

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 822**

51 Int. Cl.:

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2008 PCT/IN2008/000683**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09050738**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2008 E 08840520 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2203181**

54 Título: **Una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral y un proceso de la misma**

30 Prioridad:

16.10.2007 IN CH23402007

24.03.2008 IN CH07142008

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

23.04.2018

73 Titular/es:

**BIOCON LIMITED (100.0%)
20th K.M. Hosur Road Electronics City
Bangalore 560 100
Karnataka, IN**

72 Inventor/es:

**KHEDKAR, ANAND;
RANGAPPA, SHARATH, KUMAR, MALLAPURA;
SUBRAMANI, RAMESH;
DAVE, NITESH;
RADHAKRISHNAN, DEVESH;
SHANKAR, SUNDARESH;
CHIVUKULA, SUDHEER;
RAMAKRISHNA, RANJITH;
MURTHY, SHANMUGAM, THANDAVA;
PAI, HARISH VENKATRAMAN;
SENGUPTA, NILANJAN;
MELARKODE, RAMAKRISHNAN y
IYER, HARISH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 664 822 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

Una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral y un proceso de la misma

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a composiciones farmacéuticas improvisadas que permiten la ingestión mediante administración oral de proteínas/péptidos o sus conjugados, y/o complejos conjugados de catión - insulina que demuestran perfiles farmacocinéticos deseables y potencia en modelos de eficacia de diabetes en perros y humanos. Un aspecto adicional de la invención caracteriza el proceso de preparar tales composiciones.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Las rutas subcutáneas convencionales de administración de insulina se investigan cada vez más para ser reemplazadas por mecanismos de administración oral de fármacos que no alterarían su actividad clínica fisiológica.

Los problemas enfrentados en este campo del arte en el diseño de un sistema eficaz de administración oral de fármacos para macromoléculas biológicas se han atribuido principalmente a su susceptibilidad a la degradación enzimática y a la baja permeabilidad epitelial. Además, la estructura y la conformación de la insulina se alteran fácilmente cuando se exponen a las condiciones de formulación y proceso que conducen a una pérdida de la actividad biológica. Algunos de los enfoques para combatir estas limitaciones implican el uso de análogos de insulina, administración de péptidos tales como amilina, péptido similar al glucagón, péptidos C, formas inhaladas, formas intranasales que no han abordado satisfactoriamente las limitaciones de la biodisponibilidad individualmente.

25 Existe una necesidad en la técnica de complejos farmacéuticamente aceptables que incluyen conjugados de insulina derivados que tienen una biodisponibilidad incrementada u otros atributos farmacéuticos mejorados en relación con los conjugados existentes. Además, estos conjugados mejorados necesitan entregarse en forma de una formulación estable e improvisada que maximice fácilmente los beneficios del suministro oral de proteínas. La presente invención aplica un enfoque combinado de un conjugado de insulina mejorado con una mayor biodisponibilidad y una formulación mejorada para abordar las limitaciones de la administración de insulina.

Los ejemplos de compuestos de insulina incluyen insulina humana, insulina lispro, insulina des30, proinsulina nativa, proinsulinas artificiales, etc. El componente de catión puede ser, por ejemplo, un catión de metal divalente seleccionado del grupo que consiste en Zn ++, Mn ++, Ca ++, Fe ++, Ni ++, Cu ++, Co ++ y Mg ++. Los complejos conjugados de compuesto de catión-insulina también incluyen un resto modificador acoplado (por ejemplo, covalente o iónicamente) al compuesto de insulina para proporcionar un compuesto de insulina conjugado. Además, el resto modificador se selecciona para hacer que el compuesto de insulina conjugado sea igual o más soluble que un compuesto de insulina no conjugado correspondiente, y la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye mediante la adición de cinc. El resto modificador se selecciona para hacer que el compuesto de insulina conjugado sea igual o más soluble que un compuesto de insulina no conjugado correspondiente; la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición de zinc; y la solubilidad en agua del complejo es mayor que la solubilidad en agua del compuesto de insulina.

45 Ejemplos de restos modificadores adecuados y conjugados de insulina útiles en la preparación de composiciones se pueden encontrar en la patente de EE.UU. Nos. 7,060,675, 6,303,569, 6,214,330, 6,113,906, 5,985,263, 5,900,402, 5,681,811, 5,637,749, 5,612,640, 5,567,422, 5,405,877, 5,359,030 cuyas divulgaciones completas se incorporan aquí como referencia. Se proporcionan ejemplos adicionales de tales complejos de conjugados de compuesto de catión-insulina en las solicitudes de patente de EE. UU. US2003/083232, US 2006/0019873 y US2006/0019874.

50 A diferencia de la técnica anterior existente, los compuestos de la presente invención exhiben un potencial mitogénico reducido que es casi tres veces menor que el de Insugen®.

La insulina se une y activa su afín, el receptor de insulina (IR) con afinidad subnanomolar. La insulina también se une al receptor del factor de crecimiento de insulina (IGFR) relacionado estructuralmente, pero con una afinidad 1000 veces menor que el receptor de insulina. En las concentraciones fisiológicas de insulina, el IGFR, por lo tanto, no desempeña ningún papel en la mediación de los efectos de la insulina. Sin embargo, a concentraciones de insulina muy altas (pacientes diabéticos que reciben insulina) ejerce efectos mitogénicos a través del IGFR que transmite estímulos de crecimiento de manera más eficiente que el receptor de insulina (Lammers R, y col., EMBO 1989).

60 Uno de los análogos de insulina identificados anteriormente con modificación en el residuo de ácido aspártico B10 estaba destinado a proporcionar un efecto de insulina de acción rápida, sin embargo, la modificación a su vez condujo a un aumento significativo en la mitogenicidad de ese análogo [Drejer, K., The bioactivity of insulin analogues from in vitro receptor binding to in vivo glucose uptake. Diabetes Metab Rev, 1992. 8(3): p. 259-85]. Se realizó un estudio para estudiar la unión de varios análogos de insulina al receptor del factor 1 de crecimiento de insulina (IGF-1) y al receptor de insulina. Las constantes de unión se midieron y correlacionaron con la potencia

metabólica y mitogénica de los análogos de insulina estudiados [Kurtzhals, P., et al., Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes*, 2000.49(6): p. 999-1005.] Según los estudios realizados, en comparación con la insulina regular, la insulina lispro, la insulina aspart y la insulina glargina tuvieron un cambio mínimo en la unión al receptor de insulina, mientras que la insulina detemir fue significativamente menor. Cada uno de estos análogos tenía velocidades de disociación similares o aumentadas del receptor de IGF, que se correlacionaba con su comportamiento mitogénico.

La potencia mitogénica de proteínas/péptidos y sus conjugados, complejos conjugados catión-péptido, complejos conjugados de catión-insulina son de principal interés atribuidos al riesgo de aumento de la mitogenicidad y el crecimiento de las células epiteliales mamarias humanas. Los estudios han demostrado que la unión de IGF-1 de insulina aspart fue similar a la de la insulina humana nativa. Insulina lispro e insulina glargina tuvieron un aumento de 1.5 a 6.5 veces en la afinidad de unión al receptor de IGF-1, lo que implica que la insulina glargina tiene una respuesta mitogénica significativamente mayor.

Los efectos a largo plazo de las propiedades mitogénicas de los análogos de insulina, sus conjugados, los complejos conjugados de catión-péptido, los complejos conjugados de catión-insulina continúan siendo un factor importante a considerar. 'Points to consider document CPMP/SWP/372/01 on the non-clinical assessment of the carcinogenic potential of insulin analogues states: "La insulina humana nativa tiene, además de sus acciones metabólicas, un efecto mitogénico débil. Este efecto se ha vuelto importante para la seguridad de los análogos de insulina, ya que las modificaciones estructurales de la molécula de insulina podrían aumentar la potencia mitogénica, posiblemente dando como resultado la estimulación del crecimiento de neoplasmas preexistentes. "Aunque se ha implicado la activación del receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) y/o la señalización aberrante a través del receptor de insulina, aún no se han aclarado los mecanismos responsables de la actividad mitogénica de los análogos de insulina"

Como evidencia de que el IGF-1 promueve el crecimiento de cáncer de colon, mama, próstata y pulmón, existe la necesidad del desarrollo de proteínas/péptidos y sus conjugados, complejos conjugados de catión-péptido, complejos conjugados de catión-insulina con un riesgo mitogénico mínimo que se evalúa en un ensayo de proliferación celular y que puede denominarse seguro para la terapia a largo plazo.

La presente invención se refiere a proteínas/péptidos, sus conjugados y/o complejos catiónicos conjugados con polipéptidos que presentan tres propiedades mitogénicas inferiores en comparación con Insugen). Otros aspectos de la presente invención se refieren al hecho de que los excipientes en el producto farmacológico no afectan estadísticamente a las características de potencia mitogénica de la sustancia farmacológica.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas improvisadas que permiten la ingestión mediante administración oral de proteínas/péptidos o sus conjugados, y/o complejos de conjugado catión-insulina que demuestran perfiles farmacocinéticos deseables y potencia en modelos de eficacia de diabetes en perros y humanos.

El documento WO00/50012 describe formas de dosificación oral sólidas que comprenden un fármaco y un potenciador, en donde el potenciador es una sal de un ácido graso de cadena media con una longitud de cadena de carbono de aproximadamente 6-20 átomos de carbono. El documento US2006/0018874 cubre una composición farmacéutica sólida formulada para administración oral por ingestión, que tiene de 0.1 a 75% p/p de componente de ácido graso, donde el componente de ácido graso comprende ácidos grasos saturados o insaturados y/o sales y un agente terapéutico.

El documento WO 2006/014673 divulga tabletas que comprenden IN-105, caprato de sodio, laurato de sodio, mauritol y gicolato de almidón de sodio como desintegrante. A pesar de lo anterior, todavía existe la necesidad de fabricar formulaciones viables de insulina oral que puedan superar los problemas asociados con la pérdida de actividad biológica durante la fabricación y al mismo tiempo exhiban resistencia mejorada a la degradación enzimática in vivo después de la ingestión. La presente invención aborda ambos requisitos. De este modo, la invención aborda los problemas que se enfrentan en la técnica para diseñar un mecanismo de administración de fármaco conjugado de insulina oral altamente eficaz.

La invención presenta varias ventajas con respecto a la dosificación y al método de administración conveniente. La invención constituye otra ventaja más sobre las composiciones de la técnica anterior ya que los inventores proponen que la formulación oral de la IN-105 racionalmente diseñada reivindicada con componentes medidos de otros excipientes y el proceso de fabricación de las tabletas administrables por vía oral son fácilmente escalables. Además, atribuido a esta formulación oral racionalmente diseñada y al proceso de hacer lo mismo, el factor de escalabilidad no afecta el rendimiento del fármaco in vivo o su perfil de liberación in vivo.

Las formulaciones de insulina oral disponibles actualmente exhiben bajos niveles de estabilidad que excluyen las posibilidades de administración oral de tales agentes terapéuticos. Uno de los aspectos más significativos de la presente invención se caracteriza porque la formulación de insulina oral instantánea es estable en un rango de temperatura sin impactar adversamente varios parámetros de la estabilidad de la tableta tales como dureza, tiempo

de desintegración, acumulación de impurezas de alto peso molecular y tasa de disolución. Las tabletas así fabricadas muestran excelente estabilidad incluso en condiciones de estabilidad acelerada de 40°C/75% de humedad relativa. Las características estables inherentes de la molécula y los métodos de fabricación se atribuyen a la naturaleza estable de la formulación.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas mejoradas de complejos de catión-insulina conjugados preparados mediante un procedimiento de secado por pulverización escalable, comprendiendo dicho proceso pasos de preparar una suspensión acuosa del complejo conjugado catión-insulina y al menos un componente de ácido graso con opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un proceso típico para partículas finas que usa un proceso de secado por pulverización, el material, tal como el ingrediente que está destinado a formar la mayor parte de la partícula se disuelve en un disolvente apropiado para formar una solución. Alternativamente, el material destinado a ser secado por pulverización puede suspenderse o emulsionarse en un no disolvente para formar una suspensión o emulsión. Otros componentes, tales como fármacos, excipientes farmacéuticamente aceptables o agentes formadores de poros se añaden opcionalmente en este paso. La solución luego se atomiza para formar una fina niebla de gotitas. Las gotitas entran inmediatamente en una cámara de secado donde entran en contacto con un gas de secado. El disolvente se evapora de las gotitas al gas de secado para solidificar las gotitas, formando así partículas. Estas partículas luego se separan del gas de secado y se recogen.

Al escalar tal proceso de secado por pulverización, por ejemplo, desde el laboratorio a una planta piloto escala hasta la escala comercial de la planta, se pueden encontrar ciertos problemas. Si la velocidad de secado y la capacidad de secado no se optimizan adecuadamente, pueden surgir problemas indeseables tales como un secado inadecuado de las partículas de disolvente, un rendimiento del producto reducido, pureza, etc. Por otro lado, el aumento de la velocidad de secado que no se escala adecuadamente puede dar como resultado una morfología de partícula y/o una distribución de tamaño inadecuadas para algunas partículas de producto, como las que tienen especificaciones de rendimiento definidas críticamente. Más significativamente, también puede alterar la forma en que el material de formación de sólidos precipita a medida que se evapora el solvente, cambiando así la estructura (por ejemplo, porosidad) de la partícula fuera de los estándares de especificación, haciendo que la partícula no pueda contener y entregar un agente de diagnóstico o terapéutico.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un proceso mejorado de secado por pulverización que dé como resultado la producción de dispersiones sólidas amorfas homogéneas con alta pureza con características de flujo mejoradas, uniformidad de contenido mejorado y eficacia de recogida mejorada.

Uno de los objetos de la presente invención es proporcionar composiciones secadas por pulverización de complejos conjugados de catión-insulina que implican un proceso de secado que proporciona un secado mejorado de las partículas sin impactar negativamente en la pureza, el rendimiento y la estabilidad del producto. El proceso actual produce partículas sólidas secadas por pulverización homogéneas del agente terapéutico diana que se formula adicionalmente con otros excipientes necesarios para producir composiciones farmacéuticas orales de complejos conjugados de catión-insulina.

Otros objetos y ventajas de la presente invención serán más evidentes para los expertos en la técnica, a la luz de la siguiente divulgación y de las reivindicaciones adjuntas.

OBJETOS DE LA INVENCION

El objetivo principal de la presente invención es desarrollar una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de un complejo conjugado catión-insulina que comprende ácidos grasos C₄-C₁₂ saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sus sales y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que comprende aglutinantes, plastificantes, potenciadores de permeación y solubilizantes.

Otro objeto de la presente invención es desarrollar una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral, en la que la forma de dosificación oral está en forma de una tableta, cápsula, partículas, polvo o bolsita o suspensiones secas.

Otro objeto más de la presente invención es desarrollar un proceso para fabricar una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de IN-105.

Otro objeto más de la presente invención es desarrollar una composición de tableta de IN-105.

Todavía otro objeto de la presente invención es desarrollar una dosis de la composición farmacéutica sólida administrable por vía oral, para lograr un control máximo de la concentración de glucosa en sangre postprandial en pacientes diabéticos dentro de los 5-60 minutos posteriores a la administración.

Todavía otro objeto de la presente invención es desarrollar una composición farmacéutica administrable por vía oral de IN-105, caracterizada porque dicha composición permanece estable.

5 Otro objeto más de la presente invención es desarrollar un método para preparar partículas secas por pulverización amorfas.

Otro objeto más de la presente invención es desarrollar una composición farmacéutica de IN-105, en la que este exhibe una mitogenicidad reducida tres veces en comparación con su contraparte nativa.

10 Todavía otro objeto de la presente invención es desarrollar una composición farmacéutica que comprenda el complejo conjugado catión-péptido en el que los excipientes no afecten a la potencia mitogénica del conjugado.

DECLARACIÓN DE LA INVENCION

15 Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral, según la reivindicación 1, un proceso para fabricar una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de IN-105, según la reivindicación 9 60% p/p de ácidos grasos C4 - C12 saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sales de los mismos y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de permeación y solubilizantes que comprenden los pasos de a) triturar ácidos grasos C₄-C₁₂ saturados o insaturados adecuados y/o sales de tales ácidos grasos, b) granular el ácido graso resultante obtenido del paso (a) con un disolvente orgánico, c) secar al aire los gránulos obtenidos del paso (b), d) raspar los gránulos secos a través de una malla para obtener gránulos del tamaño de partícula deseado, e) mezclar los gránulos de ácido graso con el complejo de conjugado catión-insulina con los otros excipientes, f) comprimir la mezcla combinada para la formación de tableta; un proceso para fabricar una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de IN105, que comprende aproximadamente 0.01% - 20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos saturados o insaturados C4-C12, ésteres de ácidos grasos o sus sales y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de permeación y solubilizantes que comprenden los pasos de a) triturar ácidos grasos C4-C12 saturados o insaturados adecuados y/o sales de tales ácidos grasos y un aglutinante, b) suspender el complejo conjugado catión-insulina en un disolvente orgánico usando el aglutinante para formar una masa húmeda, c) granulación de los componentes obtenidos del paso (b) usando el aglutinante, d) Raspar los gránulos secos del paso (c), e) mezclar los gránulos con otros excipientes, f) comprimir un método para preparar partículas secas por pulverización amorfas de acuerdo con la reivindicación 12.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40 FIG. 1: perfil de insulina plasmático medio: tabletas de formulación IN-105 (FDT-3)

FIG. 2: perfil de glucosa normalizado en la administración de FDT-3

FIG. 3: perfil de insulina plasmática promedio: tabletas de formulación IN-105 (FDT-19)

45 FIG. 4: Perfil de glucosa normalizado en la administración de FDT-19

FIG. 5: perfil de insulina plasmática promedio - tabletas de formulación IN-105 (FDT-20)

50 FIG. 6: perfil de glucosa después de la administración de FDT-20

FIG. 7: perfil de insulina en plasma

FIG. 8: Perfil de frecuencia de infusión de glucosa

55 FIG. 9: Perfil de glucosa en plasma

FIG. 10: Paralelismo y linealidad del bioensayo a través de diversas concentraciones de Insugen (R) e IN105 determinadas por el software PLA. Los datos representan \pm SEM promedio de valores por triplicado de un experimento.

60 FIG. 11: Potencia mitogénica de Insugen en comparación con IN-105 y HIM-2 del análisis de PLA utilizando 4 puntos en un rango lineal.

65 FIG. 12: Paralelismo y linealidad del bioensayo a través de diversas concentraciones de Insugen (R) frente a IN105 (A) e Insugen frente a HIM-2 (B) determinado por el software PLA. Los datos representan \pm SEM promedio de valores por triplicado de un experimento.

FIG. 13: Actividad mitogénica de IN-105 dializada en comparación con IN-105 en polvo para el análisis de PLA utilizando 4 puntos en un rango lineal.

FIG. 14: Comparación de la potencia metabólica entre Insugen (R), IN105 y HIM-2.

FIG 15: Paralelismo y linealidad del bioensayo a través de diversas concentraciones de Insugen (R) frente a IN105 (A) e Insugen frente a HIM-2 (B) determinado por el software PLA. Los datos representan \pm SEM promedio de valores por triplicado de un experimento.

FIG 16: Curvas de competencia de un sitio de (A) Insugen (R), (B) IN105 y (C) HIM-2, respectivamente. Las curvas fueron determinadas por el software Graph Pad versión-4. Los datos representan el promedio de valores por triplicado de un experimento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de in-105 que comprende aproximadamente 0.01% - 20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% 60% p/p de ácidos grasos C4-C12 saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sus sales y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste de al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes potenciadores de permeación y solubilizantes, en donde el lubricante es estearato de magnesio

En otra realización de la presente invención, el componente de ácido graso es ácido cáprico y/o ácido láurico o sus sales.

En aún otra realización de la presente invención, el ácido graso es caprato de sodio.

En aún otra realización de la presente invención, el aglutinante se selecciona del grupo que comprende povidona, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, almidón, gelatina, azúcares, gomas naturales y sintéticas o sus combinaciones.

En aún otra realización de la presente invención, el aglutinante es polivinilpirrolidona.

En otra realización más de la presente invención, los diluyentes se seleccionan del grupo que comprende sales de calcio, celulosa o derivados de celulosa, palatinosa, ácidos orgánicos, azúcar y alcoholes de azúcar, sales de pectato o combinaciones de los mismos.

En aún otra realización de la presente invención, el diluyente es manitol.

En aún otra realización de la presente invención, el disgregante se selecciona del grupo que comprende povidona reticulada, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, resinas de intercambio catiónico, ácido alginico, goma guar o sus combinaciones.

En otra realización más de la presente invención, el lubricante se selecciona del grupo que comprende estearato de magnesio, estearato de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, ácido fumárico, polietilenglicoles, alanina y glicina.

En aún otra realización de la presente invención, el lubricante es estearato de magnesio.

En aún otra realización de la presente invención, el potenciador de permeación se selecciona del grupo que comprende lauril sulfato sódico, laurato sódico, palmitoil carnitina, fosfatidilcolina, ciclodextrina y derivados de los mismos, carnitina y sus derivados, polímeros mucoadhesivos, toxina zonula occludins, sales biliares, ácidos grasos o combinaciones de los mismos.

En aún otra realización de la presente invención, el potenciador de permeación es lauril sulfato de sodio.

En aún otra realización de la presente invención, el potenciador de permeación es beta-ciclodextrina.

En otra realización más de la presente invención, el plastificante se selecciona del grupo que comprende polietilenglicol, propilenglicol, citrato de acetilo, triacetina, monoglicérido acetilado, aceite de colza, aceite de oliva, aceite de sésamo, citrato de acetiltriethyl, sorbitol de glicerina, dietiloxalato, dietilmalato, dietilfumarato, dibutilsuccinato, dibutilftalato, dioctilftalato, dibutylsebacato, trietilcitrato, tributilcitrato, gliceroltributirato, gliceriltriacetato o mezclas de los mismos.

En otra realización más de la presente invención, el plastificante es polietilenglicol.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica administrable por vía oral en la que la forma de dosificación oral está en forma de una tableta, cápsula, partículas, polvo o bolsita o suspensiones secas.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para fabricar una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral, que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de Ácidos grasos C4 - C12 saturado o insaturado, ésteres de ácidos grasos o sales de los mismos y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante, en el que el lubricante es estearato de magnesio, que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de permeación y solubilizantes que comprenden los pasos de

- a. Triturar ácidos grasos C4-C12 saturados o insaturados adecuados y/o sales de tales ácidos grasos.
- b. Granular el ácido graso resultante obtenido del paso (a) con un disolvente orgánico
- c. Secar al aire los gránulos obtenidos del paso (b).
- d. Raspar los gránulos secos a través de una malla para obtener gránulos del tamaño de partícula deseado.
- e. Mezclar los gránulos de ácido graso con el complejo de conjugado catión-insulina con los otros excipientes.
- f. Comprimir la mezcla combinada para la formación de comprimidos.

La presente invención también está relacionada con un proceso para fabricar una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral, que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos C4 - C12 saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sus sales y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante, en el que el lubricante es estearato de magnesio, que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de permeación y solubilizantes que comprenden los pasos de

- a) Triturar ácidos grasos C4-C12 saturados o insaturados y/o sales de tales ácidos grasos y un aglutinante.
- b) Suspender el complejo de conjugado catión-insulina en un disolvente orgánico utilizando el aglutinante para formar una masa húmeda.
- c) Granulación de los componentes obtenidos del paso (b) usando el aglutinante.
- d) raspar los gránulos secos del paso (c).
- e) Mezclar los gránulos con otros excipientes.
- f) Comprimir la mezcla combinada para la formación de tabletas.

En otra realización más de la presente invención, el disolvente orgánico utilizado se selecciona del grupo que comprende isopropanol, acetona, alcohol metílico, metil isobutil cetona, cloroformo, 1-propanol, 2-propanol, acetonitrilo, 1-butanol, 2- butanol, alcohol etílico, ciclohexano, dioxano, acetato de etilo, dimetilformamida, dicloroetano, hexano, isooctano, cloruro de metileno, alcohol terc-butílico, tolueno, tetracloruro de carbono o combinaciones de los mismos.

La presente invención también está relacionada con una tableta de 5-500 mg de una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de IN-105 que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos C4 - C12 saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sales de los mismos y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante, en el que el lubricante es estearato de magnesio, que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de permeación y solubilizantes.

La presente invención también está relacionada con una tableta de 50 mg de una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de IN-105 que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos C4 - C12 saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sales de los mismos y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5 % p/p de un lubricante, en el que el lubricante es estearato de magnesio, que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de la permeación y solubilizantes.

La presente invención también está relacionada con una tableta de 100 mg de una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de IN-105 que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos C4 - C12 saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sales de los mismos y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5 % p/p de un lubricante, en el que el lubricante es estearato de magnesio, que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de la permeación y solubilizantes.

La presente invención también está relacionada con una tableta de 150 mg de una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de IN-105 que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-105,

aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos C4 - C12 saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sales de los mismos y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante, en el que el lubricante es estearato de magnesio, que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de la permeación y solubilizantes.

La presente invención también está relacionada con una tableta de 200 mg de una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de IN-105 que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos C4 - C12 saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sales de los mismos y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante, en el que el lubricante es estearato de magnesio, que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de la permeación y solubilizantes.

La presente invención también está relacionada con una tableta de 250 mg de una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de IN-105 que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos C4 - C12 saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sales de los mismos y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante, en el que el lubricante es estearato de magnesio, que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de la permeación y solubilizantes.

La presente invención también está relacionada con una dosis de la composición farmacéutica sólida administrable por vía oral para lograr un control máximo de la concentración de glucosa sanguínea posprandial en pacientes diabéticos dentro de los 5-60 minutos posteriores a la administración.

En otra realización de la presente invención, la composición farmacéutica sólida administrable por vía oral produce una glucosa sérica disminuida en pacientes humanos en al menos un 5% con 120 minutos tras la administración oral.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral estable de IN-105 que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos C4 - C12 saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sus sales y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p w de un lubricante, en el que el lubricante es estearato de magnesio, que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de la permeación y solubilizantes caracterizados porque dicha composición permanece estable por exposición a las condiciones seleccionadas del grupo que comprende

(a) rango de temperatura de aproximadamente 2-40 °C

a. 25 °C ± 2 °C /60% ± 5% de humedad relativa (HR), 30 °C ± 2 °C /65% ± 5% de humedad relativa, 40 °C ± 2 °C /75% ± 5% de humedad relativa durante un período de al menos 6 meses.

En otra realización de la presente invención, las impurezas no aumentan en más de 5% cuando se comparan con los niveles de impurezas en el momento de la fabricación.

En aún otra realización de la presente invención, las impurezas no aumentan en más de 10% cuando se comparan con los niveles de impurezas en el momento de la fabricación.

Todavía en otra realización de la presente invención, el ensayo del compuesto en la composición no disminuye en más del 10%.

En otra realización más de la presente invención, el perfil de disolución es al menos del 75% en cualquier intervalo de tiempo mencionado.

En aún otra realización de la presente invención, el intervalo de tiempo varía durante un período de más de 2 años.

En otra realización más de la presente invención, la diferencia entre el perfil de dureza no es más de 1 kg/cm² cuando se compara con el perfil de dureza en el momento de la fabricación.

En aún otra realización de la presente invención, al menos el 95% ± 2% de la composición permanece sin degradar por la exposición a condiciones seleccionadas del grupo que comprende

(a) rango de temperatura de aproximadamente 2-8 °C o 25 °C - 40 °C

(b) 25 °C ± 2 °C /60% ± 5% de humedad relativa (HR), 30 °C ± 2 °C /65% ± 5% de humedad relativa, 40 °C ± 2 °C /75% ± 5% de humedad relativa durante un período de al menos 6 meses.

En aún otra realización de la presente invención, al menos el 90% \pm 2% de la composición permanece sin degradar por la exposición a condiciones seleccionadas del grupo que comprende

- 5 (a) rango de temperatura de aproximadamente 2- 8 °C o 25 °C - 40 °C
 (b) 25 °C \pm 2 °C /60% \pm 5% de humedad relativa (HR), 30 °C \pm 2 °C /65% \pm 5% de humedad relativa, 40 °C \pm 2 °C /75% \pm 5 % de humedad relativa durante un período de al menos 6 meses.

10 Un método para preparar partículas secas por aspersión amorfas que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos C4-C12 saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sales de los mismos y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un disgregante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante, en donde el lubricante es estearato de magnesio, que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de permeación y solubilizantes, dicho método comprende los pasos de

- 15 a. Preparar una solución o suspensión que comprende el conjugado de compuesto de catión-insulina y un componente de ácido graso en un disolvente.
 b. Rociar la solución en una cámara en condiciones que permitan que se elimine una cantidad sustancial del solvente
 20 c. Proporcionar partículas secadas por pulverización del conjugado compuesto de catión-insulina.

En otra realización más de la presente invención, el componente de ácido graso se selecciona de un grupo que comprende ácido graso C4-C12 y/o sales de dicho ácido graso.

25 En aún otra realización de la presente invención, el componente de ácido graso es caprato de sodio.

En otra realización más de la presente invención, el disolvente es agua.

30 En otra realización más de la presente invención, la solución o suspensión que comprende IN 105 y un componente de ácido graso en un disolvente comprende además un diluyente.

En aún otra realización de la presente invención, el diluyente es manitol.

35 En aún otra realización de la presente invención, el tamaño de las partículas secadas por pulverización es de aproximadamente 1-100 μ .

En otra realización más de la presente invención, la solución o suspensión que comprende el IN105 se seca por pulverización a una temperatura que oscila entre 80 °C - 150 °C.

40 En otra realización más de la presente invención, la presión de atomización empleada para el secado por pulverización está en el intervalo de 0.5 kg/cm² a 1.5 kg/cm².

En aún otra realización de la presente invención, la pureza de la composición secada por pulverización de IN105 es al menos 95%.

45 En aún otra realización de la presente invención, la pureza de la composición secada por pulverización de IN 105 es al menos 98%.

En aún otra realización de la presente invención, la pureza de la composición secada por pulverización de IN 105 es al menos 99%.

50 La presente invención también está relacionada con una composición farmacéutica insulínica de IN-105 que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos C4-C12 saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sales de los mismos y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10%
 55 p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante incluyendo opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de permeación y solubilizantes caracterizados porque exhiben una mitogénesis tres veces menor en comparación con su contraparte nativa.

60 En otra realización más de la presente invención, la composición farmacéutica insulínica de IN105 reduce la proliferación celular in vitro y/o in vivo a al menos 20% \pm 5% de su contraparte nativa.

En otra realización más de la presente invención, la composición farmacéutica insulínica de IN105 reduce la proliferación celular in vitro y/o in vivo al menos 2% \pm 0.5% la de su contraparte nativa.

65 En otra realización más de la presente invención, la composición muestra una eficacia metabólica similar a la de su contraparte nativa.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende aproximadamente 0.01% - 20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos saturados o insaturados C4-C12, ésteres de ácidos grasos o sales de los mismos y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante, en donde el lubricante es estearato de magnesio, que incluye opcionalmente aglutinantes, plastificantes, potenciadores de la permeación y solubilizantes, dicha composición se caracteriza porque los excipientes no afectan la potencia mitogénica del conjugado.

El objeto principal de la invención es proporcionar una formulación de liberación inmediata que comprenda proteínas/péptidos, sus conjugados y/o complejos de conjugados catión-polipéptido que demuestren perfiles farmacocinéticos deseables y potencia en modelos de eficacia de la diabetes en humanos tras la administración oral.

El estado actual de la técnica reconoce la inestabilidad de la insulina no modificada en el tracto gastrointestinal y se ha esforzado por eludir estos problemas desarrollando una formulación diseñada racionalmente para su liberación inmediata.

Los complejos conjugados catión-péptido, los complejos conjugados de catión-insulina de la presente invención se caracterizan por demostrar potencias mitogénicas reducidas. Los conjugados descritos en la presente invención son ventajosos debido al hecho de que existe un riesgo relativamente menor o nulo de inducción de reacciones mitogénicas incluso después del uso a largo plazo y, por lo tanto, pueden usarse de forma segura para terapia a largo plazo y para el tratamiento de la diabetes. Los compuestos terapéuticos de la presente invención se caracterizan por demostrar una potencia mitogénica tres veces reducida en comparación con Insugen (R).

De acuerdo con un aspecto significativo de la presente invención, los excipientes en el producto farmacológico no afectan a las características mitogénicas de la sustancia farmacológica y, por lo tanto, la formulación o composición permanece relativamente con menos potencia mitogénica cuando se compara con los productos terapéuticos de insulina actualmente comercializados.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una formulación de liberación inmediata que comprenda proteínas/péptidos, sus conjugados y/o complejos conjugados de catión-polipéptido que muestren estabilidad en un intervalo de temperaturas durante intervalos de tiempo que se extienden hasta 12 meses. La formulación desarrollada actualmente es estable a temperatura ambiente y también exhibe estabilidad a temperaturas elevadas.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la composición farmacéutica así fabricada se evalúa en diferentes condiciones de prueba de temperaturas y relativas para intervalos de tiempo que se extienden hasta 12 meses.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a una formulación administrable por vía oral que comprende 0.01% - 20% p/p de insulina, conjugados de insulina compuesto y/o conjugados de insulina catiónica, 10% - 60% p/p de uno o más componentes de ácidos grasos componentes de ácidos grasos seleccionados de ácidos grasos C4-C12 saturados o insaturados y/o sales de tales ácidos grasos, 10% - 60% p/p de un diluyente, 1% - 20% de disgregante, 0.01% - 5% de aglutinante y 0.01% - 5% de adsorbente que incluye, pero no se limita a, otros vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados.

Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a una formulación que comprende al menos un compuesto biológicamente activo seleccionado entre conjugados de insulina derivados, análogos de insulina, complejos de insulina que incluyen, pero no se limitan a, otros agentes terapéuticos con actividad similar a la insulina.

En otro aspecto más, la invención proporciona un proceso de fabricación de las formulaciones administrables por vía oral mencionadas anteriormente en condiciones operativas óptimas con excipientes adecuados que mejoran la resistencia del agente terapéuticamente activo a la degradación.

En otro aspecto preferido, el proceso de fabricación de la tableta administrable por vía oral que comprende al menos un compuesto biológicamente activo seleccionado de proteínas/péptidos, sus conjugados y/o complejos de conjugados catión-polipéptido que poseen resistencia a la degradación enzimática comprende los pasos:

1. Triturar un ácido graso C4-C12 saturado o insaturado adecuado y/o sales de dicho ácido graso.
2. Granular el ácido graso resultante obtenido del paso (1) con un disolvente orgánico.
3. Secar al aire los gránulos obtenidos del paso (2).
4. Raspar los gránulos secos a través de una malla para obtener gránulos del tamaño deseado de aproximadamente 250 µm.
5. Mezclar los gránulos de ácido graso, conjugado de compuesto de catión-insulina con otros excipientes.
6. Comprimir la mezcla combinada para la formación de tabletas.

De acuerdo con los objetos anteriores y otros, la invención se dirige en parte a una forma de dosificación sólida oral que comprende una dosis de insulina modificada que consigue un control máximo de la concentración de glucosa en sangre postprandial en pacientes diabéticos en 20-30 minutos después de la administración.

Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Las dosificaciones preferidas para un compuesto dado son fácilmente determinables por los expertos en la técnica por una variedad de medios.

- 5 Un medio preferido es medir la potencia fisiológica de un compuesto dado. La forma de unidad de dosificación puede ser un líquido o un sólido, tal como una tableta, cápsula o partículas, incluyendo un polvo o bolsita.

La presente invención también se refiere a un proceso improvisado de secado por pulverización que da como resultado la producción de partículas secadas por pulverización de 1 – 100 μ que contienen el fármaco terapéutico con al menos uno de los excipientes farmacéuticamente aceptables. El proceso implica (a) la preparación de una solución que contiene fármaco terapéutico y opcionalmente un diluyente de concentración entre 0.001% y 20% p/p, opcionalmente 10% - 60% p/p de uno o más componentes de ácidos grasos seleccionados de ácidos grasos C4-C12 saturados o insaturados y/o sales de tales ácidos grasos (b) secar por pulverización la suspensión resultante para formar un polvo secado por pulverización. El aspecto posterior de la invención se refiere a la combinación del otro excipiente farmacéutico con el polvo secado por pulverización que se comprime en forma de tableta.

Los métodos de la invención pueden proporcionar, por ejemplo, la capacidad de generar partículas sólidas homogéneas con agente terapéutico dadas las condiciones que conducen a proporcionar una eficacia de evaporación incrementada por entrada de calor determinada. El método para preparar tales partículas en polvo en la invención puede comprender, por ejemplo, preparar una suspensión acuosa o solución de un material bioactivo que forma una mezcla de la solución o suspensión, pulverizar gotas ultrafinas despresurizando la mezcla y secando las gotitas en partículas en polvo intercambiando los gases de pulverización con gases de secado, por ejemplo, por pulverización en una cámara de secado del aparato de pulverización en seco.

- 25 Otros objetos y ventajas de la presente invención serán más evidentes para los expertos en la técnica, a la luz de la siguiente divulgación y de las reivindicaciones adjuntas.

DEFINICIONES:

- 30 Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones establecidas en este documento.

El "conjugado de compuesto de catión- insulina" incluye cualquier componente de compuesto de insulina. El compuesto de insulina puede ser, por ejemplo, un compuesto de insulina de mamífero, tal como insulina humana, o derivados o análogos de compuestos de insulina. El agente terapéutico se refiere específicamente a la molécula IN-105. IN-105 es una molécula de insulina conjugada en el aminoácido épsilon lisina en la posición B29 de la cadena B de insulina con un oligómero anfifílico de fórmula estructural $\text{CH}_3\text{O}-(\text{C}_4\text{H}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$. La molécula puede estar monoconjugada en A1, B1 y B29, di-conjugada en diversas combinaciones de A1, B1 y B29, o triconjugada en diversas combinaciones de A1, B1 y B29. "Cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de insulina incluida en las formas de dosificación de la invención que es suficiente para lograr un control clínicamente relevante de las concentraciones de glucosa en sangre en un paciente diabético humano en ayunas o en estado de alimentación efectivo, durante el intervalo de dosificación.

45 Como se usa en el presente documento, los "diluyentes"/"rellenos"/ "agentes de carga" son sustancias inertes añadidas para aumentar la masa de la formulación para hacer que la tableta tenga un tamaño práctico para la compresión. Los diluyentes usados comúnmente contemplados para uso en la presente invención incluyen alcoholes de azúcar, ácidos orgánicos, galen IQ, palatinosa, celulosa y derivados de celulosa, fosfato de calcio, sulfato de calcio, lactosa, caolín, manitol, cloruro de sodio, almidón seco, azúcar en polvo, sílice, y similares.

50 Como se usa en el presente documento, los "aglutinantes" son agentes usados para impartir cualidades de cohesión al material en polvo. Los aglutinantes, o "granuladores" como se conocen a veces, imparten cohesión a la formulación de la tableta, lo que asegura que la tableta permanezca intacta después de la compresión, así como mejorar las cualidades de fluidez mediante la formulación de gránulos de dureza y tamaño deseados. Los materiales comúnmente utilizados como aglutinantes incluyen carboximetilcelulosa, metilcelulosa, povidona, almidón; gelatina; azúcares, tales como sacarosa, glucosa, dextrosa, melazas y lactosa; gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábica, alginato de sodio, extracto de musgo irlandés, goma de panwar, goma ghatti, mucílago de cáscaras de isapol, Veegum, celulosa microcristalina, dextrosa microcristalina, amilosa y arabogalactano de alerce, y similares. La povidona se usa en el contexto de la presente invención.

60 Como se usa en el presente documento, los "desintegradores" o "disgregantes" son sustancias que facilitan la ruptura o facilitan la desintegración de las tabletas después de la administración. Los materiales que sirven como disgregantes se han clasificado químicamente como almidones, arcillas, celulosas, alginas o gomas. Otros desintegradores incluyen Veegum HV, metilcelulosa, agar, bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas de intercambio catiónico, ácido alginico, goma guar, pulpa de cítricos, livinpoilpirrolidona reticulada, carboximetilcelulosa y similares.

65

El "lubricante" puede seleccionarse del grupo que comprende estearato de magnesio, estearato de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, ácido fumárico, polietilenglicoles (PEG) superiores a 4000, alanina y glicina. El lubricante preferido en el contexto de la presente invención es estearato de magnesio o estearato de sodio.

5 "Estearato de magnesio" significa un compuesto de magnesio con una mezcla de ácidos orgánicos sólidos obtenidos de grasas, y consiste principalmente en proporciones variables de estearato de magnesio y palmitato de magnesio. Se utiliza como una necesidad farmacéutica (lubricante) en la fabricación de tabletas comprimidas.

10 "potenciadores de la permeación" significa cualquier compuesto que aumente la permeabilidad de la membrana y facilite el transporte del fármaco a través de la membrana biológica, mejorando de ese modo la biodisponibilidad del agente terapéutico suministrado. Los potenciadores de permeación de membrana adecuados incluyen tensioactivos tales como lauril sulfato de sodio, laurato de sodio, palmitoil carnitina, Laureth-9, fosfatidilcolina, ciclodextrina y sus derivados, sales biliares tales como glicolato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio y fusidato de sodio, agentes quelantes que incluyen EDTA, ácido cítrico y salicilatos, y ácidos grasos (por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, acilcarnitinas, mono y diglicéridos), L-carnitina y derivados, polímeros mucoadhesivos, ZOT (toxina de zonula occludans) o combinaciones de los mismos.

20 "Plastificantes" que se seleccionan del grupo que consiste en citrato de acetilo, triacetina, monoglicérido acetilado, aceite de colza, aceite de oliva, aceite de sésamo, citrato de acetiltriétilo, glicerol sorbitol, dietiloxalato, dietilmalato, dietilfumarato, dibutilsuccinato, ftalato de dibutilo, ftalato de dioctilo, dibutilsebacato, trietilcitrato, tributilcitrato, gliceroltributirato, gliceriltriacetato, polietilenglicol, propilenglicol y mezclas de los mismos. El plastificante es más preferiblemente polietilenglicol. El plastificante puede estar presente hasta 40% p/p del polímero formador de película. El plastificante representativo utilizado en el contexto de la presente invención es PEG (polietilenglicol)

25 "Polialquilenglicol" o "PAG" se refiere a polímeros de polialquilenglicol lineales o ramificados sustituidos o no sustituidos tales como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG) y polibutilenglicol (PBG), y combinaciones de los mismos (por ejemplo, polímeros lineales o ramificados que incluyen combinaciones de dos o más subunidades PAG diferentes, tales como dos o más unidades PAG diferentes seleccionadas de las subunidades PEG, PPG, PPG y PBG), e incluye el monoalquiléter del polialquilenglicol. El término subunidad PAG significa una única unidad PAG, por ejemplo, "subunidad PEG" se refiere a una única unidad de polietilenglicol, por ejemplo, - (CH₂CH₂O) -, "subunidad PPG" se refiere a una única unidad de polipropilenglicol, por ejemplo, - (CH₂CH₂CH₂O) -, y "subunidad PBG" se refiere a una única unidad de polibutilenglicol, por ejemplo, - (CH₂CH₂CH₂CH₂O) -. Las subunidades PAG y/o PAG también incluyen PAG sustituidas o subunidades PAG, por ejemplo, PAG que incluyen cadenas laterales de alquilo, tales como cadenas laterales de metilo, etilo o propilo, o cadenas laterales de carbonilo, así como PAG que incluyen una o más subunidades PAG ramificadas, tales como iso-PPG o iso-PBG.

"Solubilizantes" puede ser cualquier sustancia que mejore la solubilidad acuosa de un fármaco.

40 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" comprende uno o varios agentes seleccionados del grupo que consiste en hidratos de carbono y carbohidratos modificados y sus derivados, polietileno y/o polipropilenglicol y sus derivados, cargas inorgánicas o agentes lubricantes, ácidos grasos y sus ésteres y sales, conservantes y agentes de recubrimiento.

45 Como se menciona en la memoria descriptiva "cantidad eficaz" significa una cantidad de cualquier agente que no es tóxica pero suficiente para proporcionar el efecto y el rendimiento local o sistémico deseado a una relación beneficio/riesgo razonable que atiende a cualquier tratamiento médico. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un lubricante es una cantidad suficiente para funcionar para lubricar la composición y con fines de formación de tabletas sin proporcionar ningún efecto perjudicial.

50 En el contexto de la presente invención, los "disolventes orgánicos" se refieren a cualquier disolvente de origen no acuoso, que incluye polímeros líquidos y mezclas de los mismos. Los disolventes orgánicos adecuados para la presente invención incluyen: acetona, alcohol metílico, metilisobutilcetona, cloroformo, 1-propanol, isopropanol, 2-propanol, acetonitrilo, 1-butanol, 2-butanol, alcohol etílico, ciclohexano, dioxano, acetato de etilo, dimetilformamida, dicloroetano, hexano, isooctano, cloruro de metileno, alcohol tercbutílico, tolueno, tetracloruro de carbono o combinaciones de los mismos.

"Ensayo" puede ser una prueba de laboratorio para encontrar y medir la cantidad de una sustancia específica.

60 Las "impurezas" pueden definirse como componentes que no forman parte de la formulación nativa y que provocan la impureza de la calidad o el estado de la composición, atribuidos esencialmente por una o una combinación de cualquiera de las siguientes características:

- a. Contaminación o polución.
- b. Falta de consistencia u homogeneidad; adulteración.
- 65 c. Algo que hace que otra cosa sea impura; un componente o aditivo inferior

- La "prueba de disolución" se proporciona para determinar el cumplimiento de los requisitos de disolución según se indica en la monografía individual para una forma de dosificación de tableta o cápsula. La disolución de tableta es un método estandarizado para medir la tasa de liberación de fármaco desde una forma de dosificación. La función principal de la prueba de disolución puede resumirse con atributos tales como a) Optimización de la eficacia terapéutica durante el desarrollo del producto y la evaluación de estabilidad b) Evaluación rutinaria de la calidad de producción para garantizar la uniformidad entre lotes de producción c) Evaluación de "bioequivalencia", es decir por ejemplo, producción de la misma actividad biológica a partir de lotes discretos de productos de uno o diferentes fabricantes.
- La disolución se puede llevar a cabo disolviendo la tableta en un volumen óptimo de un medio a aproximadamente 37.0 ± 0.5 °C y con una velocidad de rotación de aproximadamente 50 rpm. La disolución se mide a diversos intervalos de tiempo comenzando 15 minutos. Los diversos medios que pueden usarse para llevar a cabo las pruebas de disolución incluyen agua, tampón y medios ácidos con un pH que varía de 1 - 9, más preferiblemente en el intervalo de 2 - 7.
- La "dureza" se mide generalmente como la fuerza requerida para romper una tableta en una prueba de compresión diametral. La prueba consiste en colocar la tableta entre dos yunques hasta que se rompa la tableta. Se registra la fuerza aplastante que hace que la tableta se rompa. La "dureza" a veces se denomina resistencia a la compresión de la tableta. Varios instrumentos utilizados para medir la dureza de las tabletas incluyen el probador Stokes (Monsanto), el probador fuerte Cobb, el probador Pfizer, el probador Erweka, el probador Heberlein (o Schleuniger), el probador de llaves y el probador van der Kamp. La unidad para medir la dureza es Kg/cm^2 .
- La "desintegración" se define como el estado en el que cualquier residuo de la unidad, excepto fragmentos de revestimiento insoluble o envoltura de cápsula, que permanece en la pantalla del aparato de prueba es una masa blanda que no tiene un núcleo palpablemente firme.
- El término "secado por pulverización" se usa convencionalmente y en términos generales se refiere a procesos que implican romper mezclas líquidas en pequeñas gotas (atomización) y eliminar rápidamente el disolvente de la mezcla en un aparato de secado por pulverización donde existe una fuerza impulsora fuerte para evaporación del disolvente de las gotitas. Los procedimientos de secado por pulverización y secado por pulverización se describen generalmente en Perry's Chemical Engineers 'Handbook, páginas 20-54 a 20-57 (Sexta Edición 1984). Marshall revisó más detalles sobre los procesos y equipos de secado por pulverización, "Atomization and Spray-Drying", 50 Chem. Ing. Prog. Monograma. Series 2 (1954), y Masters, Spray Drying Handbook (Cuarta Edición, 1985).
- Como se usa en la presente memoria, el término "secado" se refiere a gotitas o partículas formadas como resultado de la eliminación del disolvente de la gotita o partícula.
- Tal como se usa en la presente memoria, el término "partícula" incluye micropartículas, submicro y macropartículas.
- En general, las partículas tienen entre aproximadamente 100 nm y 5 mm de diámetro o la dimensión más larga. Las partículas pueden ser esferas, cápsulas, formas irregulares, cristales, polvos, aglomerados o agregados.
- La invención contempla el uso de agentes de revestimiento que pueden incluir agentes de recubrimiento entéricos no funcionales (insta-coat, kollicoat IR) tales como polímeros basados en celulosa, agentes de revestimiento de película o acrilato de polimetilo y otros agentes de revestimiento conocidos por una persona medianamente versada en la técnica.
- La presente invención se refiere en un amplio aspecto de composición a formulaciones que incluyen complejos de agente terapéutico conjugados covalentemente en donde el agente terapéutico está unido covalentemente a una o más moléculas de un polímero que incorpora como parte integral de dicho polímero un resto hidrofílico, por ejemplo, un resto de polialquilenglicol, y un resto lipófilo, por ejemplo, un resto de ácido graso. En un aspecto preferido, el agente terapéutico puede conjugarse covalentemente mediante enlace covalente con una o más moléculas de un polímero de polialquilenglicol lineal incorporado en el que, como parte integral del mismo, es un resto lipófilo, por ejemplo, un resto de ácido graso.
- Los conjugados de insulina modificados como se usan en la presente invención se desarrollan uniendo polímeros u oligómeros de bajo peso molecular, que son de naturaleza anfifílica que comprenden una porción de polietilenglicol que es hidrófila mientras que la cadena de alquilo es lipófila. La unión modifica la solubilidad de la molécula de fármaco y estabiliza la proteína o el péptido de la degradación enzimática en el tracto gastrointestinal. El fármaco conjugado se absorbe más eficientemente a través de la pared GI que el medicamento en su estado nativo. Al atravesar la corriente sanguínea, el enlace entre la cadena hidrofílica y la hidrófoba se hidroliza dejando el compuesto altamente activo de insulina - PEG circulando en la sangre, lo que altera favorablemente la farmacocinética del fármaco.

La presente invención se refiere específicamente a la molécula IN-105. IN-105 es una molécula de insulina conjugada en el aminoácido épsilon Lisina en la posición B29 de la cadena B de insulina con un oligómero anfifílico de fórmula estructural $\text{CH}_3\text{O}-(\text{C}_4\text{H}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

5 Según uno de los aspectos más importantes de la presente invención, los complejos conjugados catión-péptido, los complejos conjugados catión-insulina de la presente invención se caracterizan por demostrar potencias mitogénicas reducidas. Los conjugados descritos en la presente invención son ventajosos debido al hecho de que existe un riesgo relativamente menor o nulo de inducción de reacciones mitogénicas incluso después del uso a largo plazo y, por lo tanto, pueden usarse de forma segura para terapia a largo plazo y para el tratamiento de la diabetes. Los compuestos terapéuticos de la presente invención se caracterizan por demostrar una potencia mitogénica tres veces reducida en comparación con Insugen (R).

De acuerdo con un aspecto significativo de la presente invención, los excipientes en el producto farmacológico no afectan a las características mitogénicas de la sustancia farmacológica y, por lo tanto, la formulación o composición permanece relativamente con menos potencia mitogénica cuando se compara con los productos terapéuticos de insulina actualmente comercializados.

Las "contrapartes nativas" se refieren al péptido/proteína no modificado que exhibe una bioactividad básica in vitro o in vivo similar a la de la contraparte modificada, es decir, dicha molécula es el péptido/polipéptido antes de estar sujeto a cualquier tipo de modificación.

De acuerdo con la terminología estándar, el término "mitogénico" define aquellas sustancias que estimulan la división de células que de otro modo (es decir, sin la influencia de esta sustancia) tienen una división muy limitada.

25 El mérito inventivo de la sustancia presentada en la presente invención se revela en el hecho de que, con referencia a experiencias y experimentos específicos, los expertos creen que la insulina como una sustancia en sí misma se considera mitogénica [DeMeyts P; The structural basis of Insulin and Insulin-like growth factor-1 receptor binding and negative cooperativity and its relevance to Mitogenic versus metabolic signaling. Diabetologia 37: S135-S148, 1994], Ish-Shalom D, Christoffersen CT, Vorwerk P, Sacerdoti-Sierra N, Shymko RM, Naor D and De Meyts P; Mitogenic properties of Insulin and Insulin analogues mediated by the insulin receptor. Diabetologia 40: S25-S31 y las proteínas/péptidos, sus conjugados y/o los complejos conjugados catión-polipéptido de la presente invención muestran una potencia mitogénica tres veces disminuida determinada por la inducción in vitro de la proliferación medible de células Balb 3T3-A31.

35 Según un aspecto de la presente invención, se dice que los compuestos a modo de ejemplo de la presente invención exhiben "mitogenicidad reducida" en comparación con Insugen (R) si induce niveles detectablemente más bajos de proliferación celular medidos por la absorción de colorante azul Alamar por las células. Los expertos en la materia reconocerán que pueden usarse otros métodos adecuados y que la invención no se limita de ningún modo a un ensayo de proliferación específico.

40 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se dice que los compuestos a modo de ejemplo de la presente invención son sustancialmente "no mitogénicos" en comparación con Insugen (R) si induce niveles indetectablemente más bajos de proliferación celular tal como se mide con el colorante azul Alamar absorbido por las células. Los expertos en la materia reconocerán que se pueden usar otros métodos adecuados y que la invención no se limita de ningún modo a un ensayo de proliferación específico.

50 Se emplearon bioensayos colorimétricos in vitro para cuantificar la actividad mitogénica [Okajima T., Nakamura K., Zhang H., Ling N., Tanabe T., Yasuda T., and Rosenfeld R. G. Sensitive Colorimetric Bioassays for Insulin-like Growth Factor (IGF) Stimulation of Cell Proliferation and Glucose Consumption: Use in Studies of IGF Analogs. Endocrinology, 1992, Vol. 120: 2201-2210]

Los ensayos biológicos se analizan frecuentemente con la ayuda del método de línea paralela. El logaritmo de las dosis se grafica en el eje horizontal, mientras que las respuestas correspondientes se representan en el eje vertical.

55 Las respuestas individuales para cada tratamiento están simbolizadas por los triángulos azules para la preparación estándar y por los cuadrados verdes para la preparación de la muestra.

Con la ayuda del modelo de línea paralela se prueba la validez estadística de las siguientes hipótesis:

- 60 1. La relación dosis-respuesta es lineal para el estándar y la preparación de la muestra.
2. La curva dosis-respuesta tiene una pendiente significativa.
3. Las curvas dosis-respuesta del estándar y la preparación de la muestra son paralelas.

El procedimiento de línea paralela tiene varias ventajas en comparación con el ensayo de punto único tradicional.

65

Debido a la verificación de las hipótesis mencionadas anteriormente

1. una correlación lineal dosis-respuesta no solo se supone sino que también se prueba
2. se obtiene una potencia relativa independiente de la dosis.

5 La reproducibilidad de las potencias mitogénicas se analizó utilizando el ajuste de curva logística de 4 parámetros, en la porción lineal de la curva que consta de al menos cuatro puntos consecutivos. Los resultados mostraron 3 veces las potencias mitogénicas estadísticamente menores de IN105 en comparación con Insugen (R).

10 Según un aspecto significativo de la invención, la potencia mitogénica de la molécula IN-105 en la forma en polvo y la solución dializada son las mismas. IN-105 es tres veces menos mitogénico en comparación con Insugen (R).

15 Según otro aspecto significativo de la invención, la potencia mitogénica de la molécula HIM2 es treinta veces menor que la de Insugen (R).

Sin limitación, derivados a modo de ejemplo, por ejemplo, IN-105 de la presente invención reduce la proliferación celular in vitro hasta al menos 20%, o al menos 25%, o al menos 30% al menos 35%, al menos 40% a la de sus contrapartes nativas. Más preferiblemente, al nivel de al menos 30%.

20 Sin limitación, derivados a modo de ejemplo, por ejemplo HIM-2 de la presente invención reduce la proliferación de células in vitro a al menos 2%, o al menos 2.5%, o al menos 3%, al menos 3.5% a la de sus contrapartes nativas. Más preferiblemente, al nivel de al menos 3.8%, lo más preferiblemente a al menos 4%.

25 De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, la evaluación de la unión de insulina a su receptor afín se lleva a cabo para comparar las afinidades de unión relativas de la sustancia fármaco de Insugen (R), IN-105 y HIM-2. El aspecto más significativo de la invención se refiere al hecho de que la actividad metabólica de los compuestos a modo de ejemplo de la presente invención permanece inalterada y no comprometida a pesar de la considerable reducción en la potencia mitogénica en comparación con sus contrapartes nativas.

30 El efecto de la insulina sobre las células como acción metabólica depende de la capacidad de la insulina para unirse al receptor de insulina y el ensayo metabólico ejemplificado en la presente invención ayuda a determinar el efecto de la insulina en la captación de glucosa por adipocitos diferenciados, proporcionando así datos para la evaluación y comparación de la eficacia metabólica de las sustancias de fármaco ejemplares de la presente invención.

35 Extracción de sustancia farmacológica del producto farmacológico:

Insugen (R) y compuestos a modo de ejemplo de la presente invención, por ejemplo, IN105 y HIM2 se usarían para preparar sustancias libres de excipientes y libres de Zn. Los viales se clarificarían usando ácido acético glacial (pH ~3.4). La solución clarificada se cargará en la columna de fase inversa de sílice C8 y se separará usando una elución en gradiente con ácido acético 250 mM y etanol al 100%. Las fracciones se recogerían durante la elución y se combinarían en función de una pureza mayor o igual al 99%. Este conjunto de elución se dializará durante 15 horas usando una membrana de corte 1KD contra Tris 10 mM, pH 8.0. Finalmente, la insulina dializada libre de excipiente y libre de Zn, obtenida a pH 8.0, se analizará mediante RP-HPLC analítica. Las células HepG2 se obtuvieron de ATCC. El medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), el suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), la solución de penicilina-estreptomina 100X y la solución salina HEPES 100X se obtuvieron de Invitrogen. Se obtuvo albúmina sérica bovina, hidróxido sódico, Tritón-X 100 y bicarbonato sódico de Sigma Aldrich.

50 La Insulina humana recombinante radiomarcada se obtendría de Immunotech (Beckman Coulter) con una radiactividad específica de 2200 Ci/mmol (Catálogo No. A36474)

Métodos:

55 Las células HepG2 se mantienen en DMEM tamponado con HEPES 10 mM suplementado con FBS al 10% y solución de Penicilina-estreptomina 1X en condiciones humidificadas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Para el ensayo, las células HepG2 se tripsinizan y se siembran a una densidad de 400.000 células por pozo de una placa de 24 pozos. Después de 3 días de incubación, las células se usan para realizar los ensayos de unión de radio-ligando (1, 2).

60 Antes de realizar el ensayo, los medios se eliminan y las células se lavan dos veces con el tampón de unión (DMEM, 2.2 mg/ml de bicarbonato de sodio, 1 mg/ml de albúmina de suero bovino y 50 mM de HEPES) para eliminar cualquier rastro de crecimiento factores presentes en el medio. Los experimentos de unión competitiva se preparan por duplicado usando la cantidad fija de radioligando (0.325 nM) y concentraciones variables de sustancia de fármaco de insulina fría (de 10⁻¹³ M a 10⁻⁵ M). El volumen de reacción final se hace a 1 ml. Las placas se incuban luego a 15 °C durante la noche con agitador ajustado a 60 rpm (2). Al día siguiente, todos los medios de los pozos se descartan y cada pozo se lava dos veces con tampón de unión helado.

65

Cada pozo recibió 1 ml de reactivo de solubilización (hidróxido sódico 0.5 M, Triton-X 100 al 0.5%). Los gránulos de célula solubilizados se transfieren a un tubo de radioinmunoensayo y la radioactividad unida se leyó en un contador gamma (Stratec BioMedical Systems, Alemania). El instrumento se calibró y se encontró que tenía una eficacia del 80%.

5 Cálculos de afinidad de unión: para la normalización de los recuentos por minuto (valores de CPM) a diversas concentraciones de insulina utilizadas, el porcentaje de unión se calculó usando la siguiente ecuación;

$$10 \quad \% \text{ de unión} = (\text{CPM}_{\text{muestra}} - \text{CPM}_{\text{blanco}}) / (\text{CPM}_{\text{control}} - \text{CPM}_{\text{blanco}}) \times 100.$$

10 Cuando CPM_{control} es el CPM promedio de los pozos que contenían células con insulina radiomarcada sin insulina fría añadida, CPM_{blanco} es el CPM promedio de los pozos que no contenían insulina radiomarcada ni insulina fría, y la muestra de CPM fue el CPM promedio de los pozos que contenía Insulina radiomarcada así como concentraciones variables de Insulina fría.

15 ANÁLISIS DE CURVAS DE VINCULACIÓN COMPETITIVAS:

Los experimentos de unión competitiva miden la unión de una única concentración de ligando marcado en presencia de diversas concentraciones de ligando no marcado.

20 Se usan experimentos de unión competitiva para determinar el número de receptor y la afinidad usando el mismo compuesto que el ligando marcado y no marcado.

25 El experimento se realiza con una sola concentración de radio ligando. La incubación debe ocurrir hasta que se haya alcanzado el equilibrio, típicamente, concentraciones variables de compuesto sin marcar que abarca aproximadamente seis órdenes de magnitud.

30 La parte superior de la curva es una meseta en un valor igual a la unión de radio-ligando en ausencia del fármaco competitivo no marcado. Esto es un enlace total. La parte inferior de la curva es una meseta igual a la unión no específica (NS). La diferencia entre las mesetas superiores e inferiores es la unión específica.

35 El eje Y puede expresarse como cpm o convertirse en unidades más útiles como fmol unido por miligramo de proteína o número de sitios de unión por célula. Es posible normalizar los datos del 100% (sin competencia) al 0% (unión no específica a concentraciones máximas del competidor).

40 La concentración de fármaco no marcado que da como resultado la unión del radioligando a mitad de camino entre las mesetas superiores e inferiores se denomina IC50 (concentración inhibidora 50%) también denominada EC 50 (concentración efectiva 50%). El IC50 es la concentración de fármaco sin marcar que bloquea la mitad de la unión específica.

Si el ligando marcado y no marcado compite por un único sitio de unión, la inclinación de la curva de unión competitiva está determinada por la ley de acción de masas.

45 La regresión no lineal se usa para ajustarse a la curva de unión competitiva para determinar el logaritmo (IC50). Normalmente, se utiliza el software Prism de Graphpad y, utilizando la ecuación del modelo One Site Competition, se determina el Log (IC50).

50 Para determinar el valor de mejor ajuste de IC50 (la concentración de fármaco no marcado que bloquea el 50% de la unión específica del radioligando), el problema de regresión no lineal debe poder determinar el 100% (total) y 0% (inespecíficos) mesetas (no específicas). Con los datos recopilados en un amplio rango de concentraciones de fármaco no marcado, la curva tendrá las mesetas inferiores y superiores claramente definidas y el programa no debería tener problemas para ajustar los tres valores (tanto mesetas como IC 50).

55 La composición formulada racionalmente es biodisponible tras la liberación inmediata. En el agente terapéutico conjugado asociativamente del tipo descrito anteriormente, el componente polimérico puede construirse, modificarse o funcionalizarse adecuadamente para impartir la capacidad de conjugación asociativa de una manera selectiva.

60 En un aspecto, la invención proporciona composiciones de ácidos grasos con uno o más ácidos grasos C4, C5, C6, C7, C8, C9 o C10 saturados o insaturados y/o sales de tales ácidos grasos. Los ácidos grasos preferidos son caprílico, cáprico, mirístico y láurico. Las sales de ácidos grasos preferidos son sales de sodio de ácido caprílico, cáprico, mirístico y láurico.

65 Los restos modificadores pueden incluir otros polímeros hidrofílicos. Los ejemplos incluyen poli (polioles oxietilados) tales como poli (glicerol oxietilado), poli (sorbitol oxietilado) y poli (glucosa oxietilada); poli (alcohol vinílico) ("PVA"); dextrano; polímeros basados en carbohidratos y similares. Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros

y terpolímeros aleatorios o en bloque basados en los monómeros de los polímeros anteriores, de cadena lineal o ramificada.

Los expertos en la técnica pueden determinar la cantidad total de conjugado de compuesto de catión-insulina que va a usarse. La cantidad de agente terapéutico es una cantidad efectiva para lograr el propósito del agente activo particular. La cantidad en la composición es una dosis terapéuticamente efectiva, es decir, una cantidad farmacológicamente o biológicamente efectiva. Sin embargo, la cantidad puede ser menor que una cantidad farmacológica o biológicamente efectiva cuando la composición se usa en una forma de unidad de dosificación, tal como una cápsula, una tableta o un líquido, porque la forma de unidad de dosificación puede contener una multiplicidad de agente de administración/composiciones de agentes biológica o químicamente activos o pueden contener una cantidad dividida farmacológica o biológicamente efectiva. Las cantidades efectivas totales se pueden administrar a continuación en unidades acumulativas que contienen, en total, cantidades activadas farmacológica o biológicamente o químicamente de agente biológicamente o farmacológicamente activo.

En ciertas realizaciones preferidas, la composición farmacéutica contenida en una o más formas de dosificación comprende de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 800 mg de agente de administración, preferiblemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 600 mg, más preferiblemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 400 mg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 200 mg, lo más preferiblemente de aproximadamente 75 mg, 100 mg o 150 mg. Más preferiblemente, la composición proporciona una concentración máxima de insulina en plasma dentro de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 60 minutos después de la administración oral y más preferiblemente dentro de aproximadamente 10-20 minutos después de la administración oral al alimentar pacientes diabéticos.

Se contempla para los fines de la presente invención que las formas de dosificación de la presente invención que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de insulina pueden incluir una o más dosis unitarias (por ejemplo, tabletas, cápsulas, polvos, semisólidos, aerosoles orales, tabletas sublinguales (por ejemplo, cápsulas de gel o películas) para lograr el efecto terapéutico. Se contempla adicionalmente para los fines de la presente invención que una realización preferida de la forma de dosificación sea una forma de dosificación oral.

En algunos casos, el conjugado de compuesto de insulina complejado exhibirá un perfil de pK extendido o alterado de otro modo con respecto a un control científicamente aceptable, tal como un correspondiente conjugado de compuesto de insulina no complejado. El perfil de pK puede evaluarse usando experimentos estándar in vivo, por ejemplo, en ratones, ratas, perros o humanos. Los ensayos descritos en este documento para evaluar los atributos de los complejos conjugados de compuesto de catión-insulina son un aspecto de la invención.

En un aspecto preferido, el proceso de fabricación de la tableta administrable por vía oral que comprende al menos un compuesto biológicamente activo seleccionado de proteínas/péptidos, sus conjugados y/o complejos conjugados catión-polipéptido que poseen resistencia a la degradación enzimática comprenden los pasos:

1. Triturar un ácido graso C4-C12 saturado o insaturado adecuado y/o sales de dicho ácido graso.
2. Granular el ácido graso resultante obtenido del paso (1) con un disolvente orgánico.
3. Secar al aire los gránulos obtenidos del paso (2).
4. Raspar los gránulos secos a través de una malla para obtener gránulos del tamaño de partícula deseado
5. Mezclar los gránulos de ácido graso con el conjugado de compuesto de catión-insulina, disgregante, aglutinante y otros excipientes.
6. compresión de la tableta, pulido y embalaje

En otro aspecto preferido, el proceso de fabricación de la tableta administrable por vía oral que comprende al menos un compuesto biológicamente activo seleccionado de proteínas/péptidos, sus conjugados y/o complejos conjugados de catión-polipéptido que poseen resistencia a la degradación enzimática comprende los pasos:

1. Triturar ácidos grasos C4-C12 saturados o insaturados adecuados y/o sales de tales ácidos grasos tales como caprato de sodio, PVP-K-30.
2. Suspender IN-105 en un disolvente orgánico utilizando PVPK-30 como aglutinante para formar una masa húmeda
3. Granulación de los componentes resultantes utilizando PVP-K30 como aglutinante
4. Raspado de gránulos de caprato de sodio seco hasta 45 # (355 µm)
5. Mezclar gránulos de caprato de sodio con otros excipientes.
6. compresión de Tableta, pulido y empaque.

De acuerdo con los aspectos más significativos de la invención, el término "estable" tal como se aplica a la composición de la presente invención significa para los propósitos de la invención que la formulación permanece sin degradarse o no se degrada en una medida inaceptable incluso después de la exposición de la formulación a un rango de condiciones de almacenamiento seleccionadas del grupo que comprende (i) temperatura de aproximadamente 2-8 °C , 25 °C , 30 °C y 40 °C (ii) 25 °C /60% de humedad relativa (HR), 30 °C /65% de humedad relativa, 40 °C /75% de humedad relativa durante al menos un año o cualquier combinación de las condiciones

ilustradas. En el contexto de la naturaleza de la presente invención no degradada o no se degrada en una extensión inaceptable significará que los componentes de dosificación permanecen bien dentro de los límites de estabilidad aplicables durante los períodos de prueba.

5 De acuerdo con un aspecto de la invención, la prueba de estabilidad se lleva a cabo durante un período de 1-12 meses, preferiblemente 1 mes, preferiblemente 2 meses, preferiblemente 3 meses, preferiblemente 4 meses, preferiblemente 5 meses, preferiblemente 6 meses, preferiblemente 7 meses, preferiblemente 9 meses, preferiblemente 11 meses y más preferiblemente 12 meses. La invención contempla los atributos de estabilidad de la forma de dosificación para permanecer compatible durante un período que se extiende hasta aproximadamente 2 años.

10 Los atributos de estabilidad de la composición farmacéutica de la presente invención se evalúan en diferentes condiciones de prueba de temperatura tales como condiciones de temperatura más bajas en el intervalo de 2-8 °C , condiciones de temperatura ambiente de 25 °C -30 °C y condiciones de temperatura ligeramente elevada de 40 °C.

15 Como puede ser evidente para un experto en la materia, las condiciones de temperatura y las estabilidades establecidas en dichas condiciones de temperatura pueden no estar estrictamente limitadas a las condiciones de temperatura ensayadas en este documento. La invención contempla la extensión de los atributos de estabilidad mostrados durante las condiciones de prueba que se establecerán dentro del alcance de una amplia gama de temperaturas más bajas y más elevadas. La composición y sus atributos de estabilidad no están sujetos a mucha variación a temperaturas que oscilan entre 2 y 40 °C

20 Los atributos de estabilidad de la composición farmacéutica de la presente invención se evalúan en diferentes condiciones de prueba de humedad relativa, tales como condiciones de HR 25 °C /60% de humedad relativa (HR), 30 °C /65% de humedad relativa, 40 °C /75% de humedad relativa o una combinación de las condiciones aquí ilustradas. Como puede ser evidente para un experto en la técnica, las condiciones de humedad relativa y las estabilidades establecidas en dichas condiciones de temperatura pueden no estar estrictamente limitadas a las condiciones de humedad relativa probadas en este documento. La invención contempla la extensión de los atributos de estabilidad mostrados durante las condiciones de prueba que se establecerán dentro del alcance de un amplio intervalo de temperaturas de humedad relativa no descritas explícitamente en este documento. La composición y sus atributos de estabilidad no están sujetos a mucha variación en humedades relativas que van desde 25 °C /60% - 40 °C /75%.

25 De acuerdo con un aspecto de la invención, la composición de la presente invención se caracteriza porque al menos el 95% ± 2% de la composición permanece sin degradar por exposición a condiciones seleccionadas del grupo que comprende

- 35 (a) rango de temperatura de aproximadamente 2-8 °C o 25 °C -40 °C
 (b) 25 °C /60% de humedad relativa (HR), 30 °C /65% de humedad relativa, 40 °C /75% de humedad relativa durante un período de al menos 6 meses.

40 De acuerdo con un aspecto de la invención, la composición de la presente invención se caracteriza porque al menos el 95% ± 2% de la composición permanece sin degradar por la exposición a condiciones seleccionadas del grupo que comprende

- 45 (a) rango de temperatura de aproximadamente 2-8 °C o 25 °C -40 °C
 (b) 25 °C /60% de humedad relativa (HR), 30 °C /65% de humedad relativa, 40 °C /75% de humedad relativa durante un período de al menos 6 meses.

50 De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, los diversos atributos de estabilidad probados para la composición de tableta incluyen, pero no se limitan a, la dureza, el perfil de disolución del tiempo de desintegración y la pureza cromatográfica.

55 De acuerdo con esto, según diversas realizaciones de la invención presenta diversas ventajas con respecto a la dosificación y al método de administración conveniente. La invención constituye otra ventaja más sobre las composiciones de la técnica anterior ya que los inventores proponen que la formulación oral de IN-105 racionalmente diseñada reivindicada con componentes medidos de otros excipientes y el proceso de fabricación de las tabletas administrables por vía oral son fácilmente escalables sin afectar el perfil de liberación en -vitro o in-vivo.

60 Además, atribuido a esta formulación oral racionalmente diseñada y al proceso de hacer lo mismo, el factor de escalabilidad no afecta el rendimiento del fármaco in vivo o su perfil de liberación in vivo.

Uno de los aspectos importantes de la invención se refiere al secado por pulverización de la composición para obtener una mezcla amorfa homogénea del complejo conjugado catión-insulina.

65

Se puede optimizar una variedad de parámetros para modificar el tamaño promedio de las gotitas. El tamaño de la gota puede ser influenciado, por ejemplo, ajustando la presión o presión del fluido supercrítico del gas a alta presión, ajustando la suspensión o la presión de la solución, ajustando el índice de flujo de la suspensión o solución, eligiendo el diámetro interno del conducto de la boquilla, ajustando la temperatura del gas de secado, el ajuste de la presión dentro del recipiente de formación de partículas, el cambio de las concentraciones de la suspensión o los constituyentes de la solución, y/o similares. Por ejemplo, la suspensión o solución se puede suministrar a la cámara de mezclado a desde aproximadamente 0.5 ml/min hasta aproximadamente 40 ml/min para pulverizar desde un orificio de boquilla de diámetro interno de 100 μm ; tasas más bajas formando gotitas más pequeñas y tasas más rápidas formando gotitas más grandes. En los métodos, se prefiere la formación de gotitas que varíen en diámetro mediano másico de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 200 μm .

En la presente invención, la temperatura a la que se lleva a cabo el secado por pulverización de manera eficiente está normalmente en el intervalo entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 300 °C, preferiblemente entre aproximadamente 100 °C y aproximadamente 180 °C. El control de la temperatura puede ser particularmente importante para mantener la estabilidad de las partículas del producto que se forman o contienen sustancias altamente sensibles a la temperatura.

Las composiciones farmacéuticas obtenidas usando ciertas realizaciones de la invención se pueden administrar a cualquier animal que pueda experimentar los efectos beneficiosos de los compuestos de la invención. Los más importantes entre estos animales son los humanos, aunque la invención no pretende ser tan limitada.

El método para preparar partículas de formulación en polvo en la invención puede comprender, por ejemplo, preparar una suspensión o solución acuosa de un material bioactivo y un poliol opcionalmente con uno o más de otros excipientes farmacéuticos compatibles, formando una mezcla de la solución o suspensión con una gas presurizado, pulverizando gotas ultrafinas despresurizando la mezcla, y secando las gotitas en partículas de polvo intercambiando los gases de pulverización con gases de secado, por ejemplo, pulverizando en una cámara de secado del aparato de secado por pulverización.

El término "disolvente" se refiere al líquido en el que el material que forma la masa de la partícula secada por pulverización se disuelve, suspende o emulsiona para su entrega al atomizador de un secador por pulverización y que se evapora en el gas de secado, ya sea o no, el líquido es un solvente o no solvente para el material. La elección del disolvente depende del material a granel y de la forma del material alimentado al atomizador, por ejemplo, si el material debe disolverse, suspenderse o emulsionarse en el disolvente. El disolvente más preferido en el contexto de la presente invención es agua.

Cuando se emplea el método de secado por pulverización, una materia prima en forma de una solución que comprende al menos uno de los ingredientes activos seleccionados del grupo que consiste en conjugado de compuesto de catión-insulina en combinación con los diluyentes se seca por pulverización para producir partículas.

El tamaño de las partículas de la solución de fármaco es una función del atomizador utilizado para pulverizar la solución de polímero, la presión del atomizador, el caudal, los ingredientes utilizados, su concentración, el tipo de disolvente, la viscosidad, la temperatura de pulverización (temperatura de entrada y salida) y el peso molecular del agente terapéutico. En general, cuanto mayor es el peso molecular, mayor es el tamaño de partícula, suponiendo que la concentración es la misma.

Uno de los aspectos de la presente invención se refiere a un estudio comparativo de abrazadera de perro de dos formulaciones prototipo de composiciones orales de conjugados de compuesto de catión-insulina preparados por el método de compresión directa y el método de secado por pulverización.

Se realizaron las siguientes mediciones: velocidad de infusión de glucosa, concentración de insulina en plasma y niveles de glucosa en plasma (para permitir una estimación de la liberación de compuestos de insulina endógenos). La velocidad de infusión de glucosa requerida para mantener la euglicemia proporciona un índice de acción del compuesto de insulina. Se evaluaron y compararon las tasas de infusión de glucosa y los niveles de insulina en plasma.

Las formulaciones prototipo preparadas mediante el método secado por pulverización muestran niveles consistentes de absorción del fármaco y velocidad de infusión de glucosa resultante sin pérdida de estabilidad o actividad biológica.

La formulación I del prototipo (Formulación 862) tiene la siguiente composición

Ingrediente	Cantidad (mg) por tableta
IN-105	6
Caprato de sodio	150
Manitol	150
Explotab (Croscarmelosa sodio)	25

La presente invención se define adicionalmente en los siguientes Ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente. A partir de la discusión anterior y estos Ejemplos, un experto en la técnica puede determinar las características esenciales de esta invención, y sin apartarse del espíritu y alcance de la misma, puede realizar diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

La invención se comprenderá mejor a partir de los siguientes ejemplos. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán fácilmente que estos ejemplos son meramente ilustrativos de la invención que se define en las reivindicaciones que siguen a continuación.

Los siguientes ejemplos representan realizaciones preferidas de la presente invención.

EJEMPLO 1:

Las formulaciones de fármacos de acuerdo con la presente invención se prepararon y probaron. Por consiguiente, la cantidad requerida de caprato sódico molido se pesó con precisión en una mezcla planetaria y el granulado con 700 ml de alcohol isopropílico. Se calculó la cantidad de alcohol isopropílico añadida para convertir la mezcla de polvo en forma granular. La masa húmeda se raspó cada 5 minutos, de modo que la mezcla no se adhiere a la pared de la mezcla planetaria. La masa húmeda se pasó a través de un tamiz de # 18 en un granulador húmedo y se secó al aire durante la noche bajo la capucha.

Contenido de Humedad de Gránulos: Peso de la Muestra = 0.662 gm; % de contenido de humedad = 2.27%

Se pesó la cantidad apropiada de IN-105, gránulos de caprato de sodio, Kollidon CL y perlitol y se pasó a través de un tamiz # 60 y se mezcló en un mezclador de doble cono durante 20 minutos a una velocidad de 12 r.p.m. Después de mezclar homogéneamente durante 20 minutos, la mezcla se lubricó con aerosol y estearato de magnesio durante 3 minutos a una velocidad de 88-90 r.p.m.

Tabla I

Ingredientes	por tableta (MG)	para 1000 gm
IN-105*	5.8207	17.27
Gránulos de Caprato de sodio	150.000	445.10
Kollidon CL	33.700	100.00
Pearlitol SD 200	144.1093	427.62
Aerosil 200 Pharma	1.685	5.00
Estearato de magnesio	1.685	5.00
	Total -337 mg	Total-1000 gm

Las tabletas preparadas según el ejemplo I, se probaron en perros beagle macho sanos con 26 horas de ayuno. Cada tableta se administró con 20 ml de agua. Las muestras de sangre se recogieron para medir los niveles de glucosa en sangre y de insulina en plasma. Como se representa en la figura 1 y la figura 2, la tableta dio como resultado un aumento rápido de los niveles de insulina en plasma que muestran una Cmax de aproximadamente 100 mU/ml con un Tmax de 20 minutos desde el momento de la administración, dando como resultado una caída correspondiente de aproximadamente 35% en concentración de glucosa en plasma.

ES 2 664 822 T3

Las tabletas así producidas se sometieron a estudios de estabilidad según las directrices ICH. Los estudios a largo plazo se llevaron a cabo a 2-8 °C y a 25 °C mientras que la estabilidad acelerada se llevó a cabo a 30 °C /65% de HR y 40 °C /75% de HR.

5

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 2-8 grados C

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%	NLT 93%	(en mg)	(con respecto al contenido de la etiqueta)	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.58	1.49	0.053	95.3	5.08	102 %	99.1 %
1	1.58	1.50	0.052	94.8	5.07	101 %	92.6 %
3	1.51	1.50	0.059	94.5	5.07	101 %	104.9 %
6	1.42	1.44	0.065	94.5	5.14	103 %	103.7 %
9	1.38	1.41	0.056	94.7	5.1	102 %	99.3 %
12	1.40	1.45	0.060	94.4	5.08	102 %	95.6 %

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 25 grados C 60 % HR

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%	NLT 93%	(en mg)	(con respecto al contenido de la etiqueta)	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.58	1.49	0.053	95.3	5.08	102.0	99.1
1	1.70	1.40	0.13	94.8	5.06	101.0	77.2
2	1.63	1.38	0.26	94.0	5.04	101.0	85.6
3	1.66	1.36	0.23	94.5	5.09	102.0	95.9
6	1.84	1.34	0.19	94.7	4.71	94.0	84.7
9	1.59	1.33	0.19	94.0	4.69	94.0	85.2
12	1.74	1.38	0.25	94.3	4.85	97.0	85.6

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 30 grados C 65 % HR

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%	NLT 93%	(en mg)	(con respecto al contenido de la etiqueta)	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.58	1.49	0.053	95.3	5.08	102.0	99.1
1	1.69	1.48	0.06	95.2	5.10	102.0	84.1
2	1.55	1.50	0.059	94.8	5.12	102.0	82.6
3	1.55	1.50	0.070	94.6	5.13	102.0	100.4
6	1.63	1.44	0.130	94.3	4.92	98.0	94.3

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 40 grados C 70 % HR

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%	NLT 93%	(en mg)	(con respecto al contenido de la etiqueta)	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.58	1.49	0.053	95.3	5.08	102.0	99.1
1	1.58	1.43	0.110	94.2	4.84	97.0	86.0
2	1.54	1.45	0.130	93.8	4.79	96.0	90.0
3	1.51	1.48	0.150	93.9	4.64	93.0	79.0
6	1.42	1.53	0.200	93.3	4.75	96.0	78.0

EJEMPLO 2:

- 5 Se pesó con precisión el caprato de sodio molido y se tomó en un mezclador planetario y se mezcló durante 2 minutos. Se añadieron cantidades requeridas de IN-105 ponderado a isopropanol con 0.35% p/p de povidona para formar una suspensión y se agitó bien durante 30 minutos usando un agitador magnético. Se añadieron cantidades apropiadas de isopropanol durante la granulación.
- 10 Los gránulos se mezclaron durante 15 min en un mezclador planetario y se pasaron a través de un tamiz de # 14 y se secaron en un horno de aire caliente durante 2 horas a 30 °C.

Tabla 2:

Ingredientes	Cantidad (por tableta)	Cantidad(G)
Caprato de sodio	150 mg	192.67
IN-105	5.7078 mg	7.33
PVP-K 30	5.45 mg	7.00

- 15 Velocidad del mezclador planetario = 4 durante 15 min. Volumen de IPA agregado = 200 ml. 0.7 gm (0.35%) PVP + 7.33GM. IN-105 se suspendió en 80 ml de IPA. Se suspendieron 6.3 g de PVP restantes en 40 ml de IPA. Se agregó la cantidad restante de IPA para formar una masa húmeda dura.

PROCESO DE MEZCLA:

- 20 Se pasaron cantidades exactas de IN-105 + caprato de sodio + gránulos de PVP K-30, Pearlitol y Kollidon CL a través de un tamiz de # 45 y se mezclaron en un mezclador octagonal. Después del mezclado homogéneo, la mezcla se lubricó con Aerosil y estearato de magnesio, se mezcló bien y se comprimió en tabletas.

25

Tabla 3:

Ingredientes	Por tableta (MG)	para 50 gm (G)
IN-105	5.7078	0.92
Gránulos de Caprato de sodio	150.00	24.19
PVP K-30	5.45	0.88
Pearlitol	114.742	18.51
Kollidon CL	31	5.00
Aerosil 200 Pharma	1.55	0.25

ES 2 664 822 T3

Estearato de Magnesio	1.55	0.25
	Total-310 mg	Total-50 g

5 Se probaron comprimidos preparados según el ejemplo 2 en perros beagle macho sanos con 26 horas de ayuno. Cada tableta se administró con 20 ml de agua. Las muestras de sangre se recogieron para medir los niveles de glucosa en sangre y de insulina en plasma. Como se representa en la figura 3 y la figura 4, las tabletas dieron como resultado un aumento rápido en los niveles de insulina en plasma que muestran una C_{max} de aproximadamente 75 mU/ml con un T_{max} de 20 minutos desde el momento de la administración. Esto dio como resultado una caída correspondiente de aproximadamente 35% en la concentración de glucosa en plasma desde la línea base.

10 Las tabletas así producidas se sometieron a estudios de estabilidad según las directrices de ICH. Los estudios a largo plazo se llevaron a cabo a 2-8 °C y a 25 °C mientras que la estabilidad acelerada se llevó a cabo a 30 °C /65% de HR y 40 °C /75% de HR.

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 2-8 grados C.

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%		(en mg)	(con respecto al contenido de la etiqueta)	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.88	2.10	0.13	95.3	5.34	107.0	94.0%
1	1.58	1.50	0.052	94.8	5.07	102.0	90.0%
3	1.51	1.50	0.059	94.5	5.07	102.0	102.0%
6	1.42	1.44	0.065	94.5	5.14	103.0	86.0
9	1.38	1.41	0.056	94.7	5.21	104.0	95.0
12	1.40	1.45	0.060	94.4	5.18	104.0	89.0

15 Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 25 grados C 60% HR

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%	NLT 93%	(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.88	2.1	0.13	95.3	5.34	107.0	94.0%
1	1.60	1.40	0.13	94.8	5.26	105.0	89.0
2	1.60	1.38	0.26	94.0	5.22	105.0	91.0
3	1.52	1.36	0.23	94.5	5.29	106.0	94.0
6	1.48	1.34	0.19	94.7	5.17	103.0	90.0
9	1.45	1.33	0.19	94.0	5.13	103.0	103.0
12	1.48	1.38	0.25	94.3	5.20	104.0	87.0

ES 2 664 822 T3

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 30 grados C 65% HR

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/c m ²	NMT 15 min	NMT 3.0%	NLT 93%	(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.88	2.1	0.13	95.3	5.34	107.0	94.0%
1	1.61	1.48	0.06	95.2	4.97	99.0	90.0%
2	1.58	1.50	0.059	94.8	4.92	98.0	102.0%
3	1.51	1.50	0.070	94.6	4.88	98.0	86.0%
6	1.42	1.44	0.130	94.3	4.79	96.0	79.0%

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 40 grados C 75% HR

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/c m ²	NMT 15 min	NMT 3.0%	NLT 90%	(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.88	2.1	0.13	95.3	5.34	107.0	94.0 %
1	1.58	2.0	0.17	94.2	5.09	102.0	96.0 %
2	1.54	2.3	0.19	93.7	5.06	101.0	84.0 %
3	1.51	2.2	0.16	93.9	5.01	100.0	89.0 %
6	1.42	1.9	0.29	93.3	4.91	98.0	92.0 %

5

EJEMPLO 3:

Se pasaron cantidades precisas de IN-105, caprato sódico + complejo beta-ciclodextrina, bicarbonato sódico y Kollidon CL en un tamiz de # 45 y se mezclaron en una bolsa de polietileno. Después del mezclado homogéneo, la mezcla se lubricó con Aerosil y estearato de magnesio, se mezcló bien y se comprimió en tabletas.

10

Tabla 4:

Ingredientes	por tableta (MG)	para 50 gm (G)
IN-105	5.7078	1.30
Beta-Ciclodextrina	40.38	9.18
gránulos de caprato Sodico	75.00	17.05
Bicarbonato de sodio	74.71	16.98
Kollidon CL	22	5.00
Aerosil 200 Pharma	1.1	0.25
Estearato de Magnesio	1.1	0.25
	Total-220 mg	Total-50 g

ES 2 664 822 T3

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 2-8 grados C

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%		(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.58	1.49	0.053	95.3	4.99	99.0	95.0%
1	1.58	1.50	0.052	94.8	4.99	99.0	91.0%
3	1.51	1.50	0.059	94.5	5.01	100.0	85.0%
6	1.42	1.44	0.065	94.5	4.96	99.0	101.0%
9	1.38	1.41	0.056	94.7	4.93	99.0	92.0%
12	1.40	1.45	0.060	94.4	4.97	99.0	89.0%

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 25 grados C 60% RH

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%		(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.58	1.49	0.053	95.3	4.99	99.0	95.0%
1	1.60	1.40	0.13	94.8	5.06	101.0	89.0%
2	1.60	1.38	0.26	94.0	4.93	99.0	91.0
3	1.52	1.36	0.23	94.5	4.92	98.0	101.0
6	1.48	1.34	0.19	94.7	4.95	99.0	87.0
9	1.45	1.33	0.19	94.0	4.91	98.0	90.0
12	1.48	1.38	0.25	94.3	4.87	97.0	85.0

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 30 grados C 65% RH

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%	NLT 93%	(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.58	1.49	0.053	95.3	4.99	99.0	95.0%
1	1.61	1.48	0.06	95.2	5.00	100.0	94.0%
2	1.58	1.50	0.059	94.8	4.81	96.0	92.0%
3	1.51	1.50	0.070	94.6	4.83	96.0	84.0%
6	1.42	1.44	0.130	94.3	4.72	94.0	90.0%

ES 2 664 822 T3

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 40 grados C 75% RH

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%	NLT 93%	(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.58	1.49	0.053	95.3	4.99	99.0	95.0%
1	1.58	1.50	0.110	94.2	4.88	98.0	90.0
2	1.57	1.48	0.130	93.6	4.92	94.0	81.0
3	1.51	1.50	0.150	93.9	4.77	95.0	79.0
6	1.42	1.44	0.200	93.3	4.64	92.8	76.0

EJEMPLO 4:

- 5 Se pasaron cantidades precisas de IN-105, laurilsulfato de sodio, Kollidon CL y Pearlitol a través de un tamiz de # 45 y se mezclaron en un mezclador octagonal. Después de la mezcla homogénea, la mezcla se lubricó con Aerosil y estearato de magnesio, se mezcló bien y se comprimió en Tabletetas.

Tabla 5:

Ingredientes	por tableta (MG)	para 50 gm (G)
IN-105 60#	5.7078	1.90
Lauril sulfato de sodio	50.0	16.67
Kollidon CL	15.00	5.00
Pearlitol SD 200	77.7922	25.93
Aerosil 200 Pharma	0.75	0.25
Estearato de magnesio	0.75	0.25
	Total-150 mg	Total-50 g

- 10 Se probaron tabletas preparados como se describe en el ejemplo 4 en perros beagle macho sanos con 26 horas de ayuno. Cada tableta se administró con 20 ml de agua. Las muestras de sangre se recogieron para medir los niveles de glucosa en sangre y de insulina en plasma. Los resultados obtenidos se representan en la FIG. 5 y FIG. 6. Las tabletas así producidas se sometieron a estudios de estabilidad según las directrices de la ICH. Los estudios a largo
- 15 plazo se llevaron a cabo a 2-8 °C y a 25 °C mientras que la estabilidad acelerada se llevó a cabo a 30 °C /65% de HR y 40 °C /75% de HR.

Estabilidad de 5 mg IN-105 tabletas a 2-8 grados C.

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%	NLT 93%	(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.64	1.62	0.064	95.7	5.16	103.2	97.6%
1	1.61	1.58	0.068	95.2	5.24	104.8	98.4%
2	1.62	1.56	0.072	95.5	5.20	104.0	97.2%

ES 2 664 822 T3

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
3	1.59	1.49	0.070	95.3	5.01	100.0	95.0%
6	1.59	1.54	0.076	94.8	4.94	98.8	92.7%
9	1.55	1.42	0.082	94.2	5.10	102.0	88.4%
12	1.50	1.46	0.090	94.1	4.91	98..2	90.0%

Estabilidad de 5 mg IN-105 tabletas a 25 grados C. 60 % RH

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%		(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.64	1.62	0.064	95.7	5.16	103.2	97.6%
1	1.62	1.66	0.070	95.1	5.26	105.2	90.0%
2	1.60	1.54	0.074	95.0	5.14	102.8	94.1%
3	1.64	1.59	0.072	95.2	4.97	99.6	89.1%
6	1.57	1.56	0.081	94.6	4.82	96.4	92.0%
9	1.49	1.42	0.086	94.1	4.98	99.6	96.0%
12	1.44	1.47	0.092	93.7	4.87	97.4	98.4%

Estabilidad de 5 mg IN-105 tabletas a 30 grados C. 65 % RH

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%		(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.64	1.62	0.064	95.7	5.16	103.2	97.6%
1	1.62	1.62	0.072	95.3	5.10	102.0	98.6%
2	1.62	1.60	0.076	94.8	5.01	100.2	92.4%
3	1.50	1.46	0.082	94.4	4.84	96.8	94.0%
6	1.44	1.29	0.094	93.6	4.79	95.8	88.4%

Estabilidad de 5 mg IN-105 tabletas a 40 grados C. 70 % RH

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%		(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.64	1.62	0.064	95.7	5.16	103.2	97.6%

ES 2 664 822 T3

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
1	1.58	1.59	0.072	95.1	5.08	102.0	92.0%
2	1.52	1.54	0.079	94.5	4.92	98.4	94.5%
3	1.42	1.48	0.086	94.0	4.86	97.2	89.7%
6	1.38	1.46	0.102	93.2	4.64	92.8%	90.1%

EJEMPLO 5:

5 Preparación de caprato de sodio, bicarbonato de sodio y gránulos de pearlitol con pvp k-30 (2% p/p) como aglutinante y peg 6000 (1% p/p) como plastificante e incrementado e IN-105 agregado durante la granulación.

10 Se tomó una cantidad exactamente pesada de caprato sódico molido, bicarbonato sódico y perlitol en un mezclador planetario, se realizó el mezclado en seco durante 5 minutos. Mientras tanto, PVP K 30 se disolvió en IPA y se suspendió IN-105. PEG 6000 se disolvió en agua (5% v/v). La solución se agitó bien usando Agitador magnético. Se granularon caprato sódico, bicarbonato sódico y Pearlitol usando PVPK y solución de PEG como agente de granulación. El proceso se llevó a cabo durante 20 min. La masa húmeda formada se pasó a través de un tamiz de # 18 en un granulador húmedo y se secó en LAF.

15 Volumen de IPA agregado - 130 ml.
 100 ml = IN-105 + PVP k. 6 ml = PEG en agua. Velocidad del mezclador planetario = 2-4 durante 20 min.
 Velocidad del granulador húmedo - 200 rpm.
 Contenido de humedad de gránulos.
 Peso de la Muestra - 0.525 gm.
 % De contenido de humedad -1.99%.

20

Tabla 6:

Ingredientes	Cantidad por tableta (mg)	para una tanda de 250 gm
IN-105	10.6952	8.60
Caprato de sodio	150	120.55
Bicarbonato de sodio	90	72.33
Pearlitol 200 SD	60.37	48.52
PVP k-30 (2% p/p)	6.22	5
PEG 6000 (1% p/p)	3.11	2.5

Tabla 7

Ingredientes	por tableta (MG)	para 200 gm (G)
IN-105	10.6952	5.94
Caprato de sodio	150.00	83.33
Bicarbonato de sodio	90.00	50.00
Pearlitol 200 SD	60.37	33.54
PVP K 30	6.22	3.46
PEG 6000	3.11	1.73
Kollidon CL	36.00	20.00
Aerosil 200 Pharma	1.8	1.00

ES 2 664 822 T3

Ingredientes	por tableta (MG)	para 200 gm (G)
Estearato de magnesio	1.8	1.00
	Total-360 mg	Total-200 gm

Se pasó una cantidad exactamente pesada de IN-105 + caprato de sodio + bicarbonato de sodio + Pearlitol + PVP K 30 y gránulos de PEG a través de un tamiz # 35 y se mezcló con Kollidon CL en un mezclador de doble cono. Después del mezclado homogéneo, la mezcla se lubricó con Aerosil y estearato de magnesio, se mezcló bien y se comprimó en tabletas.

Las tabletas así producidas se sometieron a estudios de estabilidad según las directrices ICH. Los estudios a largo plazo se llevaron a cabo a 2-8 °C y a 25 °C mientras que la estabilidad acelerada se llevó a cabo a 30 °C /65% de HR y 40 °C /75% de HR.

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 2-8 grados C.

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMW P	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/c m2	NMT 15 min	NMT 3.0%	NLT 93%	(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.58	1.49	0.053	95.3	5.08	102.0	96.0%
1	1.58	1.50	0.052	94.8	5.07	102.0	92.0%
3	1.51	1.50	0.059	94.5	5.07	102.0	86.7%
6	1.42	1.44	0.065	94.5	5.14	103.0	90.3%
9	1.38	1.41	0.056	94.7	5.1	103.0	98.0%
12	1.40	1.45	0.060	94.4	5.08	102.0	89.2%

Estabilidad de tabletas de IN-105 de 5 mg a 25 grados C 60% HR

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm2	NMT 15 min	NMT 3.0%		(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.58	1.49	0.053	95.3	5.08	102.0	96.0%
1	1.60	1.40	0.13	94.8	5.06	102.0	102.0%
2	1.60	1.38	0.26	94.0	5.04	101.0	93.1%
3	1.52	1.36	0.23	94.5	5.09	102.0	91.2%
6	1.48	1.34	0.19	94.7	4.71	94.0	84.6%
9	1.45	1.33	0.19	94.0	4.69	94.0	81.9%

ES 2 664 822 T3

Estabilidad de 5 mg IN-105 tabletas a 30 grados C. 65 % RH

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%	NLT 93%	(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.58	1.49	0.053	95.3	5.08	102.0	96.0%
1	1.61	1.48	0.06	95.2	5.10	104.0	89.2%
2	1.54	1.52	0.070	94.4	5.08	104.0	92.0%
3	1.51	1.50	0.070	94.6	5.13	104.0	89.0%
6	1.42	1.44	0.130	94.3	4.71	94.2	84.7%

Estabilidad de 5 mg IN-105 tabletas a 40 grados C. 75 % RH

Intervalos de prueba	Dureza	Tiempo de desintegración	HMWP	Pureza cromatográfica	ensayo	% de ensayo	Disolución
En meses	NMT 5.0 Kg/cm ²	NMT 15 min	NMT 3.0%		(en mg)	con respecto al contenido de la etiqueta	NLT 75.0% a los 15 minutos
0	1.58	1.49	0.053	95.3	5.08	102.0	96.0%
1	1.58	1.50	0.110	94.2	4.84	97.0	98.0%
2	1.50	1.48	0.12	93.6	4.78	96.0	87.6%
3	1.51	1.50	0.150	93.9	4.64	88.0	84.7%
6	1.42	1.44	0.200	93.3	4.75	96.0	80.0%

- 5 Estas son formulaciones de dosis proporcionales preferidas que proporcionan perfiles de liberación de fármacos deseables. Estas formulaciones proporcionan una versión aproximadamente consistente de IN-105.

10 EJEMPLO 6: 1.663 g de IN-105 y 50 g de caprato sódico se disolvieron en agua ajustando el pH a 8.28 usando hidróxido sódico al 10%. La solución fue tomada para secado por pulverización. La solución se secó por pulverización a 80 °C de una manera de cocorriente. La presión de atomización utilizada fue de 1.5 kg/cm², y la velocidad de flujo de alimentación al secador por pulverización fue de 2 ml/min. La pureza de la muestra secada por pulverización fue ~ 98% y de los 52 gm esperados totales, se recuperaron un total de 16 g de gránulos y 1.5 g de polvo fino.

15 Este polvo secado por pulverización se mezcló con otros excipientes de formulación como manitol, explotab, sílice coloidal y estearato de magnesio y se comprimió en forma de tableta. Estas tabletas se analizaron luego en un modelo de pinza de perro para ver la respuesta farmacocinética y farmacodinámica.

20 EJEMPLO 7: Se usó una suspensión de alimentación de IN105 que tenía una concentración de 35 g/l para obtener muestras secadas por pulverización. Los excipientes utilizados fueron manitol y caprato de sodio. A una mezcla de 1050 mg de caprato de sodio y 1015 mg de manitol, se añadieron 20 ml de solución que contenía 1 ml de suspensión de alimentación y se mezclaron a fondo. La solución se secó por pulverización a 80 °C a manera de cocorriente. La presión de atomización utilizada fue de 1.5 kg/cm², y la velocidad de flujo de alimentación al secador por pulverización fue de 2 ml/min. Se obtuvo una recuperación de alrededor del 60% para la muestra y su pureza de la muestra secada por pulverización fue ~ 98%.

25

EJEMPLO 8: Se usó una suspensión de alimentación de IN105 que tenía una concentración de 35 g/l para obtener muestras secadas por pulverización. Los excipientes utilizados fueron manitol y caprato de sodio. A una mezcla de 1050 mg de caprato de sodio y 945 mg de manitol, se añadieron 20 ml de solución que contenía 3 ml de suspensión de alimentación y se mezclaron a fondo. La solución se secó por pulverización a 80 °C a manera de cocorriente. La presión de atomización utilizada fue de 1.2 kg/cm², y la velocidad de flujo de alimentación al secador por pulverización fue de 2 ml/min. Se obtuvo una recuperación de alrededor del 60% para la muestra y posteriormente se descubrió que su pureza era del 98.6%.

EJEMPLO 9: Se usó una suspensión de alimentación de IN105 que tenía una concentración de 35 g/l para obtener muestras secadas por pulverización. Los excipientes utilizados fueron manitol y caprato de sodio. A una mezcla de 1050 mg de caprato de sodio y 1015 mg de manitol, se añadieron 20 ml de solución que contenía 1 ml de suspensión de alimentación y se mezclaron a fondo. La solución se secó por pulverización a 120 °C a manera de cocorriente. La presión de atomización utilizada fue de 1.5 kg/cm², y la velocidad de flujo de alimentación al secador por pulverización fue de 2 ml/min. Se obtuvo una recuperación de alrededor del 60% para la muestra y posteriormente se encontró que su pureza era del 99.5%.

EJEMPLO 10: Se usó una suspensión de alimentación de IN105 que tenía una concentración de 35 g/l para obtener muestras secadas por pulverización. Los excipientes utilizados fueron manitol y caprato de sodio. A una mezcla de 1050 mg de caprato de sodio y 945 mg de manitol, se añadieron 20 ml de solución que contenía 3 ml de suspensión de alimentación y se mezclaron a fondo. La solución se secó por pulverización a 120 °C a manera de cocorriente. La presión de atomización utilizada fue de 1.2 kg/cm², y la velocidad de flujo de alimentación al secador por pulverización fue de 2 ml/min. Se obtuvo una recuperación de alrededor del 60% para la muestra y posteriormente se encontró que su pureza era del 98.3%.

EJEMPLO 11: se usó una suspensión de alimentación de IN105 que tenía una concentración de 11.5 g/l para obtener muestras secadas por pulverización. Los excipientes utilizados fueron manitol y caprato de sodio. A una mezcla de 3000 mg de caprato de sodio y 2885 mg de manitol, se añadieron 50 ml de solución que contenía 10 ml de suspensión de alimentación y se mezclaron a fondo. La solución se secó por pulverización a 150 °C a manera de contracorriente. La presión de atomización utilizada fue de 0.86 kg/cm², y la velocidad de flujo de alimentación al secador por pulverización fue de 4 ml/min. Se encontró que la pureza de la muestra era del 94.71%.

Las dos formulaciones prototipo [Formulación -862 Tableta preparada mediante el método de compresión directa] y [Formulación -872 - Tableta preparada mediante el método de secado por pulverización] que se tamizaron a través de un estudio de pinza de perro indicaron que la formulación - 872 preparada mediante el proceso de secado por pulverización exhibió niveles comparativamente consistentes de absorción del fármaco y la velocidad de infusión de glucosa resultante sin pérdida de estabilidad o actividad biológica que proporciona un proceso de preparación de un método mucho más económico, comercialmente viable y escalable de fabricación de composiciones conjugadas de compuesto de catión-insulina.

Tabla 8:

Tiempo	862		872	
	Insulina en el Plasma	SEM	Insulina en el plasma	SEM
60	8.2	1.5	6.0	1.1
80	7.0	1.4	5.8	1.5
85	21.2	6.2	22.5	12.4
90	48.5	15.1	53.7	8.5
100	52.4	18.1	46.0	18.4
110	39.5	25.7	35.7	5.4
125	44.3	39.0	14.3	1.5
170	30.7	29.1	10.8	2.5
200	17.0	12.8	10.8	4.0
205	26.2	15.9	11.4	2.2
210	54.6	32.3	30.8	20.8

ES 2 664 822 T3

	862		872	
Tiempo	Insulina en el Plasma	SEM	Insulina en el plasma	SEM
220	49.7	23.6	70.7	83.5
230	15.0	6.2	76.8	76.4
245	9.7	1.1	47.9	57.8
290	8.5	3.5	8.0	4.1
320	6.8	0.5	8.2	3.0

Tabla 9

	862		872	
Tiempo	GIR	SEM	GIR	SEM
60	0.00	0.00	0.00	0.00
80	0.00	0.00	0.00	0.00
85	0.00	0.00	0.00	0.00
90	0.00	0.00	0.00	0.00
100	3.20	0.86	2.52	1.14
110	2.49	1.03	4.72	1.04
125	1.72	1.58	1.02	0.02
170	2.82	2.87	0.00	0.00
200	1.92	2.16	0.00	0.00
205	0.05	0.06	0.00	0.00
210	0.46	0.56	0.00	0.00
220	2.16	1.41	1.52	0.68
230	1.95	1.74	4.90	1.75
245	2.05	1.16	4.80	6.78
290	0.43	0.41	1.03	1.46
320	0.43	0.41	0.35	0.49

Tabla 10

	862		872	
Tiempo	Glucosa en el Plasma	SEM	Glucosa en el Plasma	SEM
60	111.3	1.8	106.5	2.1
80	108.8	2.0	106.0	1.4
85	108.5	2.2	105.0	1.4
90	106.8	2.6	102.0	1.4

Tiempo	862		872	
	Glucosa en el Plasma	SEM	Glucosa en el Plasma	SEM
100	109.5	5.3	99.5	4.9
110	110.8	2.7	111.5	3.5
125	109.8	1.6	105.5	2.1
170	108.8	2.4	107.5	2.1
200	107.8	1.8	106.5	0.7
205	106.3	2.5	104.5	0.7
210	103.3	3.9	103.5	0.7
220	106.3	4.7	99.0	1.4
230	105.7	3.5	112.0	19.8
245	111.3	4.5	102.5	0.7
290	110.3	4.1	106.5	3.5
320	107.3	1.1	103.5	2.1

EJEMPLO 12

5 Se proporcionaron DS dializadas durante la noche, formuladas como Insugen (R) IN105, en Tris 10 mM, pH 8, con las concentraciones determinadas por cuantificación de HPLC.

Tabla 11

Concentración mg/ml	Muestras de insulina		
	Insugen	IN-105	HIM-2
	2.84	2.65	20

10
15
20
Tabla 11: Concentraciones de insulina dializada usadas para las células 3T3-A31 del estudio de ensayo mitogénico se obtuvieron de ATCC (fibroblastos de ratón, ATCC CCL-163). El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) y el colorante Alamar Blue se obtuvieron de Invitrogen. La solución de IGF1 y 1M HEPES se obtuvo de Sigma Aldrich. Se mantuvieron células 3T3-A31 en DMEM tamponadas con HEPES 10 mM suplementado con FBS al 10% en condiciones humidificadas a 37 °C en una atmósfera de CO2 al 5%. Para el ensayo, las células 3T3-A31 se tripsinizaron con 0.25% de tripsina-EDTA. El número de células se contó por hemocitómetro usando tinción con azul tripán. Se sembraron 10 000 células por pozo en DMEM tamponado con HEPES 10 mM suplementado con FBS al 0.5% en placas de 96 pozos. Se añadieron diversas concentraciones de insulina respectiva por triplicado en los pozos. Después de 20 horas de cultivo con las diversas concentraciones de factores de crecimiento, se añadió colorante Alamar Blue (10% v/v) y las placas se incubaron adicionalmente durante 4 horas más en una incubadora a 37°C. Se midió la fluorescencia (longitud de onda de excitación = 530 nm, longitud de onda de emisión = 590 nm) usando un lector de placas de 96 pozos.

Tabla 12: Comparación de la relación de potencia mitogénica de Insugen frente a IN-105 frente a HIM-2 obtenida a partir del análisis de PLA utilizando 4 puntos en un intervalo lineal.

Insugen	IN-105	HIM-2
1	0.237	0.044
1	0.256	0.021
1	0.286	0.048
Promedio	0.259 ± 0.020	0.0376 ± 0.020

EJEMPLO 13:

5 DS dializado durante la noche formulado como Insugen (R) IN105 en Tris 10 mM, pH 8 con las concentraciones determinadas por cuantificación de HPLC se proporciona en la Tabla 13.

Tabla 13: Concentraciones dializadas utilizadas para el estudio metabólico.

Concentración mg/ml	Muestras de insulina		
	Insugen	IN-105	HIM-2
	2.84	2.65	20

10 Se obtuvieron células 3T3-L1 de ATCC. El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), la solución de penicilina-estreptomocina (10X) y la solución de HEPES 1M se obtuvieron de Invitrogen. Se obtuvieron dexametasona, isobutil metil xantina, 4-amino antipirina, N-etil N-sulfopropil m-toluidina y reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa se obtuvieron de Sigma Aldrich.

15 Se mantuvieron células 3T3-L1 en DMEM tamponado con HEPES 10 mM suplementado con FBS al 10%, 100 U/100 µg de penicilina/estreptomocina (medio de mantenimiento) en condiciones humidificadas a 37 °C en una atmósfera de CO2 al 5%. Para realizar el ensayo metabólico, las células 3T3-L1 tenían que diferenciarse a los adipocitos. Las células 3T3-L1 se tripsinizaron con 0.25% de tripsina-EDTA. El número de células se contó por hemocitómetro usando tinción con azul tripán. Se sembraron 25.000 células por pozo en medio de mantenimiento en placas de 96 pozos. A las células se les permitió alcanzar la confluencia durante los próximos 2 días. El día 3 las células se reemplazaron con medio de diferenciación (Dexametasona 0.5 mM y Isobutil metil xantina 0.25 µM en medio de mantenimiento) durante cuatro días adicionales. El día 7, los medios de diferenciación se reemplazaron de nuevo a medios de mantenimiento durante tres días. El día 9, las células se lavaron con 1X PBS y se prepararon diversas concentraciones de insulina respectiva en tubos de centrifuga de 15 ml en tampón de ensayo de bajo contenido de glucosa suplementado con FBS al 0.5%, L-glutamina 2 mM y Pen-Strep 1X. Las diluciones se añadieron por triplicado en los pozos. Después de 22 horas de cultivo con las diversas concentraciones de insulina, las placas de 96 pozos se retiraron de la incubadora para la estimación de la glucosa. La glucosa se estimó con la ayuda del reactivo GOPOD que convierte la glucosa en el medio en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado reacciona con el sustrato (4-amino antipirina y N-etil N-sulfopropil m-toluidina) para dar un producto de color violeta que puede leerse a una longitud de onda de 550 nm. Cálculos de actividad metabólica: para la representación de datos, se midió el% de glucosa restante en el medio considerando el valor de "sin insulina" como 100%.

35 Los resultados de este ensayo indicaron que las potencias metabólicas de Insugen (R), IN105 y HIM-2 son similares y las potencias están dentro de los límites aceptables (0.8-1.2) del análisis de PLA estableciendo así que Insugen e IN -105 son metabólicamente equipotentes como se representa en la Fig14. La fig. 14 muestra que la potencia metabólica de Insugen (R) frente a IN105 e Insugen (R) frente a HIM-2 es la misma. La relación de potencia metabólica de Insugen (R) a IN105 resultó ser 1.166 e Insugen (R) a HIM-2 resultó ser 1.149. Los datos representados Media ± SEM de las determinaciones por triplicado de un experimento. La Fig. 15 muestra el paralelismo y la linealidad del bioensayo a través de varias concentraciones de Insugen (R) e IN105 determinadas por el software PLA. Los datos representan el promedio ± SEM de los valores triplicados de un experimento.

Tabla 14: Comparación de la rata de potencia metabólica de Insugen frente a IN-105 frente a HIM-2 obtenida a partir del análisis de PLA utilizando 4 puntos en un intervalo lineal.

Insugen	IN-105	HIM-2
1	1.121	1.19
1	1.2	1.104
1	1.179	1.153
Promedio	1.166 ± 0.041	1.149 ± 0.043

EJEMPLO 14:

5 Los diferentes compuestos de insulina se clarificaron mediante el uso de ácido acético glacial (pH ~ 3.4). La solución clarificada se logró después en la columna de fase inversa de sílice C8 y se separó usando una elución en gradiente con ácido acético 250 mM y etanol al 100%. Las fracciones se recogieron durante la elución y se agruparon en función de una pureza mayor o igual al 99%. Este conjunto de elución se dializó durante 15 horas. Usando una
 10 membrana cortada de 1KD contra Tris 10 mM, pH 8.0. Finalmente, Zn dializado e insulina libre de excipiente obtenidas a pH 8.0 se analizaron mediante RP-HPLC analítico. Durante la noche se suministra DS Zinc formulado libre como Insugen (R), IN105 y HIM-2 en Tris 10 mM, pH 8 con las concentraciones determinadas mediante cuantificación de HPLC en la TABLA 15.

Tabla 15

Concentración mg/ml	Muestras de insulina		
	Insugen	IN-105	HIM-2
	0.82	1.38	3.4

15 Las células HepG2 se obtuvieron de ATCC (Catálogo ATCC No. HB-8065). El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), la solución de penicilina-estreptomina 100X y la solución salina HEPES 100X se obtuvieron de Invitrogen. Se obtuvo albúmina sérica bovina, hidróxido sódico,
 20 Tritón-X 100 y bicarbonato sódico de Sigma Aldrich.

25 La insulina humana recombinante radiomarcada se obtuvo de Perkin Elmer con una radioactividad específica de 2200 Ci/mmol (nº de catálogo NEX420). Las células HepG2 se mantienen en DMEM tamponado con HEPES 10 mM suplementado con FBS al 10% y solución de penicilina-estreptomina 1X en condiciones humidificadas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO2. Para el ensayo, las células HepG2 se tripsinizan y se siembran a una densidad de 400000 células por pozo de una placa de 24 pozos. Después de 3 días de incubación, las células se usan para realizar los ensayos de unión de radioligando (1, 2).

30 Antes de realizar el ensayo, se retira el medio y las células se lavan dos veces con el tampón de unión (DMEM, 2.2 mg/ml de bicarbonato de sodio, 1 mg/ml de albúmina de suero bovino y 50 mM de HEPES) para retirar cualquier traza de factores de crecimiento en el medio. Los experimentos de unión competitiva se establecen por duplicado utilizando la cantidad fija de radioligando (0.325 nM) y concentraciones variantes de sustancia de fármaco de insulina fría (de 10⁻¹² M a 10⁻⁷ M). El volumen de reacción final se hace a 1 ml. Las placas se incuban luego a 15 °C durante la noche con agitador ajustado a 100 rpm (2). Al día siguiente, todos los medios de los pozos se descartan y cada pozo se lava dos veces con tampón de unión helado.
 35

40 Cada pozo recibió 1 ml de reactivo de solubilización (hidróxido sódico 0.5 M, Triton-X 100 al 0.5%). Las células solubilizadas se transfieren a un tubo de radioinmunoensayo y la radioactividad unida se lee en un contador gamma (Stratec BioMedical Systems, Alemania). El instrumento se calibró y se encuentra con una eficacia del 80%.

Cálculos de afinidad de unión: para la normalización de los recuentos por minuto (valores de CPM) a diversas concentraciones de insulina utilizadas, el porcentaje de unión se calculó usando la siguiente ecuación;

$$\% \text{ de unión} = (\text{CPM}_{\text{muestra}} - \text{CPM}_{\text{blanco}}) / (\text{CPM}_{\text{control}} - \text{CPM}_{\text{blanco}}) \times 100$$

45 Cuando CPM_{control} es el CPM promedio de los pozos que contenían células con insulina radiomarcada sin ninguna insulina fría agregada, CPM_{blanco} es el CPM promedio de los pozos que no contienen insulina radiomarcada, ni insulina fría y CPM muestra el CPM promedio de los pozos que contenían insulina radiomarcada así como también diversas concentraciones de insulina fría. Tabla 16: Comparación de las Afinidades de Unión en términos de valores de EC50 con su intervalo de confianza del 95%.
 50

ES 2 664 822 T3

	EC50(M)	95% CI para EC50 (M)
Insugen (R)	1.246 X 10 ⁻¹⁰	(1.005, 1.544) X 10 ⁻¹⁰
IN 105	1.185 X 10 ⁻¹⁰	(0.863, 1.626) X 10 ⁻¹⁰
HIM-2	1.157 X 10 ⁻¹⁰	(0.896, 1.495) X 10 ⁻¹⁰

5 La descripción y los ejemplos anteriores se han proporcionado solo para facilitar su comprensión. No deben entenderse allí limitaciones innecesarias, ya que las modificaciones serán obvias para los expertos en la materia que reconocerán que la invención puede ponerse en práctica con modificaciones y variaciones dentro del espíritu de las reivindicaciones adjuntas.

10 La descripción anterior de una realización preferida y mejor modo de la invención conocida por el solicitante en el momento de la presentación de la solicitud se ha presentado y está destinada a los fines de ilustración y descripción. No pretende ser exhaustivo o limitar la invención a la forma precisa divulgada, y son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores. La realización se eligió y describió con el fin de explicar mejor los principios de la invención y su aplicación práctica y para permitir que otros expertos en la técnica utilicen mejor la invención en diversas realizaciones y con diversas modificaciones que sean adecuadas para el uso particular contemplado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de IN-105 que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos C₄-C₁₂ saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sus sales y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un disgregante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante y opcionalmente incluye aglutinantes, plastificantes, potenciadores de la permeación y solubilizantes, en donde el lubricante es estearato de magnesio.
- 10 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el componente de ácido graso es ácido cáprico y/o ácido láurico o sus sales, en particular caprato de sodio.
- 15 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el aglutinante se selecciona del grupo que comprende povidona, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, almidón, gelatina, azúcares, gomas naturales y sintéticas o sus combinaciones de las mismas.
- 20 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el diluyente se selecciona del grupo que comprende sales de calcio, celulosa o derivados de celulosa, palatinosa, ácidos orgánicos, azúcares y alcoholes de azúcar, sales de pectato o combinaciones de los mismos.
- 25 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el disgregante se selecciona del grupo que consiste en povidona reticulada, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, resinas de intercambio catiónico, ácido algínico, goma guar y sus combinaciones.
- 30 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, donde el potenciador de permeación se selecciona del grupo que comprende lauril sulfato de sodio, laurato de sodio, palmitoil carnitina, fosfatidilcolina, ciclodextrina y derivados de ciclodextrina, carnitina, derivados de carnitina, polímeros mucoadhesivos, toxina de zonula occludens, sales biliares, ácidos grasos o combinaciones de los mismos.
- 35 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el plastificante se selecciona del grupo que comprende polietilenglicol, propilenglicol, citrato de acetilo, triacetina, monoglicérido acetilado, aceite de colza, aceite de oliva, aceite de sésamo, citrato de acetiltriethyl, sorbitol de glicerina, dietiloxalato, dietilmalato, dietilfumarato, dibutilsuccinato, dibutilftalato, dioctilftalato, dibutilsebacato, trietilcitrato, tributilcitrato, gliceroltributirato, gliceriltriacetato o mezclas de los mismos.
- 40 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la forma de dosificación oral está en forma de una tableta, cápsula, partículas, polvo o bolsita o suspensiones secas.
- 45 9. Un proceso para fabricar una composición farmacéutica sólida administrable por vía oral de IN 105, que comprende aproximadamente 0.01% -20% p/p de IN-15, aproximadamente 10% -60% p/p de ácidos grasos C₄-C₁₂ saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sus sales y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un disgregante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante, en donde el lubricante es estearato de magnesio, y opcionalmente incluye aglutinantes, plastificantes, potenciadores de permeación y solubilizantes, que comprende los pasos de
- 50 a. Triturar un ácido graso C₄-C₁₂ saturado o insaturado adecuado y/o sales de dicho ácido graso; b
b. Granular el ácido graso resultante obtenido del paso (a) con un disolvente orgánico;
c. Secar al aire los gránulos obtenidos del paso (b);
d. Raspar los gránulos secos a través de una malla para obtener gránulos del tamaño de partícula deseado;
e. Mezclar los gránulos de ácido graso con el complejo conjugado catión-insulina con los otros excipientes; y
f. Comprimir la mezcla combinada para la formación de tabletas
- o que comprende los pasos de:
- 55 i. Triturar ácidos grasos C₄-C₁₂ saturados o insaturados adecuados y/o sales de tales ácidos grasos y un aglutinante;
ii. Suspender el complejo conjugado de catión-insulina en un disolvente orgánico usando el aglutinante para formar una masa húmeda;
iii. Granulación de los componentes obtenidos del paso (ii) usando el aglutinante;
iv. Raspado de los gránulos secos del paso (iii);
60 v. Mezclar los gránulos con otros excipientes; y
vi. Comprimir la mezcla combinada para la formación de tabletas.
- 65 10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el disolvente orgánico utilizado se selecciona del grupo que comprende isopropanol, acetona, alcohol metílico, metil isobutil cetona, cloroformo, 1-propanol, 2-propanol, acetonitrilo, 1-butanol, 2-butanol, alcohol etílico, ciclohexano, dioxano, acetato de etilo, dimetilformamida,

dicloroetano, hexano, isooctano, cloruro de metileno, alcohol terc-butílico, tolueno, tetracloruro de carbono o combinaciones de los mismos.

- 5 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que está en forma de una tableta de 50 mg, una tableta de 100 mg, una tableta de 150 mg, una tableta de 200 mg, una tableta de 500 mg o una tableta de 250 mg.
- 10 12. Un método para preparar partículas secas por aspersión amorfas que comprenden aproximadamente 0.01% - 20% p/p de IN-105, aproximadamente 10% 60% p/p de ácidos grasos C₄-C₁₂ saturados o insaturados, ésteres de ácidos grasos o sales de los mismos y al menos tres excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en al menos 10% p/p de un desintegrante, 10% p/p de un diluyente, 0.5% p/p de un lubricante en el que el lubricante es estearato de magnesio, y opcionalmente incluyendo aglutinantes, plastificantes, potenciadores de permeación y solubilizadores, dicho método comprende los pasos de
- 15 a. Preparar una solución o suspensión que comprende el conjugado de compuesto de catión-insulina y un componente de ácido graso en un disolvente;
 b. Pulverizar la solución en una cámara en condiciones que permitan que se elimine una cantidad sustancial del solvente; y
 c. Proporcionar partículas secadas por pulverización del conjugado compuesto de catión-insulina.
- 20 13. El método según la reivindicación 12, en el que el componente de ácido graso se selecciona de un grupo que comprende ácido graso C₄-C₁₂ y/o sales de dicho ácido graso, en particular caprato de sodio.
14. El método según la reivindicación 12, en el que el disolvente es agua.
- 25 15. El método según la reivindicación 12, en el que la solución o suspensión que comprende el IN105 y un componente de ácido graso en un disolvente comprende además un diluyente, en particular manitol.
16. El método según la reivindicación 12, en el que el tamaño de las partículas secadas por pulverización es de aproximadamente 1-100 µm.
- 30 17. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la solución o suspensión que comprende el IN 105 se seca por pulverización a una temperatura que oscila entre 80 °C - 150 °C.
- 35 18. El método de acuerdo con la reivindicación 12, la presión de atomización empleada para el secado por pulverización está en el intervalo de 0.5 kg/cm² a 1.5 kg/cm².
19. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en el que la pureza de la composición secada por pulverización de IN 105 es al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%.
- 40 20. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque exhibe una mitogenicidad tres veces menor en comparación con su contraparte nativo.
21. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en la que el alcohol de azúcar es manitol.

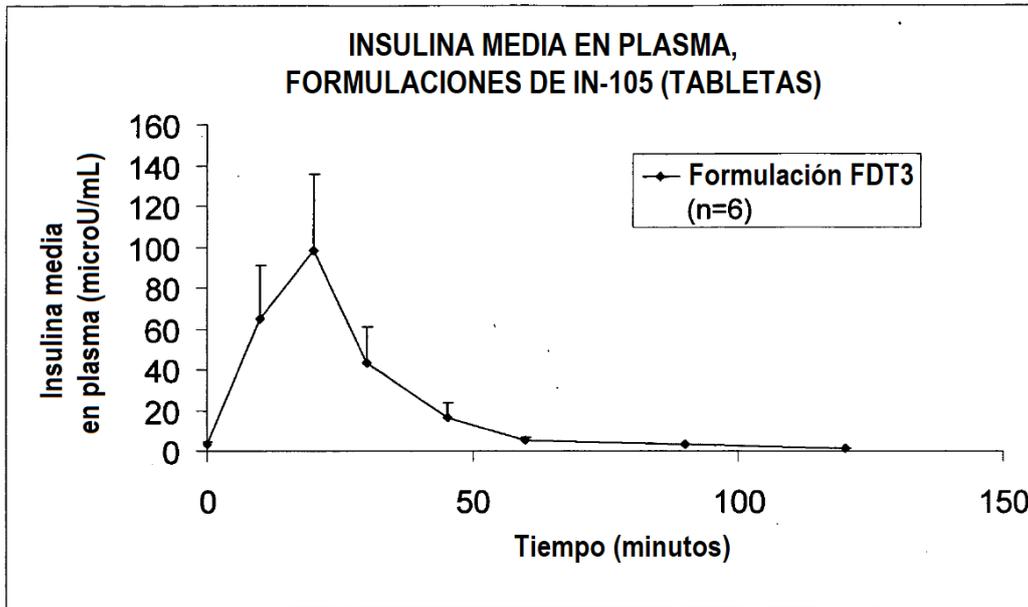


Fig.1: Perfil de insulina media en plasma – tabletas de formulación de N-105 (FDT-3)

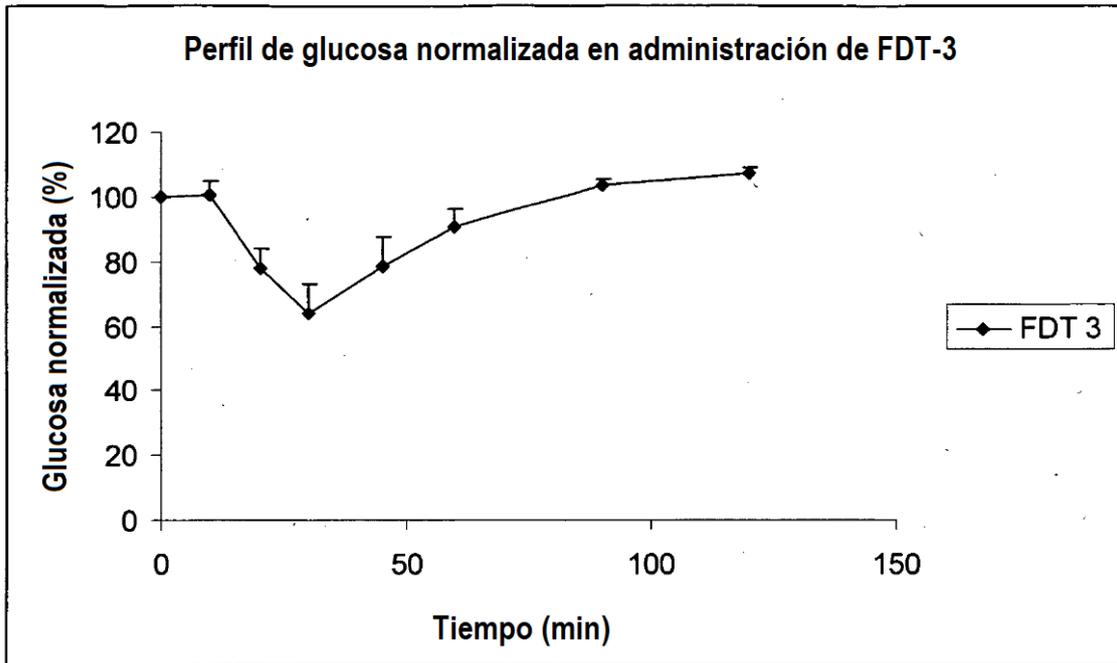


FIG 2: Perfil de glucosa normalizada en administración de FDT-3

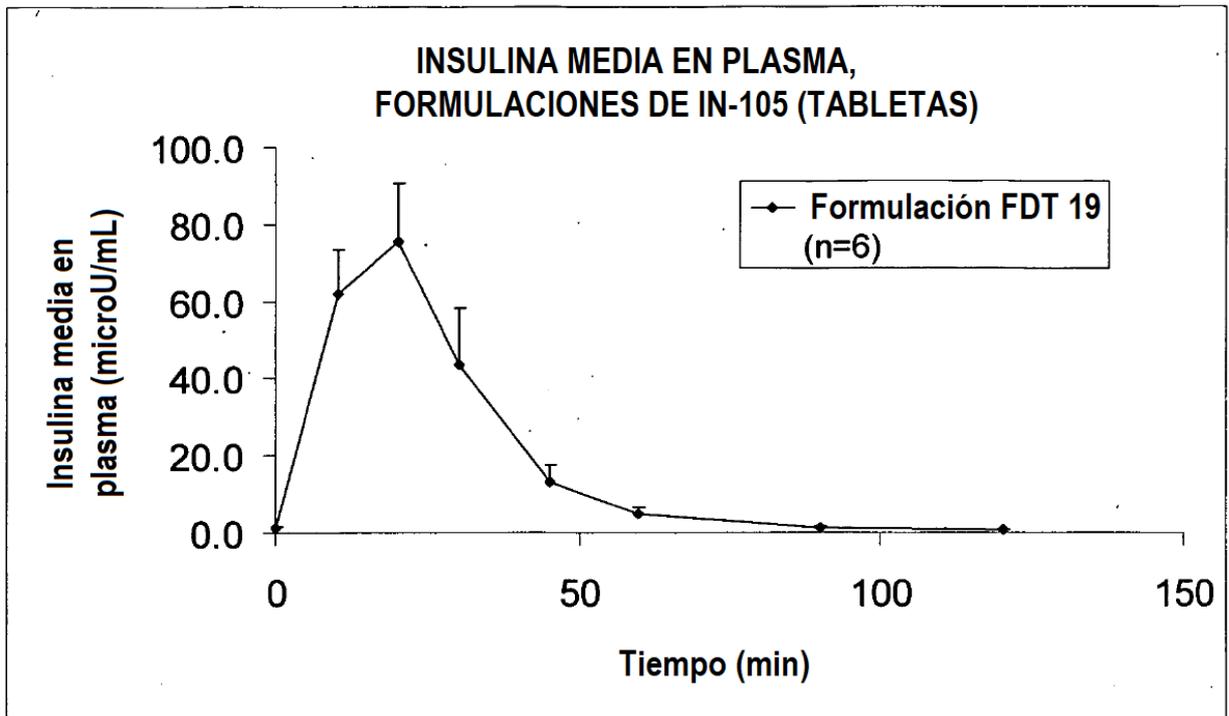


FIG 3: Perfil de insulina media en plasma – tabletas de formulación de IN-105 (FDT-19)

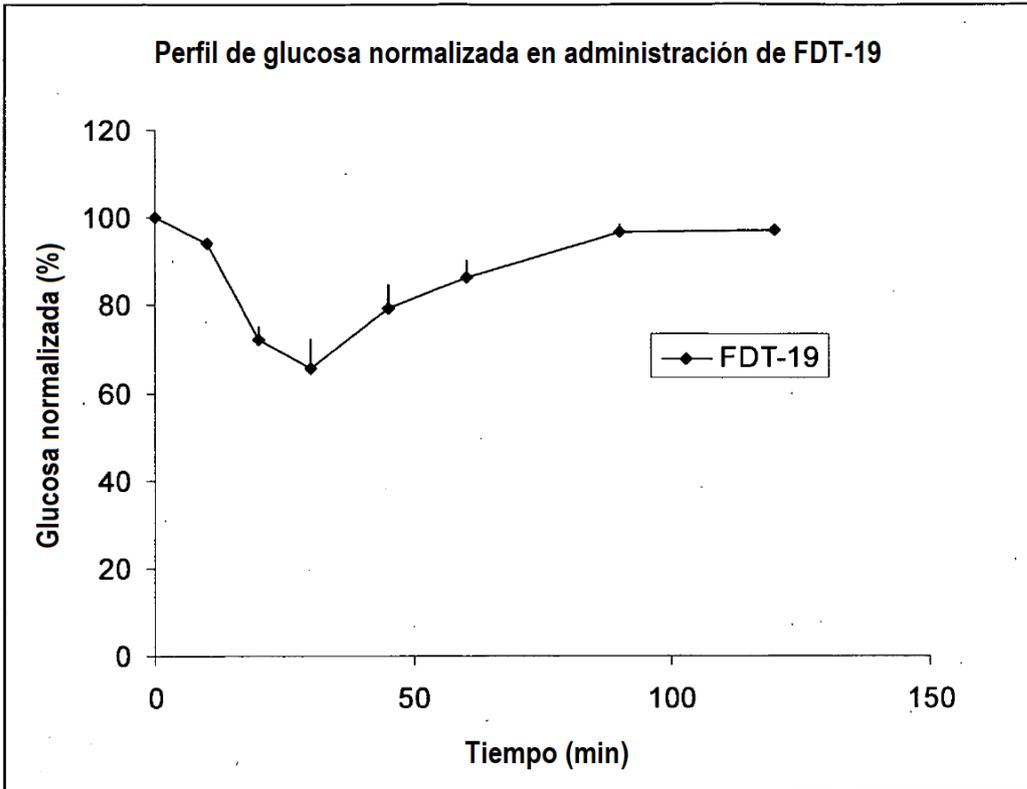


FIG 4: Perfil de glucosa normalizada en administración de FDT-19

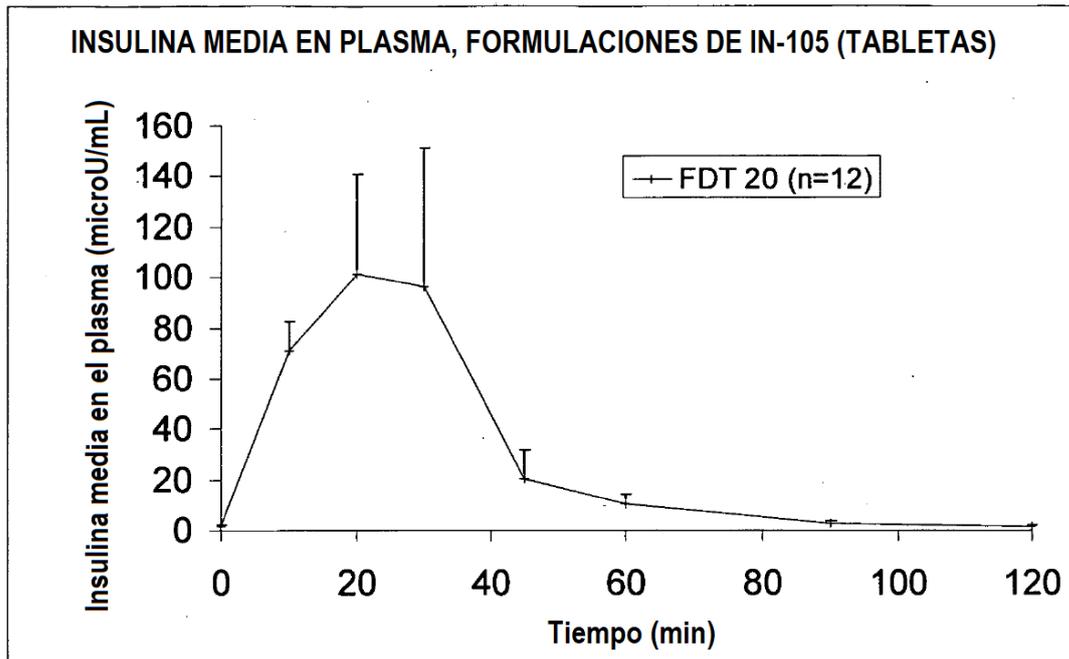


FIG 5: Perfil de insulina media en plasma – tabletas de formulación de IN-105 (FDT-20)

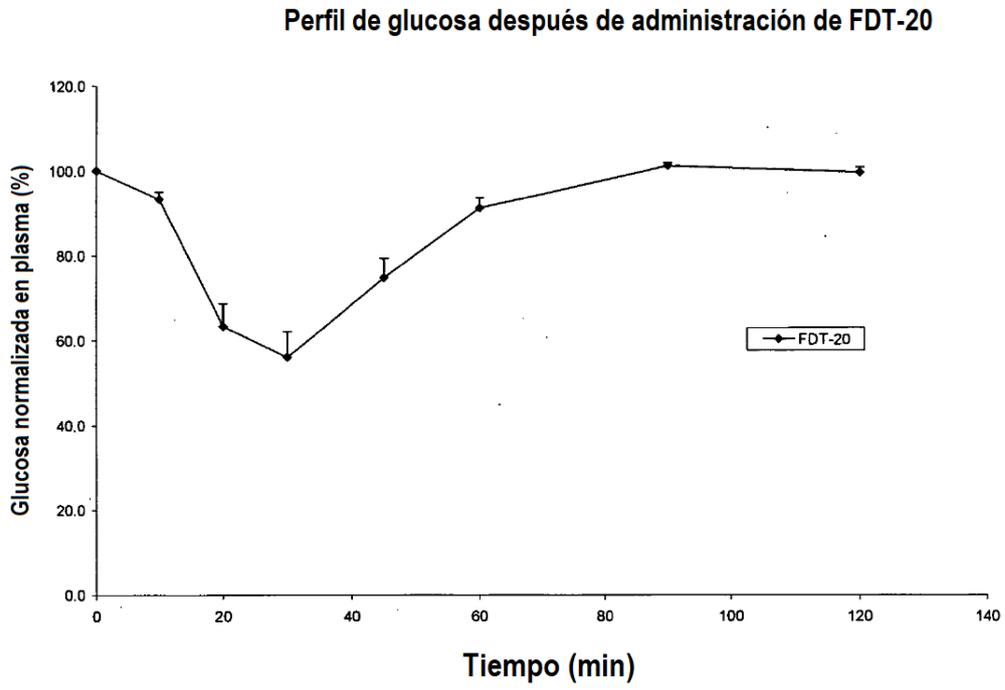


FIG 6: Perfil de glucosa después de administración de DFT-20

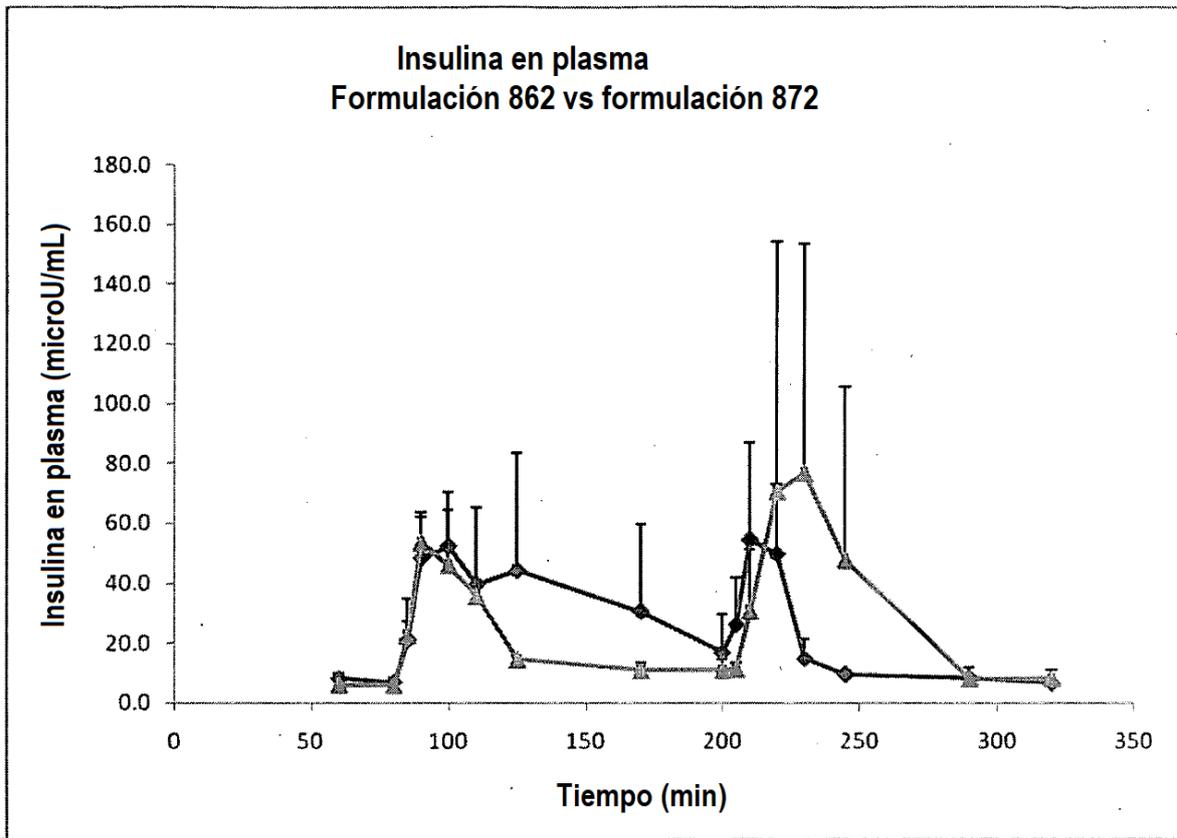


FIG 7: Perfil de insulina en plasma

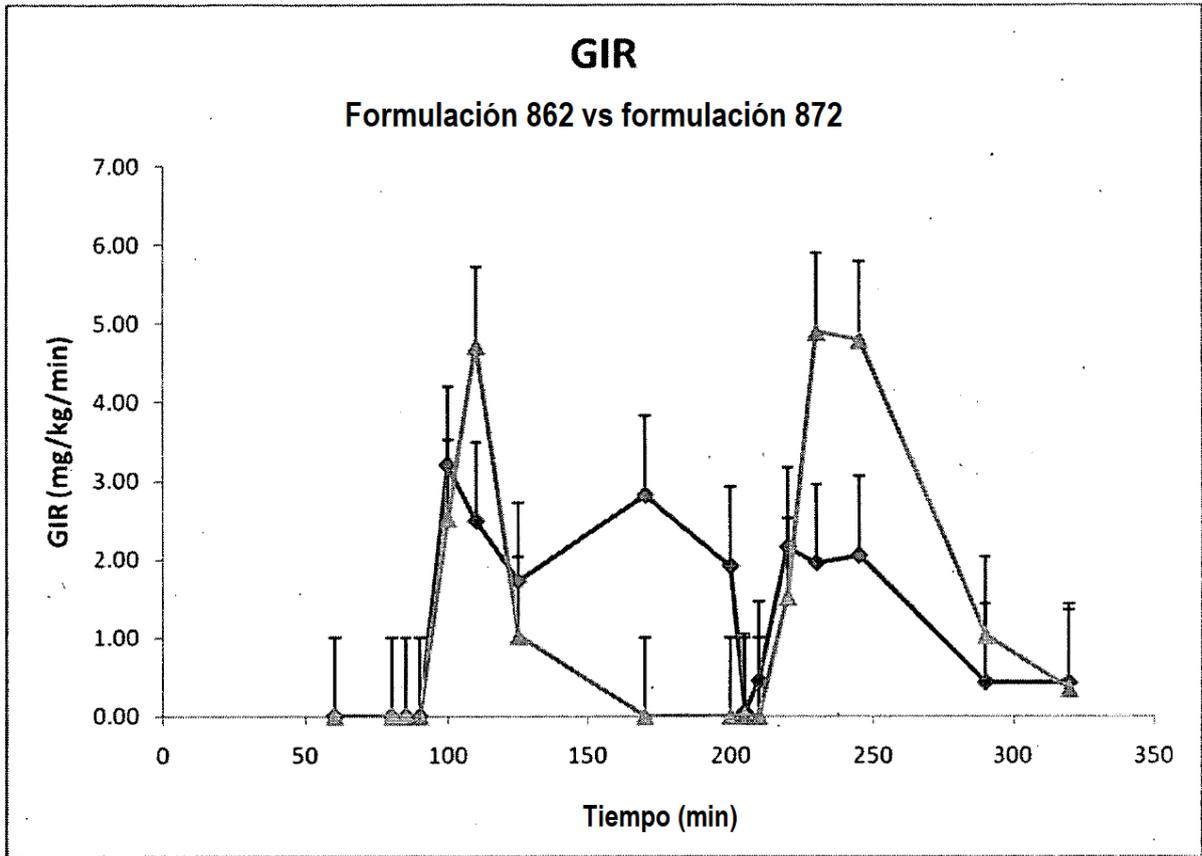


FIG 8: Perfil de proporción de infusión de glucosa

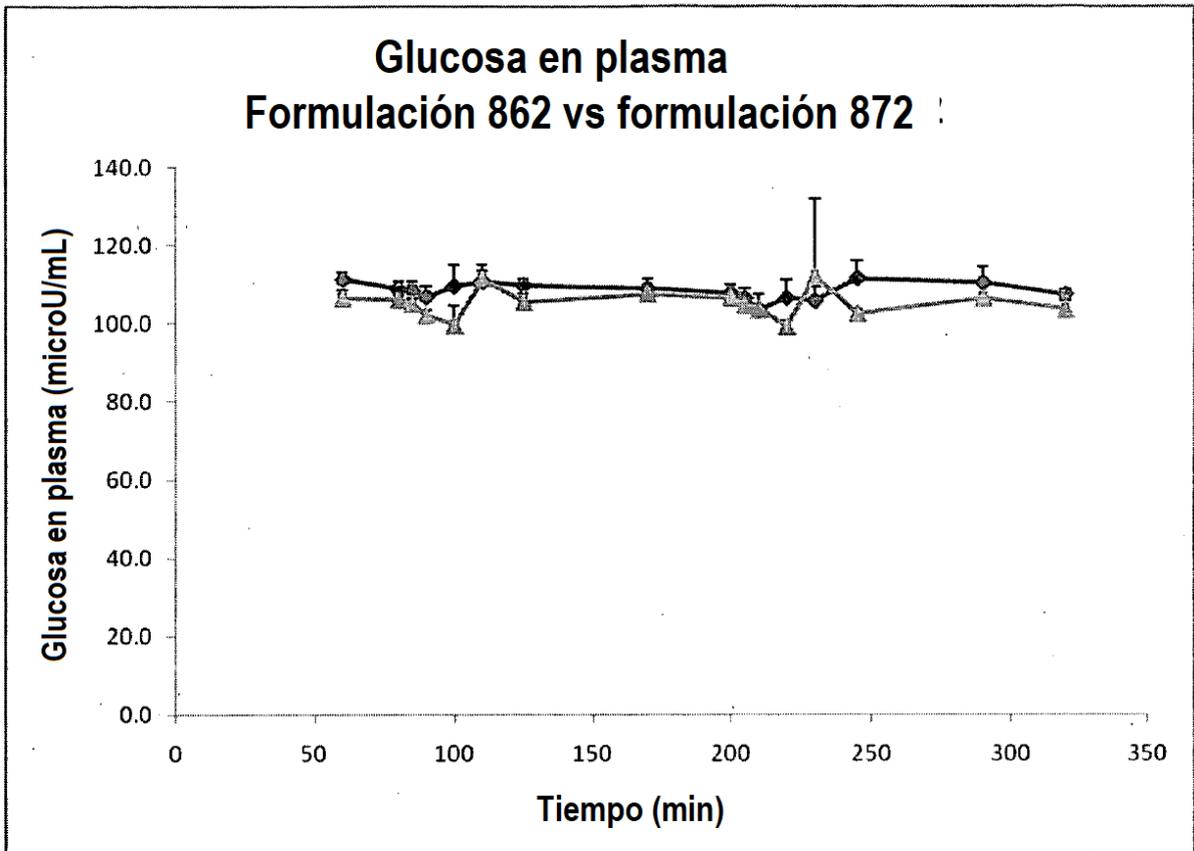


FIG 9: Perfil de glucosa en plasma

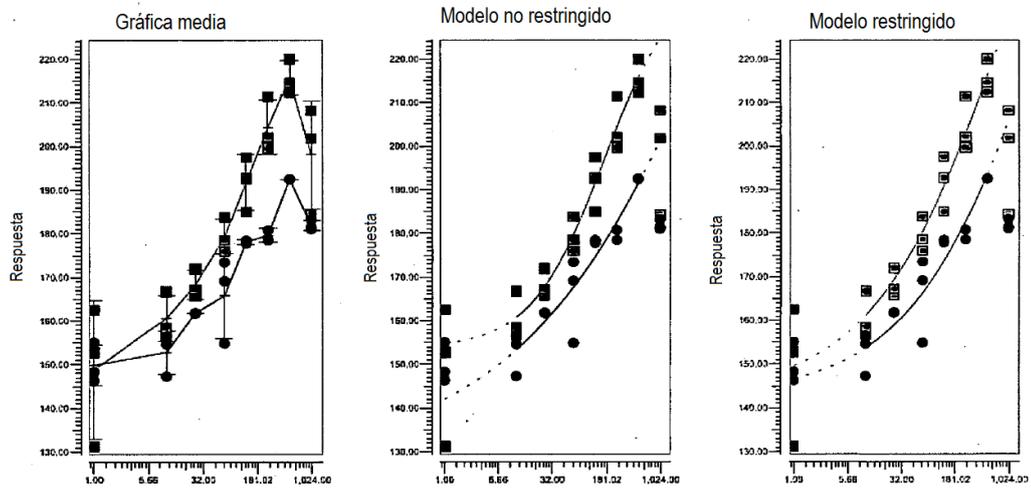
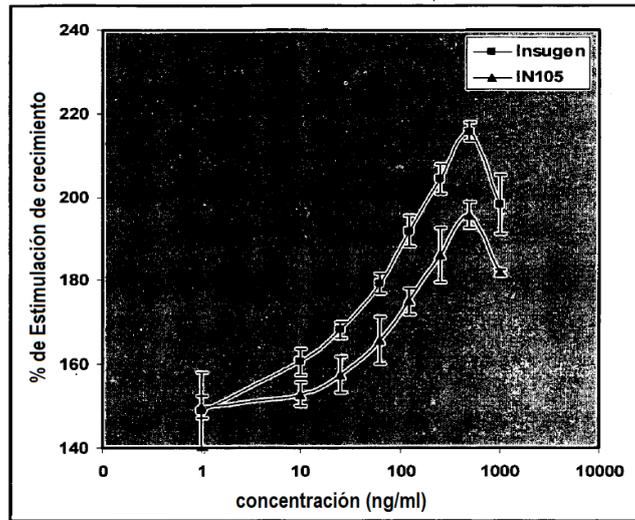


FIG 10: Paralelismo y linealidad del bioensayo a través de diversas concentraciones de Insugen® e IN-105 determinado mediante el software PLA. Los datos representan el promedio \pm SEM de valores triplicados de un experimento

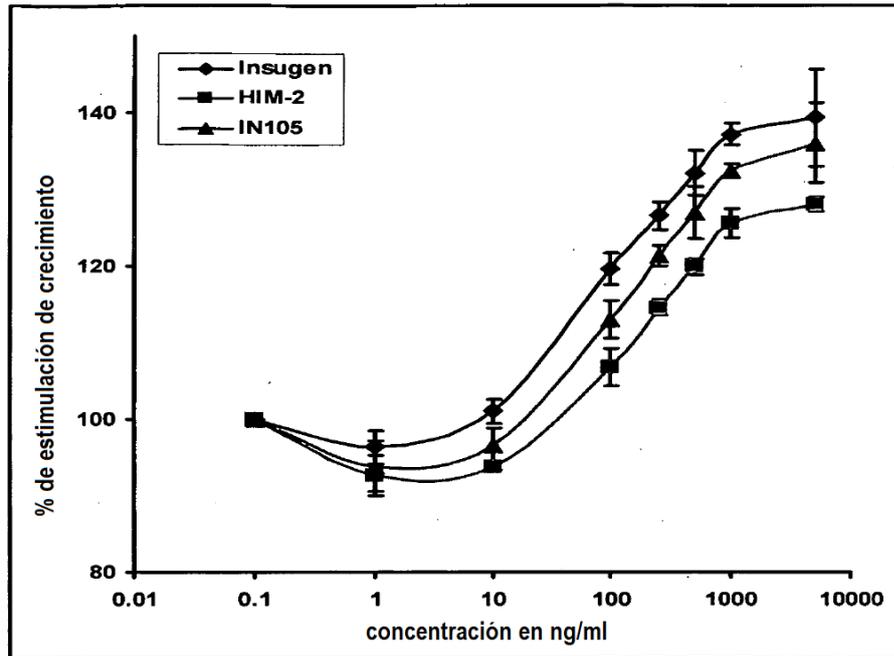


FIG 11: Potencia mitogénica comparada de Insugen versus IN-105 e HIM-2 del análisis PLA utilizando 4 puntos en un rango lineal

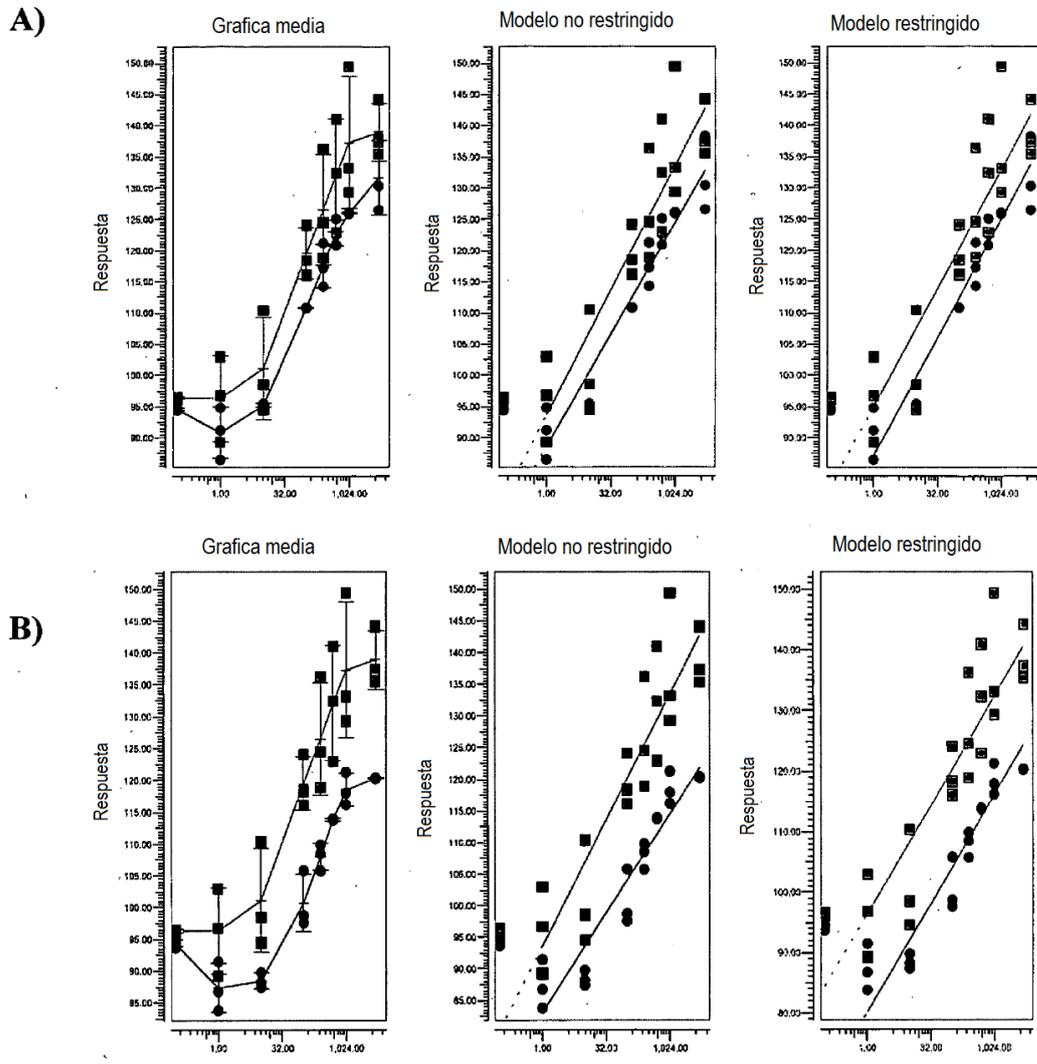


FIG 12: Paralelismo y linealidad del bioensayo a través de diversas concentraciones de Insugen (R) versus IN-105 (A) e Insugen versus HIM-2 (B) determinado mediante el software PLA. Los datos representan el promedio \pm SEM de valores triplicados de un experimento.

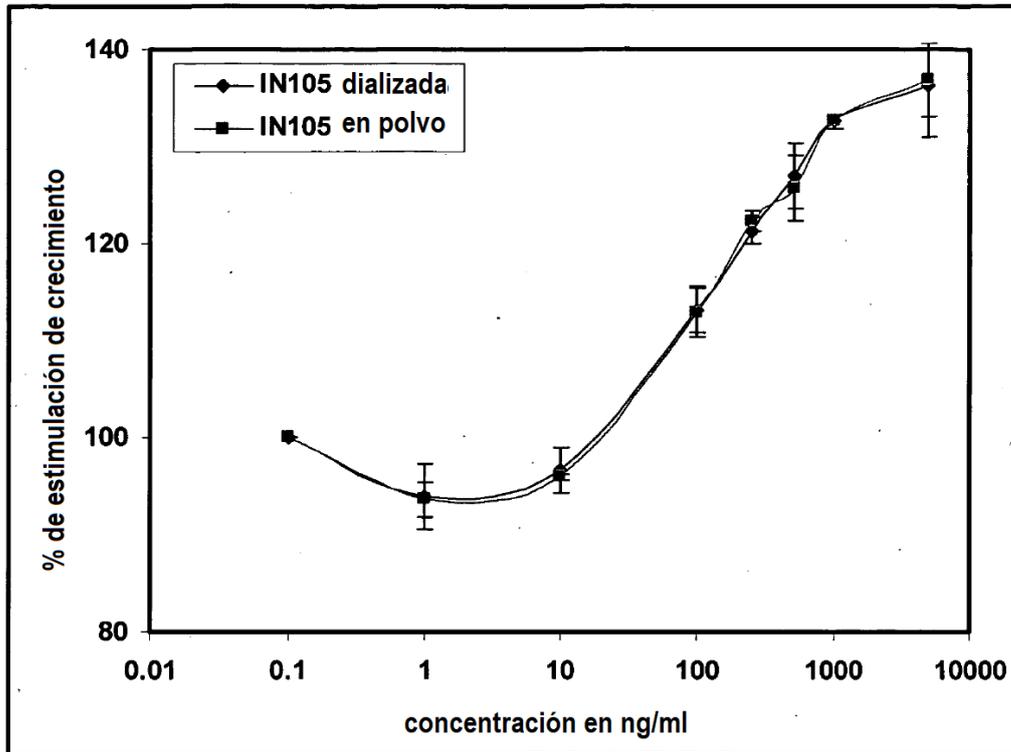


FIG 13: Actividad mitogénica de IN-105 dializada comparada con IN-105 en polvo para análisis PLA utilizando 4 puntos en un intervalo lineal

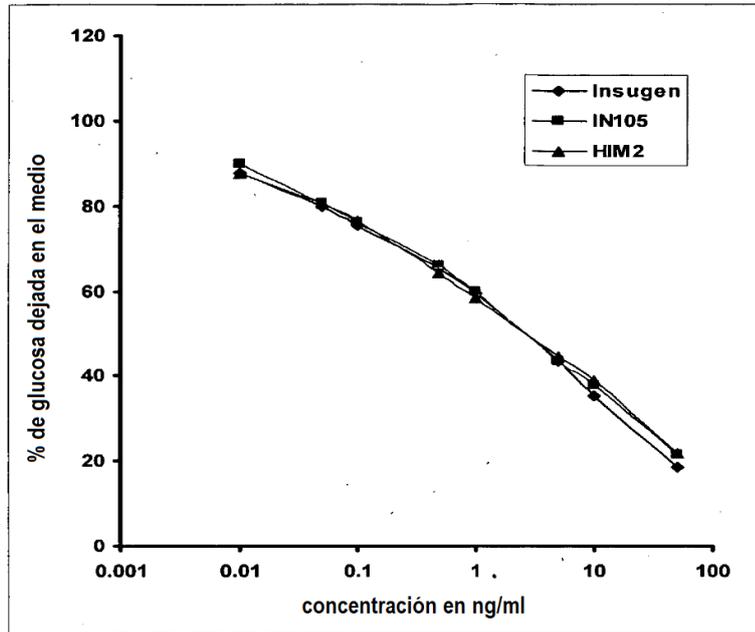
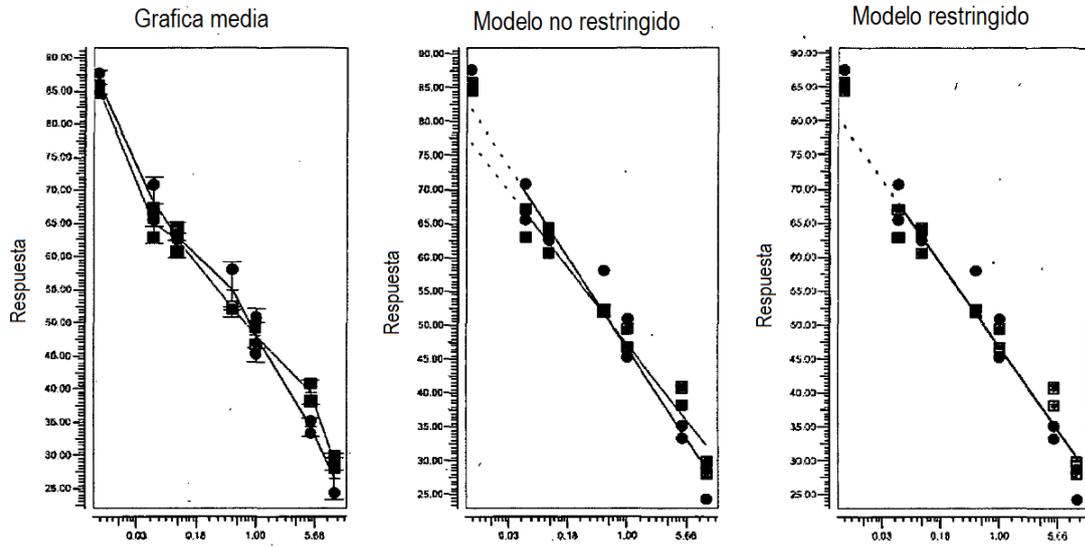


FIG 14: Comparación de la potencia metabólica entre Insugen (R), IN105 y HIM-2

A)



B

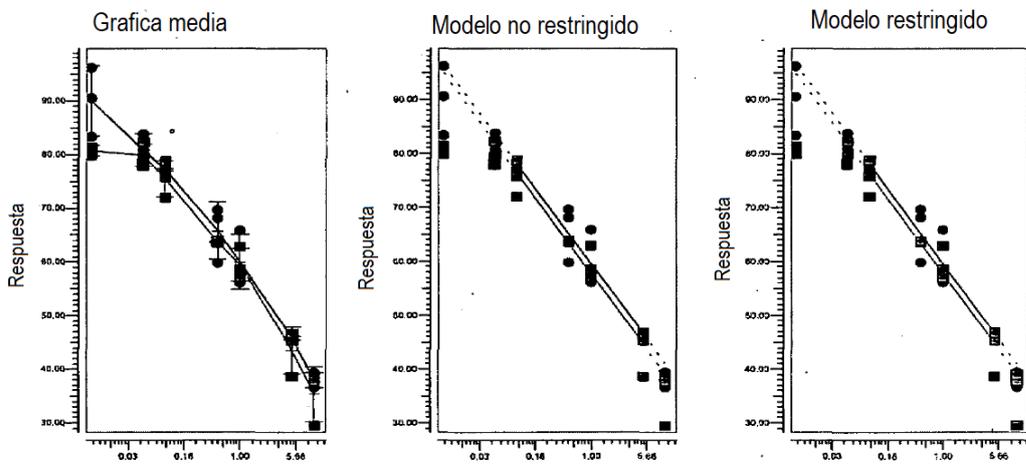
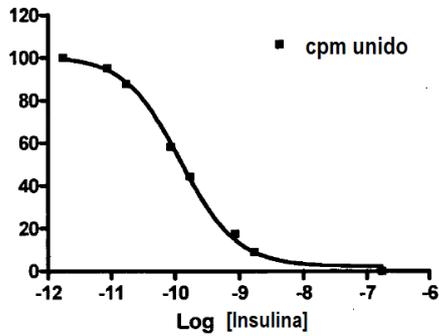


FIG 15: Paralelismo y linealidad del bioensayo a través de diversas concentraciones de Insugen (R) versus IN-105 (A) e Insugen versus HIM-2 (B) determinado mediante el software PLA. Los datos representan el promedio \pm SEM de valores triplicados de un experimento.

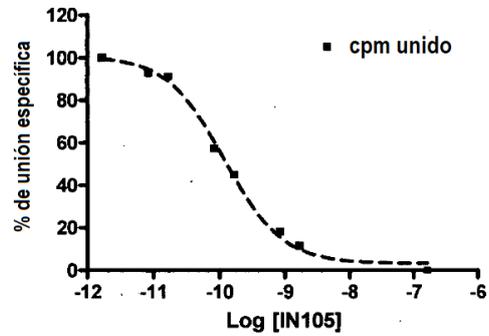
A)

Curva de unión de Insulina Perkin Elmer Radiomarcada con insulina R fría



B)

Curvas de unión de insulina Perkin Elmer Radiomarcada con IN105 frío



C)

Curva de unión de insulina Perkin Elmer Radiomarcada con HIM-2 frío

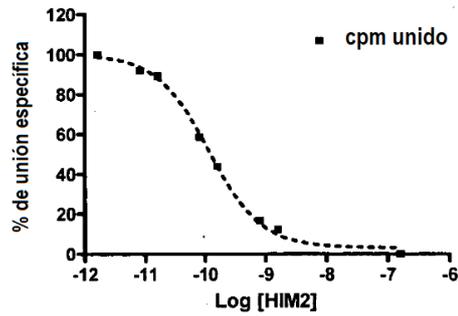


FIG 16: Curvas de competición de un sitio de (A) Insugen (R), (B) IN105 y (C) HIM-2, respectivamente. Las curvas fueron determinadas mediante el software Graph Pad versión 4. Los datos representan el promedio de los valores triplicados de un experimento.