 s	8 s	0 d	5 d	10 d	2 s	4 s	8 s
NovoRapid			2,51	2,41	2,43	2,39			2,34	1,64	1,77	1,44		
Insulina 7	20	1,6	2,15	2,19	2,21	2,03	2,02	1,99	6,72	7,31	7,35	10,1	10,6	9,72
	50	1,1	3,07	3,02	3,02	3,06	2,81	2,93	13,9	13,4	15,6	15,9	8,61	10,7
	75	0,7	3,37	3,40	3,37	3,41	3,41	3,30	18,0	17,2	17,4	17,3	18,4	17,6

Conclusión

- Las muestras forman un oligómero cuyo tamaño depende de la concentración de sal.
- Los oligómeros se mantienen estables durante todo el experimento.
- La temperatura no afecta al tamaño de los oligómeros y a la estabilidad en las condiciones especificadas.

10

Métodos

La estabilidad química de las formulaciones se midió como un aumento de la proteína de alto peso molecular (HMWP) aumento de las impurezas relacionadas con insulina después de un almacenamiento durante ocho semanas (s) a 37°C, con respecto a la cantidad de HMWP después de un almacenamiento a 4°C.

15

Método 1 para la medición de HMWP.

HMWP se midió del modo siguiente. La determinación cuantitativa de péptido (monómero), así como el contenido en HMWP se realizó en Waters (300 x 7,8 mm, n° de pieza wat 201549) con un eluyente que contenía: L-arginina HCl 4 mM, NaCl 496 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, H₃PO₄ 5 mM, 50% (volumen/volumen) de 2-propanol con un caudal de 0,5 ml/min y 50°C. La detección se realizó con un detector de absorbancia sintonizable (Waters 486) a 276 nm. El volumen de inyección fue de 2 µl y se incluyó un patrón de insulina humana 600 µM. Se determinó la cantidad de HMWP como porcentaje del área en relación con el área total de insulina en el cromatograma.

20

Método 2 para la medición de HMWP.

HMWP se midió del modo siguiente. La determinación del contenido en HMWP en relación con el contenido en péptido monómero se realizó en Waters (150 x 4,5 mm, n° de pieza wat) con un eluyente que contenía: L-arginina HCl 4 mM, NaCl 496 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, H₃PO₄ 5 mM, 50% (volumen/volumen) de 2-propanol con un caudal de 0,5 ml/min y 50°C. La detección se realizó con un detector de absorbancia sintonizable (Waters 486) a 276 nm. Se incluyó un

25

patrón de insulina humana 600 µM. Se determinó la cantidad de HWMP como porcentaje del área en relación con el área total de insulina en el cromatograma.

La formación de impurezas relacionadas con insulina del tipo desamidaciones, se midió del modo siguiente.

Cromatografía de fase inversa (UPLC)

- 5 La determinación de las impurezas relacionadas con insulina se realizó en un sistema de UPLC utilizando una columna Phenomenex Kinetix RP C18 de 2,1 x 150 mm, tamaño de partícula de 1,7 µm con un caudal de 0,3 ml/min, a 50°C, detección a 220 nm. La elución se realizó con una fase móvil que consistía en lo siguiente: A. 10% (v/v) de acetonitrilo, hidrógeno fosfato de diamonio 0,09 M pH 3,6 B. 80% (volumen/volumen) de acetonitrilo. Gradiente: 0-7 min, lineal cambio 85%/15% de A/B hasta 74%/26% de A/B, 7-34 min lineal cambio hasta 60%/40% de A/B, 34-36 min lineal cambio hasta 20%/80% de A/B, 36-38 min gradiente isocrático hasta 20%/80% de A/B, 38-39 min lineal cambio hasta 85%/15% de A/B, 39-42 min gradiente isocrático hasta 85%/15% de A/B.

Introducción general a ensayos ThT de fibrilación para la evaluación de la estabilidad física de formulaciones de proteínas

- 15 La estabilidad física baja de un péptido puede conducir a la formación de fibrillas de amiloide, que se observan como estructuras macromoleculares de tipo filiforme bien ordenadas en la muestra, dando como resultado eventualmente la formación de un gel. Esta tradicionalmente se ha medido mediante inspección visual de la muestra. Sin embargo, ese tipo de medición es muy subjetiva y dependiente del observador. Por lo tanto, la aplicación de una pequeña sonda indicadora de molécula es mucho más ventajosa. La tioflavina T (ThT) es una sonda de este tipo y tiene una fluorescencia característica distinta cuando se une a fibrillas [Naiki et al. en Anal. Biochem. 177 (1989), 244-249; y LeVine en Methods. Enzymol. 309 (1999), 274-284].

La evolución temporal de la formación de fibrillas se puede describir por una curva sigmoidea con la siguiente expresión [Nielsen et al. en Biochemistry 40 (2001), 6036-6046]:

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

Ecuación (1)

- 25 en donde, F es la fluorescencia de ThT en el momento t. La constante t_0 es el tiempo necesario para alcanzar el 50% del máximo de fluorescencia. Los dos parámetros importantes que describen la formación de fibrillas son el tiempo de retardo calculado por $t_0 - 2\tau$ y la constante de tasa aparente $k_{ap} = 1/\tau$.

- 30 La formación de un producto intermedio del péptido parcialmente plegado se sugiere como un mecanismo iniciador general de la fibrilación. Unos pocos de esos productos intermedios forman un núcleo para constituir un molde sobre el que se pueden ensamblar más productos intermedios y se produce la fibrilación. El tiempo de retardo se corresponde con el intervalo en el que se forma la masa crítica del núcleo y la constante de tasa aparente es la tasa con la que la fibrilla misma se forma.

Preparación de la muestra

- 35 Las muestras se prepararon justo antes de cada ensayo. Cada composición de la muestra se describe en los ejemplos. El pH de la muestra se ajustó al valor deseado utilizando cantidades apropiadas de NaOH y HCl concentrado. La tioflavina T se añadió a las muestras a partir de una solución madre en H₂O hasta una concentración final de 1 µM.

Partes alícuotas de la muestra de 200 µl se colocaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Packard OptiPlate™-96, poliestireno blanco). Normalmente se colocaron cuatro (u ocho) réplicas de cada muestra (que correspondían a una condición de la prueba) en una columna de los pocillos. La placa se selló con Scotch Pad (Qiagen).

Incubación y medición de la fluorescencia

- 40 La incubación a una temperatura dada, agitando y la medición de la emisión de fluorescencia de ThT se realizaron en un lector de placas de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystems). La temperatura se ajustó a 37°C. La placa se incubó sin agitación (sin estrés físico externo) o con agitación orbital ajustada a 960 rpm con una amplitud de 1 mm. La medición de la fluorescencia se realizó utilizando excitación a través de un filtro de 444 nm y la medición de la emisión a través de un filtro de 485 nm. Cada ejecución se inició mediante incubación de la placa a la temperatura del ensayo durante 10 min. La placa se midió cada 20 minutos durante un período de tiempo deseado. Entre cada medición, la placa se agitó y se calentó como se ha descrito. El ensayo se realizó hasta 45 horas.

Medición de la concentración por HPLC: Recuperación

- 50 Después de completar el ensayo ThT, se agruparon las cuatro u ocho réplicas de cada muestra y se centrifugaron a 20.000 rpm durante 30 minutos a 18°C. El material sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y una parte alícuota se transfirió a un vial de HPLC.

La concentración de péptido en la muestra inicial y en el material sobrenadante filtrado se determinó mediante HPLC

de fase inversa usando un patrón apropiado como referencia. La fracción del porcentaje de la concentración de la muestra filtrada constituida en relación con la concentración de la muestra inicial, se refirió como recuperación.

Manejo de datos

5 Los puntos de medición se guardaron en formato Microsoft Excel para su posterior procesamiento y el dibujo de curvas y el ajuste se realizó utilizando GraphPad Prism. La emisión de fondo de ThT en ausencia de fibrillas era insignificante. Los puntos de datos son típicamente una media de cuatro u ocho muestras y se muestran con barras de error de desviación estándar. Solo los datos obtenidos en el mismo experimento (es decir, las muestras en la misma placa) se presentan en el mismo gráfico, asegurando una medida relativa de la fibrilación entre los experimentos.

10 El conjunto de datos se puede ajustar a la Ecuación (1). Sin embargo, el tiempo de retardo antes de la fibrilación se puede determinar mediante inspección visual de la curva, identificando el punto de tiempo en el que la fluorescencia de ThT aumenta significativamente por encima del nivel de fondo. Si no se observaba un aumento de la fluorescencia de ThT para ninguna de las réplicas en una muestra dentro del tiempo del ensayo de 45 horas, se asignaba un tiempo de retardo de 45 horas.

Estabilidad física medida mediante Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

15 Dispersión de luz dinámica

En la dispersión de luz dinámica, las fluctuaciones en microsegundos de la luz de láser dispersa que incide sobre una muestra acuosa, se detecta y se transforma en coeficientes de difusión (D_i) de la especie individual a través de la función denominada de autocorrelación. Por conveniencia, los coeficientes de difusión se indican normalmente en radios hidrodinámicos (R_h), suponiendo que la muestra consiste en una especie esférica. Además, a partir de los radios, se obtiene una estimación empírica del peso molecular. La dispersión de luz dinámica es un método altamente sensible, que puede determinar pequeños cambios en el tamaño, así como pequeñas cantidades de especies agregadas que no sean deseables en formulaciones farmacéuticas.

25 La intensidad estática promedio registrada por el detector también sirve como una medida general de la estabilidad física de la muestra ya que el desarrollo de especies más grandes aumenta drásticamente la intensidad de la dispersión.

Método: dispersión de luz dinámica

30 Las muestras se prepararon en tampón fosfato 20 mM pH 7,5 y tenían concentraciones de 0,9 mg/ml o 45,5 mg/ml (11,5 y 0,23 mM, respectivamente). Las mediciones se realizaron en un lector de placas Wyatt (Santa Barbara, CA) DynaPro DLS a 25°C, y las muestras se mantuvieron a 37°C entre las mediciones. Las muestras se midieron durante un máximo de dos semanas en los puntos de tiempo indicados en la Tabla 1. Las mediciones se realizaron por triplicado o quintuplicado en 25- μ l en placas de microtitulación de 384 pocillos de Corning 3540 (Corning, NY) selladas con una lámina de plástico transparente (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) con veinte adquisiciones de 10 segundos por medición. Las curvas de autocorrelación estaban ajustadas con un ajuste de regularización en Dynamics 7.1.7.16 y los coeficientes de difusión resultantes se transformaron en radios hidrodinámicos y masa molecular asumiendo una forma esférica y una relación empírica entre el tamaño y la masa. Las intensidades de la dispersión se normalizaron con respecto a la intensidad del láser y la sensibilidad del detector.

Formación de partículas superiores a 4 μ m, medida por formación de imágenes por microscopía de flujo (MFI).

40 Las soluciones se incubaron en cartuchos Penfill® a las temperaturas indicadas en la tabla. Después de los períodos de incubación indicados, los cartuchos Penfill® se vaciaron en tubos Falcon de 14 ml. Se analizó 2 x 1 ml de la muestra en el sistema de MFI5200+Bot1. La concentración de partículas similares a proteínas se midió ($ECD > 4 \mu$ m y Circulabilidad*Relación de Aspecto*IntensidadSTD <70) para eliminar por filtrado la variabilidad de Penfill® a Penfil® en la concentración de gotitas de tipo aceite de silicona.

Distribución de especies según lo observado por SEC a pH neutro.

Método 1

45 El tampón de ejecución era NaCl 150 mM, fenol 2 mM y Tris 10 mM pH 7,6. Un patrón del PM comprendía una insulina monómera (X2) (19,0 min), insulina hexámera sin disociación (Co(III)HI ("HI" es insulina humana)) (16,0 min), HSA (14,0 min) y HSA-dímero (12,5 min), se utilizó para la asignación de especies. El límite de exclusión de la columna era de 2x106 Da. La envuelta cromatográfica se integró y los dihexámeros se definieron como AUC 12,5 min - 14,3 min, los hexámeros como 14,3 min - 16,0 min y los oligómeros más pequeños que hexámeros como 16,0 min -21,0 min.

50 Método 2

Columna, BEH200, 1,7 μ m, columna 4,6 x 150 mm de Waters con flujo de 0,3 ml/min a 22°C de fenol 8 mM en el método con fenol o fenol 0 mM en el método sin fenol, NaCl 140 mM, Tris/HCl 10 mM pH 7,4. La distribución de especies es detectada por UWis y se evalúa frente a patrones del PM de proteínas correspondientes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Formulaciones de insulina

<130> 8489.000-EP

5 <160> 2

<170> Patent In versión 3.5

<210> 1
 < 211> 21
 < 212> PRT
 10 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Cadena A del análogo de insulina del ejemplo 1.

<400> 1
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
 1 5 10 15
 15 Glu Asn Tyr Cys Asn 20

<210> 2
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

20 <220>
 < 223> Cadena B del análogo de insulina del ejemplo 1.

<400> 2
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu His
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys
 20 25

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que contiene

un derivado de insulina seleccionado a partir del grupo que consiste en
 5 insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-eicosanodioil-yGlu-[2-(2-{2-(2-
 aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo)), desB30;
 insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^ε-hexadecanodioil-yGlu), desB30;
 insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^ε-eicosanodioil-yGlu), desB30; e
 insulina humana A14E, B25H, desB27, B29K(N^ε-octadecanodioil-yGlu), desB30; y
 10 de 1 a 2% (peso/peso) de glicerol; de 16 a 35 mM de fenol; de 16 a 35 mM de m-cresol; de 3,5 a 5,5 moles de iones
 de zinc por seis moles de dicho derivado de insulina; y no más de 75 mM de cloruro de sodio.

2. La formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el derivado de insulina es insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-eicosanodioil-yGlu-[2-(2-{2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilo)), desB30.

3. La formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el derivado de insulina es insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^ε-hexadecanodioil-yGlu), desB30.

15 4. La formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el derivado de insulina es insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^ε-eicosanodioil-yGlu), desB30.

5. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el derivado de insulina es insulina humana A14E, B25H, desB27, B29K(N^ε-octadecanodioil-yGlu), desB30.

20 6. La formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la cantidad de derivado de insulina es superior a 1,2 mM.

7. La formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la cantidad de derivado de insulina es superior a 2,1 mM.

8. La formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la cantidad de derivado de insulina es inferior a 9 mM.

25 9. La formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la cantidad de derivado de insulina es inferior a 7,1 mM.

10. La formulación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la cantidad de derivado de insulina es inferior a 6 mM.

11. La formulación farmacéutica según la reivindicación 1, que contiene

30 de 2,1 a 5,2 mM del derivado de insulina;
 de 0,5 a 1,8% (peso/peso) de glicerol;
 de 22 a 28 mM de fenol;
 de 22 a 28 mM de m-cresol;
 de 3,8 a 5 iones de zinc por seis moles de derivado de insulina;
 35 de 10 a 90 mM de cloruro de sodio; y
 que tiene un valor de pH de 7,2 a 8,2.

12. La formulación farmacéutica según la reivindicación 1, que contiene

40 4,2 mM del derivado de insulina;
 1,6% (peso/peso) de glicerol;
 25 mM de fenol;
 25 mM de m-cresol;
 4,5 iones de Zn por seis moles de dicho derivado de insulina;
 20 mM de cloruro de sodio; y
 que tiene un valor de pH de 7,4.

45 13. La formulación farmacéutica según la reivindicación 1, que contiene

4,2 mM del derivado de insulina;
 0,7% (peso/peso) de glicerol;
 25 mM de fenol;
 25 mM de m-cresol;
 50 4,5 iones de zinc por seis moles de derivado de insulina;
 75 mM de cloruro de sodio; y
 que tiene un valor de pH de 7,4.