

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 468**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2011 PCT/EP2011/057388**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO11141407**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2011 E 11718398 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2569002**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de complejos de insulina-zinc**

30 Prioridad:

**11.05.2010 US 333497 P**  
**10.05.2010 EP 10162368**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.05.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ANDRESEN, LENE;**  
**HANSEN, ROSA REBECCA ERRITZØE y**  
**JEPPESEN, PER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 612 468 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

Procedimiento para la preparación de complejos de insulina-zinc

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una formulación farmacéutica que contenga insulina y zinc, a la formulación farmacéutica que se puede obtener mediante el procedimiento y al uso de la formulación para el tratamiento de la diabetes.

10

## Antecedentes de la invención

La insulina es una hormona peptídica de 51 aminoácidos producida en los islotes de Langerhans en el páncreas. Su función principal, actuando como monómero, es facilitar el transporte de moléculas de glucosa a través de las membranas celulares del tejido adiposo y muscular mediante la unión a un receptor transmembrana y su activación.

15

Las formulaciones de insulina se preparan habitualmente disolviendo la insulina en un pequeño volumen de agua en condiciones ácidas. Después se agrega zinc a la formulación seguido de una neutralización y adición de conservantes como fenol y m-cresol.

20

WO 2005/012347 da a conocer derivados de la insulina que tienen una cadena lateral cargada negativamente.

WO 2007/074133 da a conocer formulaciones farmacéuticas solubles que contienen una insulina acilada y más de 4 átomos de zinc por cada 6 moléculas de insulina acilada.

25

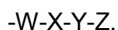
La presente invención supera los problemas del estado anterior de la técnica.

## Resumen de la invención

30

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una formulación farmacéutica que contenga un derivado de la insulina, donde el procedimiento comprende disolver un derivado de la insulina en agua, que opcionalmente contiene excipientes farmacéuticamente aceptables, para formar una solución del derivado de la insulina, ajustar el pH de la solución a un pH superior a 7.2, agregar una solución de zinc durante un período mayor a siete minutos mientras se agita continuamente y ajustar el pH al pH buscado de la formulación, y donde el derivado de la insulina comprende una molécula de insulina que tiene una cadena lateral unida al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina original, donde la cadena lateral tiene la fórmula general:

35



40

La invención se refiere además a un producto que se puede obtener mediante el procedimiento y al uso del procedimiento para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la diabetes.

## Definiciones

45

La expresión "formulación 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, conservante y modificador de la tonicidad, donde dicha formulación farmacéutica es útil para tratar, prevenir o disminuir la gravedad de una enfermedad o un trastorno mediante la administración de dicha formulación farmacéutica a una persona. Por lo tanto una formulación farmacéutica también se conoce como una composición farmacéutica.

50

Mediante "pH buscado de la formulación" se quiere dar a entender el pH que es el valor de pH deseado en la formulación farmacéutica final.

55

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

60

La expresión "derivado de la insulina" según se usa en este documento, significa una insulina original químicamente modificada o un análogo de ésta, en donde las modificaciones son en forma de uniones de amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres, PEGilaciones y similares. Un ejemplo es LysB29N $\epsilon$ -hexadecanodioil- $\gamma$ -Glu desB30 insulina humana.

60

65

La expresión "insulina humana" según se usa en este documento, significa la hormona insulina humana cuya estructura y propiedades son bien conocidas. La insulina humana tiene dos cadenas polipeptídicas, denominadas la cadena A y la cadena B. La cadena A es un péptido de 21 aminoácidos y la cadena B es un péptido de 30 aminoácidos, las dos cadenas están conectadas por puentes disulfuro: un primer puente entre la cisteína en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y un segundo puente entre la cisteína en la

posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B. Un tercer puente está presente entre las cisteínas en las posiciones 6 y 11 de la cadena A.

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

10 La expresión "péptido insulínico" según se usa en este documento, significa un péptido que es la insulina humana o un análogo o un derivado de ésta con actividad de insulina.

La expresión "insulina original" según se usa en este documento, pretende indicar una insulina antes de que se le haya aplicado cualquier modificación a la secuencia de aminoácidos.

15 La expresión "análogo de la insulina" según se usa en este documento, significa una insulina modificada en la que se sustituyeron uno o más residuos de aminoácidos de la insulina con otros residuos de aminoácidos y/o en la que se eliminaron uno o más residuos de aminoácidos de la insulina y/o en la que se añadieron y/o insertaron uno o más residuos de aminoácidos a la insulina.

20 En una realización, un análogo de la insulina contiene menos de 8 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones (incluidas inserciones) y cualquiera de sus combinaciones) en relación con la insulina original, alternativamente menos de 7 modificaciones en relación con la insulina original, alternativamente menos de 6 modificaciones en relación con la insulina original, alternativamente menos de 5 modificaciones en relación con la insulina original, alternativamente menos de 4 modificaciones en relación con la insulina original, alternativamente menos de 3 modificaciones en relación con la insulina original, alternativamente menos de 2 modificaciones en relación con la insulina original. Un ejemplo de un análogo de la insulina es AspB28 insulina humana.

25 Las modificaciones en la molécula de insulina se indican estableciendo la cadena (A o B), la posición, y el código de una o tres letras para el residuo de aminoácido que sustituye al residuo de aminoácido natural.

30 Por "desB30" o "B(1-29)" se quiere dar a entender la cadena B de una insulina natural o un análogo de ésta que carece del aminoácido B30 y "A(1-21)" significa la cadena A de la insulina natural. Por lo tanto, por ej., A21Gly, B28Asp,desB30 insulina humana es un análogo de la insulina en el que el aminoácido en la posición 21 de la cadena A está sustituido por glicina, el aminoácido en la posición 28 de la cadena B está sustituido por ácido aspártico y el aminoácido en la posición 30 de la cadena B está eliminado.

35 En este documento términos como "A1", "A2" y "A3" etc. indican el aminoácido en la posición 1, 2 y 3 etc., respectivamente, en la cadena A de la insulina (contando desde el extremo N-terminal). De manera similar, términos como B1, B2 y B3 etc. indican el aminoácido en la posición 1, 2 y 3, respectivamente, en la cadena B de la insulina (contando desde el extremo N-terminal). Empleando los códigos de una letra para los aminoácidos, términos como A21A, A21G y A21Q indican que el aminoácido en la A21 posición es A, G y Q, respectivamente. Empleando los códigos de tres letras para los aminoácidos, las expresiones correspondientes son A21Ala, A21Gly y A21Gln, respectivamente.

40 En este documento los términos "A(0)" o "B(0)" indican las posiciones de los aminoácidos N-terminalmente a A1 o B1, respectivamente. Los términos A(-1) o B(-1) indican las posiciones de los primeros aminoácidos N-terminalmente a A(0) o B(0), respectivamente. Por lo tanto A(-2) y B(-2) indican las posiciones de los aminoácidos N-terminalmente a A(-1) y B(-1), respectivamente, A(-3) y B(-3) indican las posiciones de los aminoácidos N-terminalmente a A(-2) y B(-2), respectivamente, y así sucesivamente.

45 En este documento los términos "A(0)" o "B(0)" indican las posiciones de los aminoácidos N-terminalmente a A1 o B1, respectivamente. Los términos A(-1) o B(-1) indican las posiciones de los primeros aminoácidos N-terminalmente a A(0) o B(0), respectivamente. Por lo tanto A(-2) y B(-2) indican las posiciones de los aminoácidos N-terminalmente a A(-1) y B(-1), respectivamente, A(-3) y B(-3) indican las posiciones de los aminoácidos N-terminalmente a A(-2) y B(-2), respectivamente, y así sucesivamente. Los términos A22 o B31 indican las posiciones de los aminoácidos C-terminalmente a A21 o B30, respectivamente. Los términos A23 o B32 indican las posiciones de los primeros aminoácidos C-terminalmente a A22 o B31, respectivamente. Por lo tanto A24 y B33 indican las posiciones de los aminoácidos C-terminalmente a A23 y B32, respectivamente, y así sucesivamente.

60 La expresión "sin inhibición" según se usa en este documento, significa que cuando están formuladas en una formulación tanto la insulina de acción rápida como la insulina acilada, la formulación tiene un perfil de acción idéntico o sustancialmente idéntico al perfil de acción cuando la insulina de rápida acción y la insulina acilada se administran en formulaciones separadas.

En este documento, la expresión "residuo de aminoácido" es un aminoácido del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo de un grupo carboxi y/o del cual, formalmente, se ha eliminado un átomo de hidrógeno de un grupo amino.

5 hGlu es ácido homoglutámico.

$\alpha$ -Asp es la forma L de  $-\text{HNCH}(\text{CO}-)\text{CH}_2\text{COOH}$ .

$\beta$ -Asp es la forma L de  $-\text{HNCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CO}-$ .

10  $\alpha$ -Glu es la forma L de  $-\text{HNCH}(\text{CO}-)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ .

$\gamma$ -Glu es la forma L de  $-\text{HNCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ .

15  $\alpha$ -hGlu es la forma L de  $-\text{HNCH}(\text{CO}-)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ .

$\delta$ -hGlu es la forma L de  $-\text{HNCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ .

$\beta$ -Ala es  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ .

20 Sar es sarcosina (N-metilglicina).

La expresión "un residuo de aminoácido que tiene un grupo carboxílico en la cadena lateral" indica residuos de aminoácidos como Asp, Glu y hGlu. Los aminoácidos pueden tener la configuración L o D. Si no se especifica nada se sobreentiende que el residuo de aminoácido tiene la configuración L.

La expresión "tratamiento de una enfermedad" según se usa en este documento, significa el manejo y la atención de un paciente que sufre 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 "insulina en bolo", "insulina relacionada con la ingesta" o "insulina de rápida acción" según se usa en este documento, significa un péptido insulínico que tiene un inicio inmediato de la acción y adecuado para cubrir la necesidad de insulina durante y después de una ingesta.

El término "diabetes" o "diabetes mellitus" incluye la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2, la diabetes gestacional (durante el embarazo) y otros estados que causen hiperglucemia. El término se usa para un trastorno metabólico en el que el páncreas produce cantidades insuficientes de insulina, o en el que las células del organismo no pueden responder adecuadamente a la insulina impidiendo que las células absorban la glucosa. Como resultado, la glucosa se acumula en la sangre.

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

La diabetes tipo 2, también conocida como diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNDI) y diabetes de aparición en adultos, se asocia a la resistencia predominante a la insulina y por lo tanto la deficiencia relativa de insulina y/o un defecto predominantemente secretorio de la insulina con resistencia a la insulina.

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 consisten en productos químicos tales como fosfato de sodio, TRIS, glicilglicina, acetato de sodio y citrato de sodio.

El término "conservante" según se usa en este documento, se refiere a un compuesto químico que se agrega a una formulación farmacéutica para prevenir o retrasar la actividad microbiana (crecimiento y metabolismo). Los ejemplos de conservantes farmacéuticamente aceptables son fenol, metacresol (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 formulación farmacéutica que sirve para modificar la presión osmótica de la formulación farmacéutica, de modo que la presión osmótica se vuelva próxima a la del plasma humano. Los agentes de isotonicidad incluyen cloruro de sodio, glicerol, manitol, propilenglicol, etc.

El término "estabilizante" según se usa en este documento, se refiere a productos químicos agregados a formulaciones farmacéuticas que contienen péptidos para estabilizar al péptido, es decir para aumentar la vida útil

y/o el tiempo de uso de dichas formulaciones. Los ejemplos de estabilizantes utilizados en formulaciones farmacéuticas son L-glicina, L-histidina, arginina, polietilenglicol y carboximetilcelulosa. Además, los fenoles, los iones zinc y el cloruro de sodio pueden actuar como estabilizantes.

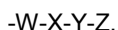
5 El término "surfactante" según se usa en este documento, se refiere a un compuesto químico en una formulación farmacéutica que sirve para modificar la interfase entre el aire y las superficies hidrófobas de manera que desplaza o desplaza parcialmente la insulina, los análogos de la insulina y los derivados de la insulina de las interfases. Se pueden emplear diversos surfactantes convencionales, como ésteres de polioxietileno de ácidos grasos y alcoholes, y ésteres de polioxietilensorbitol de ácidos grasos. Un ejemplo es polisorbato 20.

10

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una formulación farmacéutica que contenga un derivado de la insulina, donde el procedimiento comprende disolver un derivado de la insulina en agua, que  
15 opcionalmente contiene excipientes farmacéuticamente aceptables, para formar una solución del derivado de la insulina, ajustar el pH de la solución a un pH superior a 7.2, agregar una solución de zinc durante un período mayor a siete minutos mientras se agita continuamente y ajustar el pH al pH buscado de la formulación, y donde el derivado de la insulina comprende una molécula de insulina que tiene una cadena lateral unida al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina original, donde la cadena lateral tiene la fórmula general:

20



donde W es:

25 un residuo de un  $\alpha$ -aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral donde el residuo forma, con uno de sus grupos ácido carboxílico, un grupo amida junto con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina original;

Una cadena compuesta por dos, tres o cuatro residuos de  $\alpha$ -aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces carbonilamida, donde la cadena, a través de un enlace amida, está unida a un grupo  $\epsilon$ -amino de un  
30 residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina original, donde los residuos de aminoácidos de W se eligen del grupo de los residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y los residuos de aminoácidos que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral de modo que W tenga al menos un residuo de aminoácido con un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral; o

35 un enlace covalente entre X y un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina original;

X es:



40



45



50



55

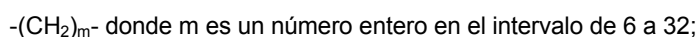
que

cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, a través de un enlace desde el carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino de W, o

60 cuando W es un enlace covalente, a través de un enlace desde el carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina original;

Y es:

65



una cadena de hidrocarburo divalente que comprende 1, 2 o 3 grupos  $-\text{CH} = \text{CH}-$  y una cantidad de grupos  $-\text{CH}_2-$  suficientes para obtener un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32; y

5 Z es:

$-\text{COOH}$ ;

10

$-\text{CO-Asp}$ ;

$-\text{CO-Glu}$ ;

$-\text{CO-Gly}$ ;

15

$-\text{CO-Sar}$ ;

$-\text{CH}(\text{COOH})_2$ ;

20

$-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ ;

$-\text{SO}_3\text{H}$ ; o

$-\text{PO}_3\text{H}$

25 y todos sus complejos de  $\text{Zn}^{2+}$ , siempre que cuando W es un enlace covalente y X es  $-\text{CO}-$ , entonces Z es diferente de  $-\text{COOH}$ .

0047] Los inventores se encontraron sorprendentemente que al elevar el pH de la solución que contenía un derivado de la insulina a un valor de pH superior a 7.2, prácticamente no había precipitación del derivado de la insulina cuando se agregaba la solución de zinc lo que significa que no se forma precipitado o si se forma precipitado entonces se vuelve a solubilizar enseguida.

30 La precipitación del derivado de la insulina en la solución se puede observar mediante inspección visual de la solución. Si el derivado de la insulina precipita en la solución, la solución se torna turbia. Cuando la solución es clara y transparente no hay precipitación o prácticamente no hay precipitación del derivado de la insulina presente.

35 En un aspecto de la invención, el agua en la que se disuelve el derivado de la insulina contiene uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables cuando el derivado de la insulina se disuelve en dicha agua. Se pueden agregar al agua diversos excipientes farmacéuticamente aceptables como fenol, m-cresol, glicerol, cloruro de sodio y opcionalmente tampones TRIS o de fosfato, para obtener una solución acuosa de excipientes, y el derivado de la insulina se disuelve en la solución acuosa.

40 En un aspecto de la invención, se agregan uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables a la solución acuosa del derivado de la insulina antes de ajustar el pH de la solución al pH buscado. En un aspecto de la invención, los excipientes farmacéuticamente aceptables se agregan a la formulación después de que se ajusta el pH buscado.

45 En un aspecto los excipientes farmacéuticamente aceptables se eligen del grupo que consiste en fenol, m-cresol, glicerol y cloruro de sodio.

50 En un aspecto de la invención el pH buscado es inferior al pH de la solución acuosa, a la que se agrega la solución de zinc.

55 En un aspecto de la invención, el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.4 cuando se agrega la solución de zinc.

En un aspecto de la invención el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.6 cuando se agrega la solución de zinc. En un aspecto de la invención el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.8 cuando se agrega la solución de zinc. En un aspecto de la invención el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 8.0 cuando se agrega la solución de zinc.

60 En un aspecto de la invención, el pH buscado está en el intervalo de 7.0 a 7.8. En un aspecto el pH buscado está en el intervalo de 7.2 a 7.8. En un aspecto el pH buscado está en el intervalo de 7.4 a 7.6.

65 En un aspecto de la invención, el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.4, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta al pH buscado en el intervalo 7.0-7.8.

En un aspecto, el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.6, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo 7.0-7.8.

En un aspecto, el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.8, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo 7.0-7.8.

En un aspecto, el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 8.0, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo 7.0-7.8.

En un aspecto, el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.2, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo 7.2-7.8.

En un aspecto, el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.4, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo 7.2-7.8.

5 En un aspecto, el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.6, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo 7.2-7.8.

En un aspecto, el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.8, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo 7.2-7.8.

10 En un aspecto, el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 8.0, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo 7.2-7.8.

En un aspecto el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.2, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo de 7.4 a 7.6.

15 En un aspecto el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.4, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo de 7.4 a 7.6.

En un aspecto el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.6, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo de 7.4 a 7.6.

En un aspecto, el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 7.8, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo 7.4-7.6.

20 En un aspecto el pH de la solución acuosa se ajusta para que sea superior a 8.0, se agrega la solución de insulina y después el pH se ajusta a un pH buscado en el intervalo de 7.4 a 7.6.

Se pueden utilizar diversos ácidos y bases para el ajuste del pH en la solución acuosa o para alcanzar el pH buscado. Los ejemplos de ácidos adecuados son ácido clorhídrico, ácido acético, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. Los ejemplos de bases adecuadas son hidróxido de sodio, TRIS, carbonatos y fosfatos. En una realización, TRIS, los carbonatos y fosfatos también actúan como tampón.

25 En un aspecto de la invención, la solución de zinc se agrega a la solución acuosa durante un período mayor de siete minutos.

30 En un aspecto de la invención, la solución de zinc contiene acetato de zinc. En un aspecto la solución de zinc se elige del grupo que consiste en acetato de zinc, cloruro de zinc, sulfato de zinc y gluconato de zinc. En un aspecto de la invención, la solución de zinc es acetato de zinc.

35 En un aspecto de la invención, la proporción de la solución de zinc respecto al derivado de la insulina soluble es entre 4.3 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina y 12 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina. En un aspecto de la invención, la proporción es entre 4.5 y 12 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina.

40 En un aspecto de la invención, la proporción es entre 4.7 y 12 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina. En un aspecto de la invención, la proporción es entre 4.9 y 12 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina. En un aspecto de la invención, la proporción es entre 5.1 y 12 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina. En un aspecto de la invención, la proporción es entre 5.3 y 12 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina. En un aspecto de la invención, la proporción es entre 5.5 y 12 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina. En un aspecto de la invención, la proporción es entre 5.7 y 12 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina. En un aspecto de la invención, la proporción es entre 5.9 y 11.5 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina. En un aspecto de la invención, la proporción es entre 6.1 y 11.0 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina. En un aspecto de la invención, la proporción es entre 6.3 y 10.5 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina. En un aspecto de la invención, la proporción es entre 6.5 y 10.0 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina.

50 En un aspecto de la invención, el derivado de la insulina es LysB29Nε-hexadecanodiol-γ-Glu desB30 insulina humana.

55 En un aspecto de la invención se agrega una insulina de rápida acción a la formulación. La insulina de rápida acción se puede elegir del grupo que consiste en AspB28 insulina humana, LysB3 GluB29 insulina humana y/o LysB28 ProB29 insulina humana. En un aspecto de la invención la insulina de rápida acción es AspB28 insulina humana (insulina Aspart).

La invención se refiere además a un producto que se puede obtener mediante el procedimiento para preparar una formulación farmacéutica que contenga un derivado de la insulina. El producto que se puede obtener mediante el procedimiento de la invención puede contener una insulina de rápida acción, como la insulina aspart y no se produce inhibición.

60 En un aspecto de la invención, se estipula el uso de un producto que se puede obtener mediante el procedimiento para preparar una formulación farmacéutica que comprenda un derivado de la insulina para el tratamiento de la diabetes.

65 En otro aspecto de la invención la formulación contiene además un conservante farmacéuticamente aceptable que se puede elegir del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y timerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato

de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorofenoxipropano-1,2-diol) o sus mezclas. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración entre 0.1 mg/ml y 20 mg/ml. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración entre 0.1 mg/ml y 5 mg/ml. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración entre 5 mg/ml y 10 mg/ml. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración entre 10 mg/ml y 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

En otro aspecto de la invención, la formulación contiene además un agente isotónico que se puede elegir del grupo que consiste en una sal (por ej. cloruro de sodio), un azúcar o un alcohol de azúcar, un aminoácido (por ej. glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ej. PEG 400), o sus mezclas. Se puede emplear cualquier azúcar como mono, di o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluidos por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de sodio. En un aspecto, el aditivo azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En un aspecto, el aditivo alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcares mencionados antes se pueden utilizar individualmente o en combinación. No existe límite fijo para la cantidad empleada, en tanto el azúcar o el alcohol de azúcar sean solubles en la preparación líquida y no afecten adversamente los efectos estabilizantes logrados utilizando los métodos de la invención. En un aspecto, la concentración de azúcar o alcohol de azúcar es entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 1 mg/ml y 50 mg/ml. En otro aspecto de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración entre 1 mg/ml y 7 mg/ml. En otro aspecto de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración entre 8 mg/ml y 24 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 25 mg/ml y 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

Los agentes isotónicos típicos son cloruro de sodio, manitol, dimetilsulfona y glicerol, y los conservantes típicos son fenol, m-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo y alcohol bencílico.

Los ejemplos de tampones adecuados son acetato de sodio, glicilglicina, HEPES ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico) y fosfato de sodio.

Las formulaciones de esta invención se pueden usar en el tratamiento de afecciones que son sensibles a la insulina. Por lo tanto, se pueden emplear en el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y la hiperglucemia, por ejemplo como se ha visto a veces en personas seriamente lesionadas y en personas que han sido sometidas a una cirugía mayor. El nivel de dosificación óptimo para cualquier paciente dependerá de diversos factores que incluyen la eficacia del derivado de la insulina específico empleado, 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 a tratar. Se recomienda que la dosis diaria de la formulación de esta invención sea determinada por los expertos para cada paciente en particular de manera similar que para las composiciones de insulina conocidas.

Cuando sea oportuno, los derivados de la insulina de esta invención se pueden usar mezclados con otros tipos de insulina, por ej. análogos de la insulina con un inicio de acción más rápido. Los ejemplos de dichos análogos de la insulina se describen por ej. en las solicitudes de patente europea que tienen las publicaciones N° 214826 (Novo Nordisk A/S), 375437 (Novo Nordisk A/S) y 383472 (Eli Lilly & Co.).

En otro aspecto, la presente invención proporcionan un producto que se puede obtener mediante el procedimiento definido en este documento. Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona el uso del procedimiento tal como se define en este documento para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la diabetes.

La presente invención se ilustra aún más mediante lo siguiente.

### Ejemplos

Ejemplo 1

Procedimiento para preparar una formulación que contenga LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana, 600 nmol/ml (100 U/ml):

Se disolvió 0.6 mmol de LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana en 300 ml de agua y se mezcló con 500 ml de una solución acuosa que contenía 16 mmol de fenol, 16 mmol de m-cresol y 213 mmol de glicerol. El



pH se ajustó a 7.40 y se agregaron 50 ml de acetato de zinc 0.01 M de manera continua mediante el uso de una bomba peristáltica mientras se agitaba a velocidad moderada. La adición se hizo en aproximadamente 30 minutos. Después de la adición del acetato de zinc, se agregó agua para inyección hasta completar 950 ml, se ajustó el pH a 7.60 y finalmente se agregó agua hasta un volumen final de 1 litro.

5

## Ejemplo 2

Procedimiento para preparar una formulación que contenga LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana, 1200 nmol/ml (200 U/ml):

10

Se disolvieron 1.2 mmol de LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana en 300 ml de agua y se mezclaron con 500 ml de una solución acuosa que contenía 16 mmol de fenol, 16 mmol de m-cresol y 213 mmol de glicerol. El pH se ajustó a 7.50 y se agregaron 110 ml de acetato de zinc 0.01 M de manera continua mediante el uso de una bomba peristáltica mientras se agitaba a velocidad moderada. La adición se hizo en aproximadamente 40 minutos. Después de la adición del acetato de zinc, se agregó agua para inyección hasta completar 950 ml, se ajustó el pH a 7.60 y finalmente se agregó agua hasta un volumen final de 1 litro.

15

## Ejemplo 3

20

Procedimiento para preparar una formulación que contenga LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana e insulina aspart 600 nmol/ml (100 U/ml):

25

Solución de LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana: se disolvió 0.42 mmol de LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana en 210 ml de agua y se mezcló con 350 ml de una solución acuosa que contenía 11.2 mmol de fenol, 11.2 mmol de m-cresol, 7 mmol de NaCl y 144 mmol de glicerol. El pH se ajustó a 7.40 y se agregaron 32.9 ml de acetato de zinc 0.01 M de manera continua mediante el uso de una bomba peristáltica mientras se agitaba a velocidad moderada. La adición se hizo en aproximadamente 30 minutos. Después de la adición de acetato de zinc, se agregó agua para inyección hasta completar 630 ml y el pH se ajustó a 7.40.

30

Solución de insulina aspart: se suspendió 0.18 mmol de insulina aspart en 15 ml de agua y se mezcló con una solución que contenía 9 ml de acetato de zinc 0.01 M y 4.8 ml de ácido clorhídrico 0.2 N para obtener una solución clara. El volumen se ajustó a 35 ml agregando agua. Después se agregaron 180 ml de una solución que contenía 4.8 mmol de fenol, 4.8 mmol de m-cresol, 3 mmol de NaCl y 62 mmol de glicerol. Finalmente se ajustó el pH a 7.40 y el volumen se ajustó a 270 ml agregando agua.

35

Mezcla de la solución de LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana y de la solución de insulina aspart: se mezclaron 630 ml de solución de LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana y 270 ml de solución de insulina aspart. El pH se ajustó a 7.40 y finalmente el volumen se ajustó a 1 litro agregando agua.

40

## Ejemplo 4

Procedimiento para preparar una formulación contenga LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana e insulina aspart, 1200 nmol/ml (200 U/ml):

45

Solución de LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana: se disolvió 0.84 mmol de LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana en 210 ml de agua y se mezcló con 350 ml de una solución acuosa que contenía 11.2 mmol de fenol, 11.2 mmol de m-cresol, 7 mmol de NaCl y 144 mmol de glicerol. El pH se ajustó a 7.40 y se agregaron 60.1 ml de acetato de zinc 0.01 M de manera continua mediante el uso de una bomba peristáltica mientras se agitaba a velocidad moderada. La adición se hizo en aproximadamente 30 minutos. Después de la adición de acetato de zinc, se agregó agua para inyección hasta completar 630 ml y el pH se ajustó a 7.40.

50

Solución de insulina aspart: se suspendió 0.36 mmol de insulina aspart en 15 ml de agua y se mezcló con una solución que contenía 18 ml de acetato de zinc 0.01 M y 4.8 ml de ácido clorhídrico 0.2 N para obtener una solución clara. El volumen se ajustó a 35 ml agregando agua. Después se agregaron 180 ml de una solución que contenía 4.8 mmol de fenol, 4.8 mmol de m-cresol, 3 mmol de NaCl y 62 mmol de glicerol. Finalmente se ajustó el pH a 7.40 y el volumen se ajustó a 270 ml agregando agua.

55

Mezcla de solución de LysB29Nε-hexadecandioil-γ-Glu desB30 insulina humana y solución de insulina aspart: se mezclaron 630 ml de solución de LysB29Nε-hexadecandioil-γ-Glu desB30 insulina humana y 270 ml de solución de insulina aspart. El pH se ajustó a 7.40 y finalmente el volumen se ajustó a 1 litro agregando agua.

60

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una formulación farmacéutica que contenga un derivado de la insulina, donde el procedimiento comprende disolver un derivado de la insulina en agua, ajustar el pH de la solución a un pH superior a 7.2, agregar una solución de zinc durante un período mayor a siete minutos mientras se agita continuamente y ajustar el pH al pH buscado de la formulación, y donde el derivado de la insulina comprende una molécula de insulina que tiene una cadena lateral unida al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina original o un análogo de ésta, donde la cadena lateral tiene la fórmula general:

-W-X-Y-Z.

donde W es:

- un residuo de un  $\alpha$ -aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral donde el residuo forma, con uno de sus grupos ácido carboxílico, un grupo amida junto con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina original;
- una cadena compuesta por dos, tres o cuatro residuos de  $\alpha$ -aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces carbonilamida, donde la cadena, a través de un enlace amida, está unida a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina original, donde los residuos de aminoácidos de W se eligen del grupo de los residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y los residuos de aminoácidos que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral de modo que W tenga al menos un residuo de aminoácido con un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral; o
- un enlace covalente entre X y un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina original;

X es:

- $\text{-}\underline{\text{C}}\text{O-}$ ;
- $\text{-CH}(\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{O-}$ ;
- $\text{-CO-N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O-}$ ;
- $\text{-CO-N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O-}$ ;
- $\text{-CO-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O-}$ ;
- $\text{-CO-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O-}$ ;
- $\text{-CO-NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}\underline{\text{C}}\text{O-}$ ;
- $\text{-CO-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O-}$ ; or
- $\text{-CO-N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O-}$ .

que

- a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, a través de un enlace desde el carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino de W, o
- b) cuando W es un enlace covalente, a través de un enlace desde el carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina original;

Y es:

- $\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{-}$  donde m es un número entero en el intervalo de 6 a 32;
- una cadena de hidrocarburo divalente que comprende 1, 2 o 3 grupos  $\text{-CH=CH-}$  y una cantidad de grupos  $\text{-CH}_2\text{-}$  suficientes para obtener un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32; y

Z es:

- $\text{-COOH}$ ;
- $\text{-CO-Asp}$ ;
- $\text{-CO-Glu}$ ;
- $\text{-CO-Gly}$ ;
- $\text{-CO-Sar}$ ;
- $\text{-CH}(\text{COOH})_2$ ;
- $\text{-N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ ;
- $\text{-SO}_3\text{H}$ ; o
- $\text{-PO}_3\text{H}$ .

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agua contiene uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde se agregan uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables a la formulación después de ajustar el pH buscado.
- 5 4. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, donde los excipientes farmacéuticamente aceptables se eligen del grupo que consiste en fenol, m-cresol, glicerol y cloruro de sodio.
5. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, donde el pH buscado es inferior al pH del agua.
- 10 6. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, donde la proporción de la solución de zinc respecto al derivado de la insulina soluble es entre 4.3 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina y 12 átomos de zinc cada 6 moléculas del derivado de la insulina.
- 15 7. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, donde el pH buscado está en el intervalo de 7.0 a 7.8.
8. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, donde la solución de zinc contiene acetato de zinc.
- 20 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, donde el derivado de la insulina es LysB29Nε-hexadecanodioil-γ-Glu desB30 insulina humana.
10. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9, donde se agrega a la solución una insulina de rápida acción.
- 25 11. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, donde la insulina de rápida acción se elige del grupo que consiste en AspB28 insulina humana, LysB3 GluB29 insulina humana y/o LysB28 ProB29 insulina humana.
12. Un producto que se puede obtener mediante el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 11.
- 30 13. El uso del producto de la reivindicación 12 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la diabetes.