

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 736**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2008** **E 13155712 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016** **EP 2597103**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas estables que comprenden liraglutida y degludec**

30 Prioridad:

16.11.2007 EP 07120880

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

18.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PLUM, ANNE;
STEENSGAARD, DORTE BJERRE;
THOMSEN, JENS KAALBY;
SCHLEIN, MORTEN;
MARCUSSEN, ANNE SOFIE KJÆR y
POULSEN, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 612 736 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

Composiciones farmacéuticas estables que comprenden liraglutida y degludec

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere al campo de las composiciones farmacéuticas. Más específicamente, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dos péptidos farmacéuticamente activos diferentes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La diabetes mellitus es un trastorno metabólico en el que se pierde parcial o completamente la capacidad de utilizar la glucosa. Desde la introducción de la insulina en la década de 1920, se han realizado esfuerzos continuos para mejorar el tratamiento de la diabetes mellitus. Dado que las personas que padecen diabetes son objeto de un tratamiento crónico durante varias décadas, existe una gran necesidad de formulaciones de insulina seguras, convenientes y que mejoren la calidad de vida.

15 En el tratamiento de la diabetes mellitus, se han sugerido y utilizado muchas variedades de formulaciones de insulina, tales como insulina regular, insulina isofánica (designada NPH), suspensiones de insulina con zinc (tales como Semilente[®], Lente[®] y Ultralente[®]) e insulina isofánica bifásica. Algunas de las formulaciones de insulina disponibles comercialmente se caracterizan por un inicio rápido de la acción y otras formulaciones tienen un inicio relativamente lento, pero muestran una acción más o menos prolongada. Las formulaciones de insulina de acción rápida son normalmente soluciones de insulina, mientras que las formulaciones de insulina de acción retardada pueden ser suspensiones que contienen insulina en forma cristalina y/o amorfa, precipitada mediante la adición de sales de zinc solas o mediante la adición de protamina o por medio de una combinación de ambas. En la última década se ha desarrollado una serie de análogos de insulina humana. Están diseñados para perfiles de acción particulares, es decir, acción rápida o prolongada.

20 Otro péptido que se espera que se vuelva muy importante en el tratamiento de la diabetes es el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1). GLP-1 humano es un péptido de 37 residuos de aminoácidos que se origina a partir de proglucagón, el cual se sintetiza, entre otros, en las células L en el íleo distal, en el páncreas y en el cerebro. GLP-1 es una hormona intestinal importante con función reguladora en el metabolismo de la glucosa y la secreción y el metabolismo gastrointestinales. GLP-1 estimula la secreción de insulina de una manera dependiente de la glucosa, estimula la biosíntesis de insulina, favorece el rescate de células beta, disminuye la secreción de glucagón, el vaciamiento gástrico y la ingesta de alimentos. Ya que la población con diabetes de tipo 2 está aumentando rápidamente a nivel mundial, existe una necesidad mucho mayor de una administración más sencilla de fármacos más eficaces. Una formulación de combinación que comprenda un péptido de insulina y un péptido GLP-1 con una relación fija de los dos agentes farmacéuticos puede ser un tratamiento muy eficaz, así como una que requiera menos inyecciones cuando se administra al mismo paciente.

35 Un tratamiento combinado de la diabetes que requiere insulina, que comprende la administración de insulina y GLP-1 se describe en el documento WO 95/31214. Una formulación mezclada previamente de compuestos de GLP-1 e insulina basal se describe en el documento WO 03/020201. Composiciones farmacéuticas estables al almacenamiento, que comprenden GLP-1, una insulina basal y tensioactivos se describen en el documento WO 2006/051103.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 La Figura 1 muestra la estabilidad física de cuatro composiciones farmacéuticas evaluadas por medio de una prueba estresada acelerada.

Las Figuras 2-4 muestran los resultados de una prueba de rotación.

Las Figuras 5-8 muestran las propiedades farmacocinéticas (PK) de formulaciones de combinación fija con el análogo de insulina, insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 y liraglutida, examinadas en cerdos.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

45 Un objeto de la presente invención es proporcionar una combinación fija una vez al día, estable al almacenamiento, de un compuesto GLP-1 y un compuesto de insulina basal con propiedades PK/PD no modificadas de los péptidos combinados, en comparación con los componentes activos individuales.

La invención se define en las reivindicaciones.

50 Más específicamente, la invención se refiere a una composición farmacéutica soluble para administración parenteral que comprende un compuesto insulínico GLP-1, un péptido de insulina basal, aditivos farmacéuticamente aceptables y zinc, en donde el contenido en zinc es desde 6 iones de Zn por 6 moléculas de insulina hasta 12 iones de Zn por 6 moléculas de insulina, en donde el compuesto insulínico GLP-1 es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) y el péptido de insulina basal es insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu)

- desB30, y en donde el pH de dicha composición farmacéutica está entre pH 7 y pH 9.
- En una realización, el contenido en zinc está entre 6 y 12 iones de zinc por 6 moléculas de insulina.
- En otra realización, el contenido en zinc está entre 6 y 10 iones de zinc por 6 moléculas de insulina.
- 5 En una realización adicional, el contenido en zinc está entre 7 y 12; 7 y 11; 7 y 10 o 7 y 9. El pH de la composición farmacéutica en cualquiera de las realizaciones anteriores será normalmente superior al neutro y estará normalmente entre 7 y 9.
- En una realización, el pH de la composición farmacéutica está entre pH 7,4 y pH 9; entre pH 7,4 y pH 8,5 o entre pH 7,4 y pH 8,2.
- 10 En otra realización, el pH de la composición farmacéutica está entre pH 7,5 y pH 8,5; entre pH 7,5 y pH 8,2 o entre 7,5 y 7,7.
- En otra realización, el pH de la composición farmacéutica es desde pH 7,6 a pH 8,2. En una realización adicional, el pH está entre 7,7 y 8,2.
- En otra realización, el pH estará entre 7,7 y 9.
- En otra realización, el pH estará entre 7,7 y 8,9.
- 15 En otra realización, el pH estará entre 7,7 y 8,8.
- En otra realización, el pH estará entre 7,7 y 8,7.
- En otra realización, el pH estará entre 7,7 y 8,6.
- En otra realización, el pH estará entre 7,7 y 8,5.
- En otra realización, el pH estará entre 7,7 y 8,4.
- 20 En otra realización, el pH estará entre 7,7 y 8,3.
- En otra realización, el pH estará entre 7,7 y 8,2.
- En otra realización, el pH estará entre 7,7 y 8,1.
- En otra realización, el pH estará entre 7,7 y 8.
- 25 La expresión "péptido GLP-1", tal como se emplea en esta memoria, significa GLP-1 (7-37), un análogo de GLP-1 (7-37), un derivado de GLP-1 (7-37) o un derivado de un análogo de GLP-1 (7-37). Los derivados de GLP-1 pueden ser compuestos GLP1 acilados tales como los descritos en los documentos WO 98/08871 o WO 2006/097537.
- En una realización, el compuesto GLP-1 es un análogo de GLP-1 acilado tal como Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1(7-37).
- En una realización, la insulina basal es insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30.
- 30 En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende una combinación fija de Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1(7-37) y una insulina basal acilada que es insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 junto con adyuvantes adecuados, farmacéuticamente aceptables cuya composición contiene entre 6 y 12; o entre 6 y 10 iones de zinc por 6 moléculas de insulina.
- 35 En una realización adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una combinación fija de Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1(7-37) e insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 junto con adyuvantes adecuados, farmacéuticamente aceptables, en donde el contenido en zinc está entre 6 y 12; 6 y 11; o entre 6 y 10 iones de zinc por 6 moléculas de insulina.
- El pH puede ser en cualquiera de las realizaciones anteriores 7,4; 7,5; 7,6; 7,8; 7,9; 8; 8,1; 8,2; 8,3; 8,4 u 8,5. En otra realización, el pH está entre 7,4 y 8,2 o entre 7,5 y 8. En aún otra realización, el pH está entre 7,6 y 8.
- 40 Un aspecto adicional de la presente descripción se relaciona con un método para la preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende disolver dicha insulina basal y mezclarla por adición con un conservante y un modificador de la isotonicidad, a continuación, añadir zinc y finalmente mezclar por adición con el péptido insulínico disuelto.
- 45 En una realización, el método comprende las siguientes etapas: 1) disolver la insulina basal en una solución acuosa tampón y un agente de isotonicidad, 2) añadir zinc, opcionalmente por etapas, 3) ajustar el pH, 4) almacenar la solu-

ción a una temperatura entre aproximadamente 4-5°C y a temperatura ambiente y 5) añadir el compuesto GLP-1.

En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un método para el tratamiento de la hiperglucemia que comprende la administración parenteral de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, a un mamífero que requiere tal tratamiento.

5 En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un método para el tratamiento de la obesidad, la deficiencia de células beta, IGT o dislipidemia, que comprende la administración parenteral de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores a un mamífero que requiere tal tratamiento.

10 Otro aspecto de la presente descripción se refiere al uso de una composición farmacéutica estable al almacenamiento que comprende una mezcla de un compuesto insulínico GLP-1 y una insulina basal, cuya composición contiene al menos 6 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina, para el tratamiento de la hiperglucemia mediante administración parenteral.

15 En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para la reducción de peso que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una mezcla de un compuesto insulínico GLP-1 y una insulina basal, cuya composición contiene al menos 6 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

20 Esta invención se refiere a la administración de una mezcla fija de una insulina basal y un compuesto insulínico GLP-1 a pacientes con diabetes de tipo 2. Cuando un compuesto GLP-1 y una insulina basal se combinan en una única formulación, los pacientes se ahorran una inyección en comparación con las dos inyecciones independientes, requeridas para la administración de los dos componentes de forma separada y, lo más importante, se espera una serie de efectos sinérgicos positivos cuando se administra un análogo de insulina basal y un compuesto GLP-1 al mismo tiempo.

25 En una mezcla de este tipo, el componente activo individual, la insulina basal y el compuesto GLP-1, deben conservar su perfil PK atractivo, conocido a partir del mono tratamiento. Por ejemplo, el análogo de insulina basal, insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 tiene un perfil atractivo, adecuado para la administración una vez al día. Del mismo modo, el análogo de GLP-1, Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) se administra una vez al día. Por lo tanto, la combinación de insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 y liraglutida constituye una combinación atractiva de un análogo de insulina basal y un análogo de GLP-1.

30 Sin embargo, la mezcla inmediata de análogos de insulina acilados, tales como insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 con un compuesto GLP-1 tal como Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) da como resultado en ambos una formulación menos estable físicamente y con propiedades PK alteradas de la insulina acilada. Sin embargo, una formulación comercial tiene que tener una estabilidad física elevada. Además, si las propiedades PK de la insulina basal se alteran demasiado, se puede producir una pérdida de su alcance de 24 horas.

35 La mayoría de las insulinas basales se pueden formular con zinc para tener una PK y estabilidad física satisfactorias. Por ejemplo, se ha observado que la insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 es capaz de unir-se a más de los tradicionales 2-3 iones de zinc por 6 de insulina. Para que la insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 tenga un perfil óptimo una vez al día, son necesarios 2-3 iones de zinc adicionales (un total de 5-6 iones de zinc por 6 moléculas de insulina).

40 Se ha encontrado que Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) tiene una unión al zinc de baja afinidad y que tanto la inestabilidad física como las propiedades PK de la insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 están influidas por ello en una mezcla de los dos componentes. En una mezcla de Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) e insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30, es por la unión a estos iones de zinc adicionales por la que Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) compite con la insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30.

45 Se ha encontrado que la adición de más iones de zinc a la mezcla de insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 con Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) mejora la estabilidad física y mejora el perfil PK de la insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 frente al perfil deseado obtenido con 5-6 iones de zinc por molécula de insulina para la insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 sola.

50 La expresión "compuesto GLP-1", tal y como se emplea en esta memoria, significa GLP-1 (7-37), análogos insulínicos del mismo y derivados insulínicos del mismo. Los compuestos GLP-1 también incluyen compuestos de exendina tales como la exendina-3 y la exendina-4 y análogos de las mismas, tales como ZP10 o ZP10A que es un análogo de exendina-4 con 6 residuos de lisina añadidos al extremo C-terminal de la molécula, véase Cristian Thorildsen et al., The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol 307, nº 2 (2003), 490-496.

55 Se utiliza un sistema simple para describir fragmentos y análogos de GLP-1. Así, por ejemplo, Gly⁸-GLP-1(7-37)

- designa un análogo de GLP-1 (7-37) obtenido formalmente a partir de GLP-1 (7-37), sustituyendo el residuo de aminoácido de origen natural en la posición 8 (Ala), por Gly. Del mismo modo, Lys³⁴(N^ε-tetradecanoil)-GLP-1(7-37) designa GLP-1 (7-37) en donde el grupo amino ε del residuo Lys en la posición 34, ha sido tetradecanoilado. Los documentos de publicaciones PCT WO 98/08871 y WO 99/43706 describen derivados estables de análogos de GLP-1, que tienen un sustituyente lipófilo. Estos derivados estables de análogos de GLP-1 tienen un perfil de acción prolongada, en comparación con los correspondientes análogos de GLP-1.
- El término "insulinotrópico", tal y como se utiliza en esta memoria, haciendo referencia a un péptido o a un compuesto, significa la capacidad de estimular la secreción de insulina como respuesta a un nivel de glucosa en plasma incrementado. Los péptidos y los compuestos insulinotrópicos son agonistas del receptor de GLP-1. La propiedad insulinotrópica de un compuesto se puede determinar por ensayos *in vitro* o *in vivo*, conocidos en la técnica.
- La concentración del compuesto GLP-1 en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede estar entre aproximadamente 1 y 25, entre 2 y 15, entre 2 y 10, entre 2 y 8 o entre 2 y 6 mg/mL.
- La concentración de la insulina basal estará entre 1 y 25, entre 1,5 y 15, entre 1,5 y 12; entre 1,5 y 8; entre 2 y 15, entre 2 y 10, entre 2 y 8; entre 2 y 7; y entre 3 y 6 mg/mL.
- En una realización, la concentración de la insulina basal será de 2 mg/mL.
- En otra realización, la concentración de la insulina basal será de 4 mg/mL.
- En otra realización, la concentración de la insulina basal será de 8 mg/mL.
- En una realización de la invención, la concentración de Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1(7-37) está en el intervalo desde 2 mg/ml a 10 mg/ml y la concentración de insulina basal se encuentra en el intervalo desde 3 mg/ml a 5 mg/mL.
- En otra realización de la invención, la concentración de Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1(7-37) está en el intervalo desde 2 mg/ml a 10 mg/ml y la concentración de insulina basal se encuentra en el intervalo desde 7 mg/ml a 9 mg/mL.
- Cuando se mezclan las formulaciones de la combinación, el orden de la adición de cada componente individual es importante. Como primera etapa, se mezcla el agua, el tampón (si es diferente de tampón fosfato), el modificador de la isotonicidad. A continuación, se añade una cantidad apropiada de la solución abastecedora del análogo de insulina basal y se mezcla suavemente. A continuación, se añade el conservante, por ejemplo, fenol y la mezcla se mezcla suavemente durante aproximadamente 15-60 minutos. Como siguiente etapa, se añade una parte del zinc en una cantidad correspondiente a una concentración de 3 iones de zinc por 6 moléculas de insulina. Después, la mezcla se mezcla suavemente durante al menos 5 minutos. Como siguiente etapa se añade la cantidad restante de iones de zinc hasta la concentración deseada. A continuación, se ajusta el pH si está fuera del intervalo de pH deseado. A continuación, se añade una cantidad apropiada de la solución abastecimiento de compuesto GLP-1 para llegar a la concentración final deseada y se ajusta el pH al valor deseado.
- En una realización del procedimiento para preparar la composición farmacéutica, el conservante se añade antes de añadir cualquier cantidad de zinc a la mezcla. Por tanto, en una realización, el orden de adición de los componentes individuales es: 1) insulina basal, 2) conservante, 3) zinc y 4) compuesto GLP-1. En una realización, el zinc se añade en varias etapas, por ejemplo, hasta 3-4 etapas.
- La estabilidad física se evaluó mediante ensayos de fibrilación con tioflavina T y por la prueba de rotación de Penfill.
- La unión de zinc al compuesto GLP-1 se estudió con 1 D H-RMN.
- El equilibrio de la autoasociación de la insulina en ausencia y presencia de compuesto GLP-1 y en presencia de una concentración creciente de zinc, se estudió usando un método de cromatografía de exclusión por tamaño con detección de fluorescencia (para identificar el compuesto GLP-1 en el cromatograma).
- Las propiedades PK de las formulaciones de combinación se evaluaron utilizando modelos de apariencia estándar en cerdos.
- La composición farmacéutica de acuerdo con la invención, además de los componentes activos, contendrá los adyuvantes habituales farmacéuticamente aceptables, tales como un agente de isotonicidad, un tampón, un conservante y un estabilizador.
- Los conservantes farmacéuticamente aceptables son conservantes seleccionados a partir 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 tiomersal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de los mismos.

En una realización, el conservante es una mezcla de fenol y m-cresol. En otra realización, el conservante es fenol. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por la persona experta. Por razón de conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

5 La formulación de acuerdo con la presente invención comprenderá normalmente un agente isotónico tal como manitol, sorbitol, glicerol, propilenglicol o una mezcla de los mismos. En una realización, el agente de isotonicidad no es una sal. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por la persona experta. Por razón de conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

10 La composición farmacéutica de acuerdo con la invención también puede comprender un tampón. El tampón se puede seleccionar a partir de un tampón que es un tampón zwitteriónico, glicil-glicina, TRIS, bicina, HEPES, MOBS, MOPS, TES y mezclas de los mismos. Otros tampones adecuados son acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato disódico, fosfato sódico y tris(hidroximetil)-aminometano, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, fumárico ácido, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos.

15 La formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención preferiblemente no contendrá un tampón que se une a zinc, tal como un tampón fosfato.

La composición también puede comprender un compuesto quelante de zinc, que puede actuar como un tampón zinc para los iones de zinc libres en las formulaciones. Esto permitirá un aumento de la concentración de zinc con una formación relativamente baja de diheptámeros de liraglutida. Tales compuestos quelantes de zinc pueden incluir (pero no se limitan a los mismos), histidina, imidazol, citrato o derivados de los mismos.

20 En una realización, el agente quelante de zinc es histidina.

En otra realización, el agente quelante de zinc es imidazol.

La adición de un agente quelante de zinc de este tipo es preferiblemente inferior a 10 mM, más preferiblemente inferior a 5 mM, más preferiblemente inferior a 2 mM, más preferiblemente inferior a 1 mM, más preferiblemente inferior a 0,5 mM.

25 La expresión "composición farmacéutica estable al almacenamiento", tal como se utiliza en la presente memoria, significa una composición farmacéutica que es estable durante al menos el período que es requerida por las agencias reguladoras en relación con proteínas terapéuticas. Preferiblemente, una composición farmacéutica estable al almacenamiento es estable durante al menos un año a 5°C. La estabilidad incluye una estabilidad química así como una estabilidad física.

30 La expresión "insulina basal", tal y como se usa en la presente memoria, significa un péptido de insulina que tiene un tiempo de acción de más de 8 horas en modelos convencionales de diabetes. Preferiblemente, la insulina basal tiene un tiempo de acción de al menos 9 horas. Preferiblemente, la insulina basal relacionada con la comida tiene un tiempo de acción en el intervalo de 9 a 15 horas. Preferiblemente, la insulina relacionada con la comida tiene un tiempo de acción similar al observado para las composiciones farmacéuticas comerciales de insulina NPH e insulina humana N^{eB29}-tetradecanoilo des(B30).

La expresión "cantidad eficaz", tal y como se usa en la presente memoria, significa una dosificación que es suficiente para que el tratamiento del paciente sea eficaz en comparación con una falta de tratamiento.

40 La expresión "farmacéuticamente aceptable", tal y como se usa en la presente memoria, significa adecuada para aplicaciones farmacéuticas normales, es decir, que no da lugar a ningún evento adverso en los pacientes, etc.

El término "tampón" tal y como se usa en la presente memoria, 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 otra manera debido a reacciones químicas. Los tampones incluyen compuestos químicos tales como fosfato de sodio, TRIS, glicina y citrato de sodio.

45 El término "conservante", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto químico que se añade a una composición farmacéutica para prevenir o retrasar la actividad microbiana (crecimiento y metabolismo).

La expresión "agente de isotonicidad", tal como se utiliza, se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que sirve para modificar la presión osmótica de la composición farmacéutica, de manera que la presión osmótica se aproxima más a la del plasma humano. Los agentes de isotonicidad incluyen NaCl, glicerol, manitol, etc.

50 El término "estabilizador", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a compuestos químicos añadidos a composiciones farmacéuticas que contienen péptido, con el fin de estabilizar el péptido, es decir, para incrementar la vida útil y/o el tiempo de uso de tales composiciones. Ejemplos de estabilizadores usados en formulaciones farmacéuticas son L-glicina, L-histidina, arginina, polietilenglicol y carboximetilcelulosa.

La expresión "péptido de insulina", tal y como se usa en la presente memoria, significa un péptido que es o bien insulina humana o un análogo o un derivado de la misma con actividad de insulina.

La expresión "insulina humana", tal y como se usa en la presente memoria, significa la hormona humana cuya estructura y propiedades son bien conocidas. La insulina humana tiene dos cadenas polipeptídicas que están conectadas por puentes disulfuro entre residuos de cisteína, a saber, la cadena A y la cadena B. La cadena A es un péptido de 21 aminoácidos y la cadena B es un péptido de 30 aminoácidos, en donde las dos cadenas están conectadas por tres puentes disulfuro: uno entre las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A, el segundo entre la cisteína en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y el tercero entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B.

El término "análogo", tal y como se usa en la presente memoria, en referencia a un péptido significa un péptido modificado, en donde uno o varios residuos de aminoácidos del péptido han sido sustituidos por otros residuos de aminoácidos y/o en donde uno o varios residuos de aminoácidos han sido delecionados del péptido y/o en donde uno o varios residuos de aminoácidos han sido añadidos al péptido. Tal adición o deleción de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el extremo N-terminal del péptido y/o en el extremo C-terminal del péptido.

Los análogos de insulina no comprenden normalmente más de aproximadamente 7 mutaciones, más normalmente no más de 5 e incluso más normalmente a lo sumo 3 mutaciones, en comparación con la insulina humana.

A lo largo de los años se ha descrito una cantidad bastante extensa de modificaciones de la cadena A y/o B de la insulina. Por tanto, la posición 28 de la cadena B se puede modificar desde el residuo Pro natural a Asp, Lys o Ile, y Lys en la posición B29 también se puede modificar a Pro.

Además, Asn en la posición A21 se puede modificar a Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular a Gly, Ala, Ser o Thr y en particular a Gly. Además, Asn en la posición B3 se puede modificar a Lys o Asp. Otros ejemplos de análogos de insulina son insulina humana des(B30), análogos de insulina en donde se ha eliminado uno o ambas de B1 y B2; análogos de insulina en donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión N-terminal y análogos de insulina en donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión C-terminal. Además, el residuo de aminoácidos natural en la posición A18 se puede cambiar a un residuo Gln, o uno o varios de los residuos de aminoácidos en las posiciones B26-B30 se pueden delecionar.

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

La expresión "punto isoeléctrico" tal y como se usa en la presente memoria, significa el valor del pH, en donde la carga neta total de una macromolécula tal como un péptido, es cero. En los péptidos puede haber varios grupos cargados, y en el punto isoeléctrico la suma de todas estas cargas es cero. A un pH superior al punto isoeléctrico, la carga neta total del péptido será negativa, mientras que a valores de pH inferiores al punto isoeléctrico, la carga neta total del péptido será positiva.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Una formulación típica de la combinación fija que consiste en el análogo de insulina, insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 y el análogo de GLP-1 Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37), liraglutida, se preparó del modo siguiente. Se prepararon soluciones de abastecimiento apropiadas en agua, del análogo de insulina y del análogo de GLP-1. Las concentraciones de péptido de las dos soluciones eran típicamente de aproximadamente 10 mM y el pH se ajustó a aproximadamente pH 7,7 para la solución de abastecimiento del análogo de insulina y a aproximadamente pH 8,2 para la solución de abastecimiento de liraglutida. Estos ajustes del pH se realizaron utilizando soluciones de NaOH o HClO₄ con concentraciones máximas de 1,0 N.

Los siguientes excipientes se mezclaron a partir de soluciones de abastecimiento apropiadas en agua, en este orden: 1) agua, 2) glicerol (modificador de la isotonicidad), 3) análogo de insulina, 4) fenol. La adición de fenol antes del zinc era decisiva; de otro modo se formaba un gel. Después de 15 minutos, se añadió el acetato de zinc en tres porciones: en primer lugar, una cantidad de zinc que correspondía a una concentración de 3 iones de zinc/6 moléculas de análogo de insulina; en segundo lugar, una cantidad de zinc que correspondía a una concentración 3 iones de zinc/6 moléculas de análogo de insulina; y en tercer lugar cualquier cantidad de zinc adicional. La solución se equilibró durante 5 minutos después de cada adición. Se midió el pH y se ajustó a pH 8,2 como se ha descrito anteriormente. Esta solución se dejó equilibrar durante aproximadamente 48 horas a 4°C, antes de añadir una cantidad apropiada de la solución de abastecimiento de liraglutida. Finalmente, se midió el pH y si era necesario se ajustó a pH 8,2. Después de este procedimiento se preparó una formulación tal y como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1

Compuesto	Concentración de abastecimiento (mM)	Concentración final (mM)	Volumen añadido (ml)	Orden de la mezcla
Análogo de insulina	8,64	0,60	0,972	3
Acetato de zinc	9,54	0,80 ¹⁾	1,174 ²⁾	5 ²⁾
Fenol	500	50	1,4	4
Glicerol	200	16	1,12	2
Liraglutida	9,95	1,6	1,6	6 ³⁾
Agua	n.a.	n.a.	7,083	1

¹⁾ Correspondiente a $8 \text{ Zn}^{2+}/6$ moléculas de análogo de insulina
²⁾ Se añadió en tres porciones: 0,441 ml, 0,440 ml, 0,293 ml, con 5 minutos entre cada una y después de la última adición
³⁾ La solución se equilibró a 4°C durante aproximadamente 48 horas antes de la adición de liraglutida

Ejemplo 2

- 5 Se ha descrito que el mecanismo de acción prolongada del análogo de insulina, insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 depende de la formación de autoasociaciones en presencia de más de 3 iones de zinc por 6 moléculas de análogo de insulina. Por lo tanto, si una formulación del análogo de insulina, insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 contiene una fracción significativa del análogo en forma monómera, se espera que la formulación muestre un componente de acción rápida no deseable. Por otra parte, un contenido elevado en monómero de análogo de insulina podría comprometer la estabilidad física de la formulación. La presencia del análogo de GLP-1, liraglutida, en una combinación fija con el análogo de insulina, insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 puede alterar el equilibrio de la autoasociación del análogo de insulina hacia el estado monomérico, con una formación simultánea de un complejo de unión de liraglutida y zinc. Se ha demostrado que la liraglutida forma un autoensamblaje heptámero en condiciones de formulación relevantes y, en presencia de concentraciones equimolares de iones de zinc, se forma un diheptámero de liraglutida unida a zinc.
- 10 Las formulaciones que contienen tanto el análogo de insulina, insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 como liraglutida se analizaron mediante un método de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con detección por fluorescencia. El método SEC utilizaba una columna de Superosa 12 10/300GL, se inyectaron muestras de 50 μl y el flujo era de 0,8 ml/min. Dos métodos, que incluían y excluían fenol se utilizaron con el disolvente NaCl 140 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 7,7, +/- fenol 2 mM. La detección se realizó mediante un canal con absorción a 276 nm (medición de la cantidad de péptido total) y otro canal con detección de la fluorescencia (excitación a 310 nm, emisión a 380 nm), que era específico de liraglutida.
- 15 En algunas condiciones, una cuantificación específica era imposible debido a las condiciones experimentales. En este caso, la cantidad de análogo de insulina en la forma monomérica se cuantificó en relación con la cantidad total de péptido.
- 20 Las formulaciones se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 1. Cuatro formulaciones, cada una con análogo de insulina 0,3 mM y 0,6 mM, respectivamente, se prepararon con contenidos de zinc que correspondían a 6, 8, 10 y 12 iones de zinc por 6 moléculas de análogo de insulina. Estas ocho formulaciones se almacenaron a 4°C y 37°C.
- Todas las formulaciones contenían análogo de insulina 0,3 o 0,6 mM, acetato de zinc, liraglutida 1,6 mM, fenol 50 mM, glicerol 174 mM, pH 8,2.
- 30 Las formulaciones almacenadas se analizaron utilizando métodos tanto SEC con fenol como SEC sin fenol, después de 0, 2, 4 y 8 semanas de almacenamiento (W). Las Tablas 2 y 3 muestran las cantidades de análogo de insulina en la forma monomérica. Las áreas sombreadas indican las condiciones en las que no fue posible una cuantificación exacta. Por lo tanto, la cuantificación se realizó también para el monómero de análogo de insulina con respecto al contenido total de péptido. Esto se muestra en la Tabla 4 y la Tabla 5

Tabla 2

SEC con fenol		% de monómero de Ins			
		Ins 0,3 mM		Ins 0,6 mM	
		4°C	37°C	4°C	37°C
6 Zn/6 ins	0W	25,1	25,1	7,9	7,9
	2W	59,7	55,1	19,4	17,8
	4W				
8 Zn/6 ins	0W	16,1	16,1	2,8	
	2W	49,0	42,6	10,3	
	4W				
10 Zn/6 ins	0W	7,9	7,9	1,5	
	2W	36,8	32,2	2,2	
	4W				
12 Zn/6 ins	0W	6,0	6,0		
	2W	24,3	23,8		
	4W				

Tabla 3

SEC sin fenol		% de monómero de Ins			
		Ins 0,3 mM		Ins 0,6 mM	
		4°C	37°C	4°C	37°C
6 Zn/6 ins	0W	66,4	66,4	27,9	27,9
	2W	86,3	80,9	29,8	33,6
	4W				
8 Zn/6 ins	0W	51,9	51,9	7,0	
	2W	72,8	68,5	16,1	
	4W				
10 Zn/6 ins	0W	28,3	28,3	2,0	
	2W	56,7	55,1	3,1	
	4W				
12 Zn/6 ins	0W	14,5	14,5		
	2W	35,0	39,9		
	4W				

Tabla 4

SEC con fenol		% de monómero de Ins de péptido total			
		Ins 0,3 mM		Ins 0,6 mM	
		4°C	37°C	4°C	37°C
6 Zn/6 Ins	0W	3,8	3,8	2,0	2,0
	2W	8,2	7,0	4,8	4,2

SEC con fenol		% de monómero de Ins de péptido total			
		Ins 0,3 mM		Ins 0,6 mM	
		4°C	37°C	4°C	37°C
	4W	12,4	5,4	4,7	2,9
	8W	7,8	5,5	4,5	3,4
8 Zn/6 Ins	0W	2,2	2,2	0,8	0,8
	2W	7,0	5,6	2,6	2,5
	4W	6,8	4,2	2,3	1,8
	8W	6,5	4,3	2,8	1,9
10 Zn/6 Ins	0W	1,1	1,1	0,4	0,4
	2W	5,2	4,3	0,6	0,8
	4W	4,9	2,9	0,4	0,6
	8W	5,0	3,5	0,8	1,1
12 Zn/6 Ins	0W	0,9	0,9	0,8	0,8
	2W	3,6	3,3	0,5	0,7
	4W	3,2	2,3	0,2	0,4
	8W	4,2	2,9	0,4	0,5

Tabla 5

SEC sin fenol		% de monómero de Ins de péptido total			
		Ins 0,3 mM		Ins 0,6 mM	
		4°C	37°C	4°C	37°C
6 Zn/6 Ins	0W	16,3	16,3	7,5	7,5
	2W	16,6	12,1	8,3	8,8
	4W	10,1	8,8	6,3	5,5
	8W	13,1	10,8	9,1	8,1
8 Zn/6 Ins	0W	8,4	8,4	2,0	2,0
	2W	11,3	10,1	4,3	5,0
	4W	8,3	7,4	2,9	3,0
	8W	11,1	9,1	4,9	4,9
10 Zn/6 Ins	0W	4,5	4,5	0,5	0,5
	2W	8,5	8,3	0,8	1,3
	4W	6,3	5,6	0,4	0,8
	8W	8,7	7,3	1,3	2,4
12 Zn/6 Ins	0W	2,3	2,3	0,7	0,7
	2W	5,6	6,1	0,8	1,1
	4W	4,3	4,1	0,2	0,5
	8W	6,9	7,0	0,6	1,4

5 La cantidad de diheptámero de liraglutida que se unía a zinc se midió fácilmente utilizando la detección con fluorescencia. La Tabla 6 y la Tabla 7 muestran las cantidades medidas en las muestras analizadas.

Tabla 6

SEC con fenol		% de diheptámero de liraglutida total			
		Ins 0,3 mM		Ins 0,6 mM	
		4°C	37°C	4°C	37°C
6 Zn/6 Ins	0W	0	0	0	0
	2W	0	0	0	0
	4W	0	0	0	0
	8W	0	0	0	0
8 Zn/6 Ins	0W	0	0	0	0
	2W	0	0	0	0,3
	4W	0	0	0	0,4
	8W	0	0	0	0,4
10 Zn/6 Ins	0W	0	0	0	0
	2W	0	0	0	1,2
	4W	0	0	0	1,5
	8W	0	0	0,1	2,1
12 Zn/6 Ins	0W	0	0	0,4	0,4
	2W	0	0	0,6	15,4
	4W	0	0	0,4	15,2
	8W	0	0,1	0,8	15,6

Tabla 7

SEC sin fenol		% de diheptámero de liraglutida			
		Ins 0,3 mM		Ins 0,6 mM	
		4°C	37°C	4°C	37°C
6 Zn/6 Ins	0W	0	0	0	0
	2W	0	0	0	0
	4W	0	0	0	0
	8W	0	0	0	0,1
8 Zn/6 Ins	0W	0	0	0	0
	2W	0	0	0	0,3
	4W	0	0	0	0,2
	8W	0	0	0	0,4
10 Zn/6 Ins	0W	0	0	0	0,1
	2W	0	0	0	1,3
	4W	0	0	0	1,1
	8W	0	0	0	2,4
12 Zn/6 Ins	0W	0	0	0,3	0,3
	2W	0	0	0,5	16,7
	4W	0	0	0,3	13,5
	8W	0	0,1	0,8	17,7

Ejemplo 3

5 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se prepararon cuatro formulaciones con las composiciones mostradas en la Tabla 8. En la formulación 3, se añadió el tampón glicilglicina junto con el agua. En la formulación 4, se añadió el
 10 tampón fosfato después de añadir el acetato de zinc. Esto se realizó con el fin de minimizar la precipitación de fosfato de zinc. El análogo de insulina utilizado era insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30.

15 La estabilidad física de las cuatro composiciones farmacéuticas se evaluó por medio de una prueba estresada acelerada. La prueba estresada se realizó como una prueba de rotación. Se añadieron 50 μl de aire a cada uno de los 5 cartuchos (viales de vidrio) de cada formulación. Los cartuchos se hicieron girar con una frecuencia de 30 rotaciones por minuto durante 4 horas diarias. La inspección de los cartuchos se realizó diariamente o según era necesario. La turbidez de la formulación se caracterizó mediante una medición nefelométrica y se especificó en unidad de turbidez nefelométrica (NTU), del inglés "Nephelometric Turbidity Unit". La inestabilidad física de la proteína se caracterizó por mediciones de turbidez elevada.

20 Esta prueba de rotación se muestra en la Figura 1. Se puso de manifiesto que la formulación con el análogo de insulina y liraglutida combinados y formulados a pH 7,7 (Formulación 3) era menos estable que el análogo de insulina formulado solo a pH 7,4 (Formulación 1) y probablemente tenía una estabilidad inaceptable para un desarrollo adicional. La Formulación 4 también contenía la combinación de análogo de insulina y liraglutida, pero se formuló a pH 8,2. Esta formulación tenía solo una estabilidad física marginalmente inferior que el análogo de insulina solo. Por lo tanto, esta comparación ilustraba que la combinación de análogo de insulina y liraglutida sin ninguna optimización daba como resultado una formulación inestable. Sin embargo, el aumento del pH a pH 8,2, daba lugar a una estabilidad física mucho mejor, comparable a la del análogo de insulina solo.

Tabla 8

	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Formulación 4
Análogo de insulina (mM)	0,6	n.a.	0,6	0,6
Acetato de zinc (mM)	0,6	n.a.	0,6	0,6
Liraglutida (mM)	n.a.	1,6	1,6	1,6
Fenol (mM)	16	58	40	40
m-cresol (mM)	16	n.a.	n.a.	n.a.
Glicerol (mM)	174	174	174	174
NaCl (mM)	10	n.a.	10	10
Fosfato (mM)	n.a.	8	n.a.	8
Glicilglicina (mM)	n.a.	n.a.	8	n.a.
pH	7,4	7,7	7,7	8,2

Ejemplo 4

25 En otra prueba de rotación realizada como se ha descrito en el Ejemplo 3, se sometieron a ensayo cuatro formulaciones de combinación que contenían tanto el análogo de insulina, insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30, como liraglutida y dos referencias con el análogo de insulina y liraglutida solos.

Las formulaciones se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 1 y sus composiciones se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

	Form. 1	Form. 2	Form. 3	Form. 4	Form. 5	Form. 6
Análogo de insulina (mM)	0,6	n.a.	0,6	0,6	0,6	0,3
Acetato de zinc (mM)	0,6 (= 6 Zn ²⁺ /6 ins)	n.a.	0,8 (= 8 Zn ²⁺ /6 ins)	1,0 (= 10 Zn ²⁺ /6 ins)	1,2 (= 12 Zn ²⁺ /6 ins)	0,5 (= 10 Zn ²⁺ /6 ins)
Liraglutida (mM)	n.a.	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Fenol (mM)	16	58	50	50	50	50
m-cresol (mM)	16	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

	Form. 1	Form. 2	Form. 3	Form. 4	Form. 5	Form. 6
Glicerol (mM)	174	174	174	174	174	174
NaCl (mM)	10	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Fosfato (mM)	n.a.	8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
pH	7,4	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2

Los resultados de la prueba de rotación se muestran en las Figuras 2-4.

5 La Formulación 3 contenía 8 iones de zinc/6 moléculas de análogo de insulina y tenía una estabilidad comparable a ambas referencias con el análogo de insulina (con 6 iones de zinc/6 moléculas de análogo de insulina) y liraglutida solos. La Formulación 6 solo contenía análogo de insulina 0,3 mM pero requería 10 iones de zinc/6 moléculas de análogo de insulina con el fin de mostrar una estabilidad similar a la referencia. Esto indicaba que era necesario un contenido en zinc más alto en relación con la cantidad de análogo de insulina, con el fin de conseguir la misma estabilidad que la referencia de análogo de insulina solo con 6 iones de zinc/6 moléculas de análogo de insulina.

Ejemplo 5

10 Las propiedades farmacocinéticas (PK) de las formulaciones de combinación fija con el análogo de insulina, insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 y liraglutida fueron examinadas en cerdos. Las apariciones de los dos péptidos en la corriente sanguínea se midieron mediante técnicas de ensayo convencionales durante hasta 72 horas después de la inyección. Para mayor claridad, sin embargo, solo se muestran las primeras 24 horas para el análogo de insulina. Los resultados se muestran en la Figura 5 y la Figura 6 como medias de las seis réplicas y se muestran con error estándar de la media. Tres formulaciones de combinación y dos referencias se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 1. Sus composiciones se muestran en la Tabla 10. La curva de aparición PK para el análogo de insulina se muestra en la Figura 5 y la curva de aparición PK para liraglutida se muestra en la Figura 6.

Tabla 10

	Form. 1	Form. 2	Form. 3	Form. 4	Form. 5
Análogo de insulina (mM)	0,6	n.a.	0,6	0,6	0,6
Acetato de zinc (mM)	0,6 (= 6 Zn ²⁺ /6 ins)	n.a.	0,8 (= 8 Zn ²⁺ /6 ins)	1,0 (= 10 Zn ²⁺ /6 ins)	1,2 (= 12 Zn ²⁺ /6 ins)
Liraglutida (mM)	n.a.	1,6	1,6	1,6	1,6
Fenol (mM)	50	50	50	50	50
Glicerol (mM)	174	174	174	174	174
pH	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2

20 La aparición del análogo de insulina en la combinación es decisiva por varias razones: Un componente de acción rápida dará lugar a un efecto de inicio temprano inesperado. Un aumento de la biodisponibilidad también dará lugar a un mayor efecto reductor de glucosa en sangre y, posteriormente, se requerirá un ajuste de la dosis. Es interesante llegar a la conclusión de que la formulación de combinación 3 (formulada con 8 iones de zinc/6 moléculas de análogo de insulina) mostraba una curva de aparición de insulina muy similar, en comparación con la curva para el análogo de insulina solo (Formulación 1). Por lo tanto, una formulación de combinación con 8 iones de zinc/6 moléculas de análogo de insulina mostraba propiedades PK de insulina muy similares, en comparación con el análogo de insulina solo. Todas las formulaciones de combinación mostraban curvas de aparición de liraglutida muy similares (Formulaciones 3-5).

Ejemplo 6

30 Las propiedades farmacocinéticas (PK) de otras formulaciones de combinación fija con el análogo de insulina, insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 y liraglutida en una relación diferente, se examinaron igualmente en cerdos. Esta relación permite suministrar al paciente una mayor cantidad de análogo de insulina en relación con liraglutida, en una sola inyección. Una dosis igual de insulina fue administrada a los cerdos tanto de la referencia de análogo de insulina (Formulación 1) como de las combinaciones (Formulaciones 3-5). Las apariciones de los dos péptidos en la corriente sanguínea se midieron mediante técnicas de ensayo convencionales durante hasta 72 horas después de la inyección. Sin embargo, para mayor claridad, solo se muestran las primeras 6 y 24 horas, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 7 y la Figura 8 como medias de las seis réplicas y se

muestran con error estándar de la media. Tres formulaciones de combinación y dos referencias se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 1. Sus composiciones se muestran en la Tabla 11. La curva de apariencia PK para el análogo de insulina se muestra en la Figura 7 y la curva de apariencia PK para liraglutida se muestra en la Figura 8.

Tabla 11

	Form. 1	Form. 2	Form. 3	Form. 4	Form. 5
Análogo de insulina (mM)	0,6	n.a.	1,2	1,2	1,2
Acetato de zinc (mM)	0,6 (= 6 Zn ²⁺ /6 ins)	n.a.	1,2 (= 6 Zn ²⁺ /6 ins)	1,4 (= 7 Zn ²⁺ /6 ins)	1,6 (= 8 Zn ²⁺ /6 ins)
Liraglutida (mM)	n.a.	1,6	1,6	1,6	1,6
Fenol (mM)	50	50	50	50	50
Glicerol (mM)	214	214	214	214	214
pH	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2

5

En comparación con el análogo de insulina de referencia (Formulación 1), la combinación con 6 Zn²⁺/6 moléculas de insulina (Formulación 3) mostraba un hombro menor con un inicio más temprano que el pico principal de la referencia. El aumento del contenido en zinc a 7 Zn²⁺/6 moléculas de insulina (Formulación 4) dio como resultado una curva de apariencia de análogo de insulina mucho más similar a la de la insulina de referencia (Formulación 1). El aumento del contenido en zinc en más de 8 Zn²⁺/6 moléculas de insulina (Formulación 5), no dio como resultado ninguna mejora adicional. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de apariencia PK para liraglutida en las tres combinaciones (Formulaciones 3-5) y liraglutida sola (Formulación 2). Esto indicaba que un contenido en zinc de 7 Zn²⁺/6 moléculas de insulina para la combinación de análogo de insulina 1,2 mM - liraglutida 1,6 mM, era preferible con el fin de obtener una curva de apariencia PK similar para el análogo de insulina en la combinación, en comparación con el análogo solo.

10

15

Ejemplo 7

20

25

La influencia del pH sobre el contenido en análogo de insulina, monómero de insulina humana N^εB29-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30, en combinaciones con liraglutida, fue investigada. Se prepararon tres formulaciones como se ha descrito en el Ejemplo 1, pero se ajustaron a pH 8,2, pH 7,7 y pH 7,4. La composición de las tres formulaciones era: análogo de insulina 0,6 mM, acetato de zinc 0,8 mM (8 iones de zinc por 6 moléculas de análogo de insulina), liraglutida 1,6 mM, fenol 50 mM, glicerol 214 mM. Después de la preparación, las formulaciones se almacenaron a 4°C durante algunas semanas antes de la primera medición en el punto de tiempo 0 semanas. A partir de ahí las formulaciones se almacenaron a 5°C y 37°C y se analizaron después de 2 y 4 semanas adicionales de almacenamiento a las dos temperaturas. Las formulaciones se analizaron usando el método SEC descrito en el Ejemplo 2. Se usaron ambas versiones, con y sin fenol.

30

Los contenidos relativos en monómero de análogo de insulina en comparación con análogo de insulina total, medidos mediante el análisis SEC con fenol y sin fenol, se muestran en la Tabla 12 y la Tabla 13, respectivamente. En ambos métodos SEC y a ambas temperaturas, un pH decreciente daba como resultado un menor contenido en monómero de análogo de insulina en cada punto de medición temporal. Esto indicaba que el pH es un factor importante para controlar y modular el contenido en monómero de insulina en las combinaciones con liraglutida. Un contenido inferior en monómero de insulina se podría obtener mediante el uso de un pH inferior a pH 8,2, por ejemplo pH 7,7.

Tabla 12

SEC con fenol	% de monómero de Ins		
	0W	2W	4W
pH 8,2 (4°C)	12,4	8,1	8,8
pH 7,7 (4°C)	2,5	2,8	2,8
pH 7,4 (4°C)	1,1	1,2	1,1
pH 8,2 (37°C)	12,4	8,2	7,8
pH 7,7 (37°C)	2,5	3,1	2,3
pH 7,4 (37°C)	1,1	1,5	1,1

Tabla 13

SEC sin fenol	% de monómero de Ins		
	0W	2W	4W
pH 8,2 (4°C)	12,5	13,7	13,6
pH 7,7 (4°C)	1,7	3,5	4,3
pH 7,4 (4°C)	0,7	1,3	1,6
pH 8,2 (37°C)	12,5	15,2	17,6
pH 7,7 (37°C)	1,7	4,1	4,6
pH 7,4 (37°C)	0,7	1,9	2,0

Los contenidos en diheptámero de liraglutida también se midieron de una manera similar y estos resultados se muestran en la Tabla 14 y la Tabla 15 para el método SEC con fenol y sin fenol, respectivamente.

5

Tabla 14

SEC con fenol	% de diheptámero de liraglutida		
	0W	2W	4W
pH 8,2 (4°C)	0,0	0,1	0,1
pH 7,7 (4°C)	0,1	0,1	0,1
pH 7,4 (4°C)	0,8	0,4	0,4
pH 8,2 (37°C)	0,0	0,4	0,6
pH 7,7 (37°C)	0,1	4,6	6,1
pH 7,4 (37°C)	0,8	18,0	21,6

Tabla 15

SEC sin fenol	% de diheptámero de liraglutida		
	0W	2W	4W
pH 8,2 (4°C)	0,0	0,0	0,0
pH 7,7 (4°C)	0,1	0,1	0,1
pH 7,4 (4°C)	0,9	0,4	0,3
pH 8,2 (37°C)	0,0	0,3	0,5
pH 7,7 (37°C)	0,1	4,4	5,2
pH 7,4 (37°C)	0,9	16,6	19,0

Ejemplo 8

- 10 El estudio descrito en el Ejemplo 7 también contenía una formulación de combinación del análogo de insulina, análogo de insulina N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 - liraglutida que contenía una concentración baja de histidina. Se intentó que el aminoácido actuara como un tampón zinc en presencia de un mayor contenido en zinc. La Formulación 1 se componía de análogo de insulina 0,6 mM, acetato de zinc 0,8 mM (8 iones de zinc por 6 moléculas de análogo de insulina), liraglutida 1,6 mM, fenol 50 mM, glicerol 214 mM, con un pH ajustado a pH 8,2. La
- 15 Formulación 2 se componía de análogo de insulina 0,6 mM, acetato de zinc 1,0 mM (10 iones de zinc por 6 moléculas de análogo de insulina), liraglutida 1,6 mM, fenol 50 mM, glicerol 214 mM, histidina 0,5 mM, pH ajustado a pH 8,2. Ambas formulaciones fueron producidas básicamente como se ha descrito en el Ejemplo 1, la histidina se añadió como el excipiente final después de liraglutida. Las formulaciones se analizaron como se ha descrito en el Ejemplo 2 y el Ejemplo 7.
- 20 Los contenidos relativos en monómero de análogo de insulina en comparación con el análogo de insulina total, me-

didados por el análisis SEC con fenol y sin fenol, se muestran en la Tabla 16 y la Tabla 17, respectivamente. La Formulación 2 con 10 iones de zinc/6 moléculas de insulina e histidina 0,5 mM presente, contenía menos monómero de insulina a lo largo del tiempo a ambas temperaturas que la Formulación 1 con solo 8 iones de zinc/6 moléculas de insulina.

5

Tabla 16

SEC con fenol	% de monómero de Ins		
	0W	2W	4W
Formulación 1 (4°C)	12,4	8,1	8,8
Formulación 2 (4°C)	3,2	3,0	3,1
Formulación 1 (37°C)	12,4	8,2	7,8
Formulación 2 (37°C)	3,2	3,7	3,4

Tabla 17

SEC sin fenol	% de monómero de Ins		
	0W	2W	4W
Formulación 1 (4°C)	12,5	13,7	13,6
Formulación 2 (4°C)	2,4	4,0	4,5
Formulación 1 (37°C)	12,5	15,2	17,6
Formulación 2 (37°C)	2,4	5,1	6,3

10

Los contenidos en diheptámero de liraglutida también se midieron de una manera similar y estos resultados se muestran en la Tabla 18 y la Tabla 19 para el método SEC con fenol y sin fenol, respectivamente.

Tabla 18

SEC con fenol	% de diheptámero de liraglutida		
	0W	2W	4W
Formulación 1 (4°C)	0,0	0,1	0,1
Formulación 2 (4°C)	0,1	0,2	0,2
Formulación 1 (37°C)	0,0	0,4	0,6
Formulación 2 (37°C)	0,1	1,9	3,6

Tabla 19

SEC sin fenol	% de diheptámero de liraglutida		
	0W	2W	4W
Formulación 1 (4°C)	0,0	0,0	0,0
Formulación 2 (4°C)	0,1	0,1	0,1
Formulación 1 (37°C)	0,0	0,3	0,5
Formulación 2 (37°C)	0,1	1,8	3,0

15 **Ejemplo 9**

El estudio descrito en el Ejemplo 7 también contenía una combinación de análogo de insulina, insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 - liraglutida compuesta por análogo de insulina 0,3 mM, acetato de zinc 0,8 mM (16 iones de zinc por 6 moléculas de análogo de insulina), liraglutida 1,6 mM, fenol 50 mM, glicerol 214 mM,

ajustada a pH 8,2.

Los contenidos relativos de monómero de análogo de insulina en comparación con análogo de insulina total, medidos por el análisis SEC con fenol y sin fenol (como se ha descrito en el Ejemplo 2) se muestran en la Tabla 20 y la Tabla 21, respectivamente.

5

Tabla 20

SEC con fenol	% de monómero de Ins		
	0W	2W	4W
4°C	7,9	7,0	6,8
37°C	7,9	6,2	5,9

Tabla 21

SEC sin fenol	% de monómero de Ins		
	0W	2W	4W
4°C	7,1	8,3	8,6
37°C	7,1	8,6	10,0

10 Los contenidos en diheptámero de liraglutida también se midieron de una manera similar y estos resultados se muestran en la Tabla 22 y la Tabla 23 para el método SEC con fenol y sin fenol, respectivamente.

Tabla 22

SEC con fenol	% de diheptámero de liraglutida		
	0W	2W	4W
4°C	0,1	0,1	0,1
37°C	0,1	1,8	2,7

Tabla 23

SEC sin fenol	% de diheptámero de liraglutida		
	0W	2W	4W
4°C	0,1	0,1	0,1
37°C	0,1	1,9	2,5

15 Ejemplo 10

Se prepararon formulaciones que combinaban la insulina glargina y el análogo de exendina-4 ZP10 (también conocido como AVE0010). El análogo de exendina-4 ZP10 se describe en Thorkildsen et al. (2003), JPET 307: 490-496 y tiene el nombre sistemático [des-Pro38]exendina-4-(1-39)il-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂. A partir de soluciones de abastecimiento apropiadas se prepararon las siguientes composiciones mediante dilución en agua: la Formulación 1 consistía en insulina glargina 0,6 mM, acetato de zinc 0,46 mM (4,6 zinc/6 insulina glargina), ZP10 60 µM. La Formulación 2 consistía en insulina glargina 0,6 mM, acetato de zinc 0,6 mM (6 zinc/6 insulina glargina), ZP10 60 µM. Ambas formulaciones se ajustaron a aproximadamente pH 4,0 usando HCl y NaOH y se almacenaron a temperatura ambiente durante tres días. Después del almacenamiento, ambas formulaciones todavía tenían aproximadamente pH 4,0. Las dos formulaciones conservaron soluciones claras inmediatamente después de la preparación y después del almacenamiento a temperatura ambiente.

20

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica soluble para administración parenteral, que comprende un compuesto insulínico GLP-1, un péptido de insulina basal, aditivos farmacéuticamente aceptables y zinc, en donde el contenido en zinc es desde 6 iones de Zn por 6 moléculas de insulina hasta 12 iones de Zn por 6 moléculas de insulina, en donde el compuesto insulínico GLP-1 es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))²⁶-GLP-1(7-37) y el péptido de insulina basal es insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30, y en donde el pH de dicha composición farmacéutica está entre pH 7 y pH 9.
2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el contenido en zinc está entre 6 y 10 iones de zinc por 6 moléculas de insulina.
- 10 3. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el contenido en zinc está entre 7 y 10 iones de zinc por 6 moléculas de insulina.
4. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el pH de dicha composición farmacéutica está entre pH 7,7 y pH 8,9.
- 15 5. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el pH de dicha composición farmacéutica está entre pH 7,7 y pH 8,5.
6. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el pH de dicha composición farmacéutica es 8,2, 8,3, 8,4 u 8,5.
- 20 7. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la concentración de la insulina basal se encuentra en el intervalo desde 1,5 a 8 mg/ml y la concentración del compuesto GLP-1 se encuentra en el intervalo desde 2 a 10 mg/ml.
8. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los aditivos farmacéuticamente aceptables comprenden un conservante que es fenol.
9. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente histidina.

Figura 1

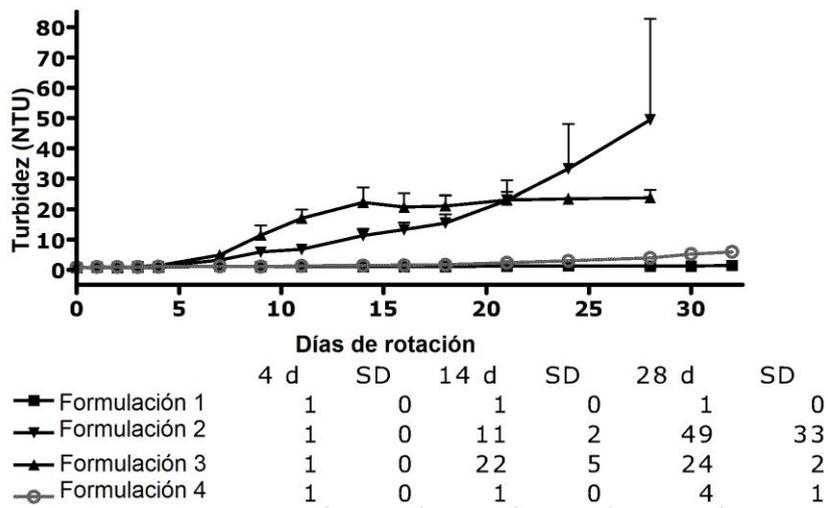


Figura 2

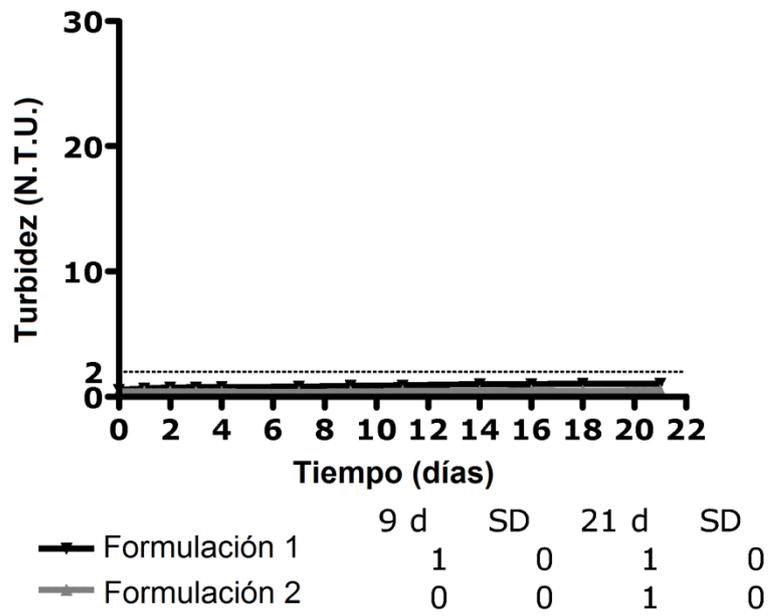
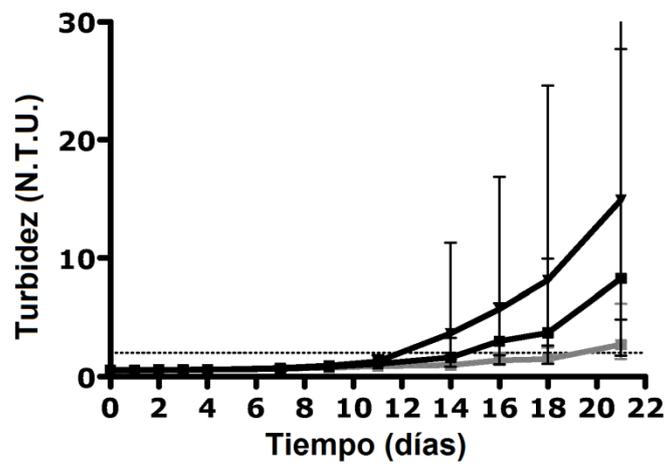


Figura 3



	9 d	SD	21 d	SD
Formulación 3	1	0	3	2
Formulación 4	1	0	8	11
Formulación 5	1	0	15	14

Figura 4

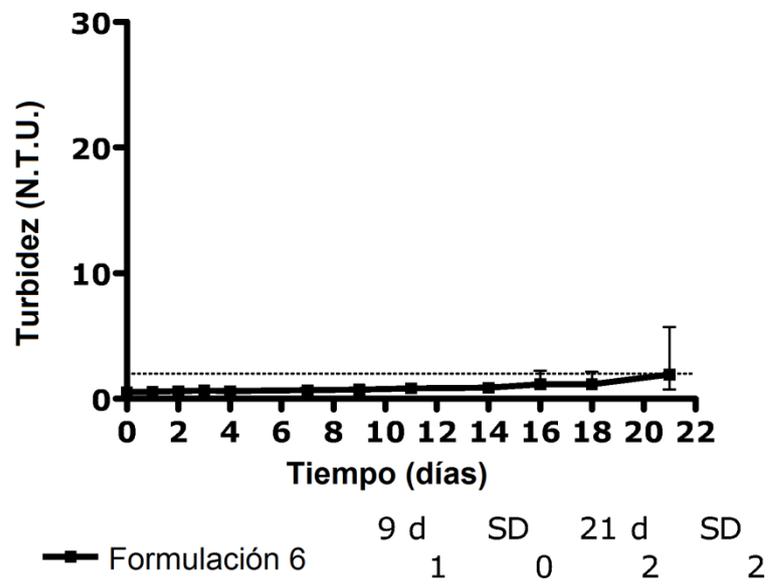


Figura 5

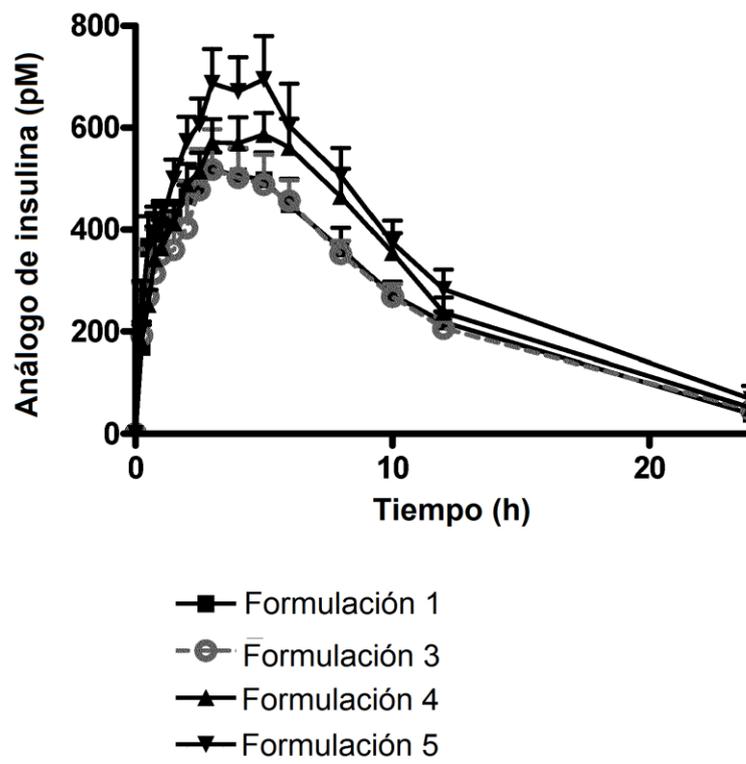


Figura 6

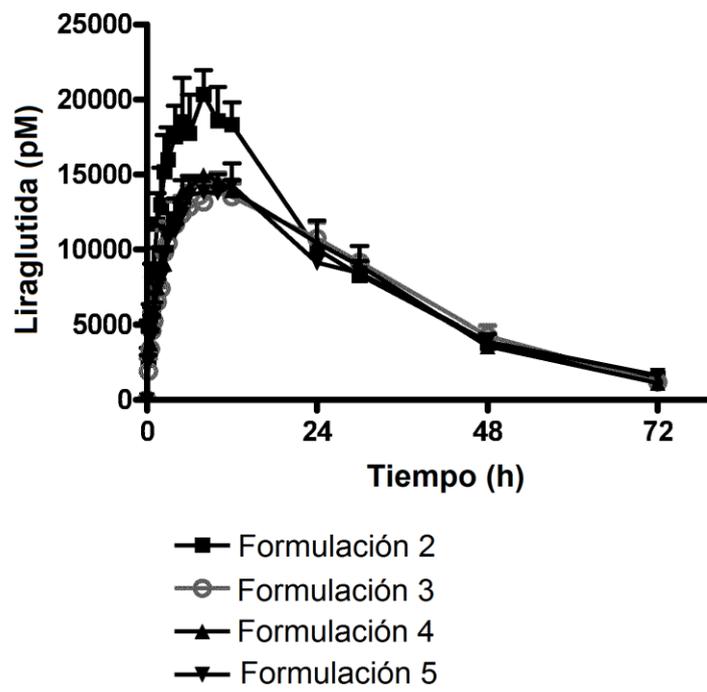


Figura 7

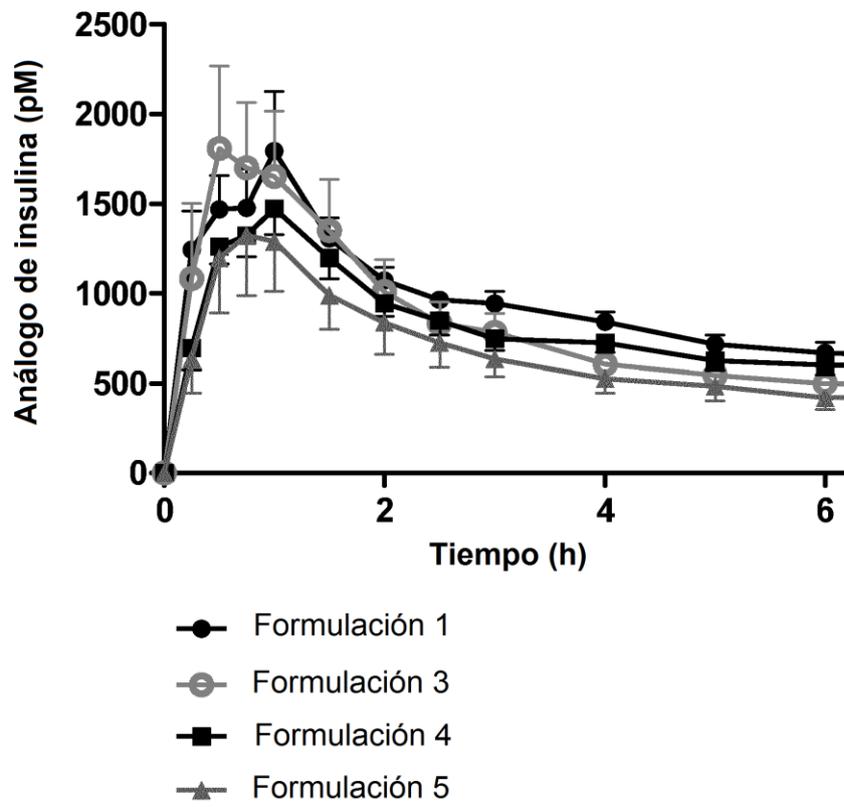


Figura 8

