(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 670 969**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/28 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/34 (2007.01)
A61K 47/36 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2013** **PCT/FR2013/052736**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014** **WO14076423**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2013** **E 13801658 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018** **EP 2919804**

(54) Título: **Formulación de acción rápida de insulina que comprende un compuesto aniónico sustituido**

(30) Prioridad:

13.11.2012 FR 1260808
13.11.2012 US 201261725775 P
14.11.2012 FR 1260855
14.11.2012 US 201261726349 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2018

(73) Titular/es:

ADOCIA (100.0%)
115, Avenue Lacassagne
69003 Lyon, FR

(72) Inventor/es:

SOULA, OLIVIER;
SOULA, GÉRARD;
DAUTY, EMMANUEL y
CHARVET, RICHARD

(74) Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 670 969 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

FORMULACIÓN DE ACCIÓN RÁPIDA DE INSULINA QUE COMPRENDE UN COMPUESTO ANIÓNICO SUSTITUIDO

La presente invención se refiere a una formulación de acción rápida de insulina.

Desde la producción de la insulina por ingeniería genética, a principios de los años 80, los pacientes diabéticos se benefician de la insulina humana para tratarse. Este producto ha mejorado mucho esta terapia ya que se encuentra que se eliminan los riesgos inmunológicos relacionados con la utilización de insulina no humana, en particular de cerdo. Sin embargo, la insulina humana inyectada por vía subcutánea tiene un efecto hipoglucémico sólo después de 60 minutos, lo que implica que los pacientes diabéticos tratados con insulina humana deben proceder a la inyección 30 minutos antes de la comida.
Uno de los problemas a resolver para mejorar la salud y la comodidad de los pacientes diabéticos es poner a su disposición formulaciones de insulina que permitan una respuesta hipoglucémica más rápida que la de la insulina humana y, si fuera posible, que se acerquen a la respuesta fisiológica de la persona sana. La secreción de insulina endógena en el individuo sano se desencadena inmediatamente por el aumento de la glucemia. El objetivo es reducir al máximo el periodo de tiempo entre la inyección de insulina y el comienzo de la comida.
Hoy en día, se acepta que la provisión de las poblaciones de este tipo es útil para la gestión de la enfermedad de la mejor forma posible.
La ingeniería genética ha permitido proporcionar una respuesta con el desarrollo de análogos de insulina rápidos. Estas insulinas se modifican en uno o dos aminoácidos para absorberse más rápidamente en el compartimiento sanguíneo después de una inyección subcutánea. Estas insulinas lispro (Humalog®, Lilly), Aspart (Novolog®, Novo) y glulisina (Apidra®, Sanofi Aventis) son soluciones estables de insulina con una respuesta hipoglucemiante más rápida que la de la insulina humana. Por lo tanto, los pacientes tratados con estos análogos de insulina rápidos pueden proceder a la inyección de insulina sólo 15 minutos antes de la comida.
El principio de los análogos de insulina rápidos es formar hexámeros a la concentración de 100 UI/ml para asegurar la estabilidad de la insulina en el producto comercial a la vez que se favorece la disociación muy rápida de estos hexámeros en monómeros después de la inyección por vía subcutánea con el fin de obtener una acción rápida.
La insulina humana tal como se formula en su forma comercial, no permite obtener una respuesta hipoglucemiante próxima en términos de cinética de la respuesta fisiológica generada por el inicio de una comida (aumento de la glucemia), así como la concentración de uso (100 UI/ml), en presencia de cinc y otros excipientes tales como el fenol o el *m*-cresol, se ensambla en forma de hexámero mientras que está activa en forma de monómero y de dímero. La insulina humana esta preparada en forma de hexámeros para ser estable aproximadamente 2 años a 4 ºC ya que en forma de monómeros, tiene una propensión muy elevada a agregarse y a continuación a fibrilar, lo que va a hacer que pierda su actividad. Además, en esta forma agregada, presenta un riesgo inmunológico para el paciente.
Las disociaciones de los hexámeros en dímeros y de los dímeros en monómeros retrasan su acción aproximadamente 20 minutos en comparación con un análogo de insulina rápida (BrangeJ., et ál., Advanced Drug Delivery Review, 35,1999, 307-335).
Además, la cinética de paso de los análogos de insulinas en la sangre, así como su cinética de reducción de la glucemia, no son óptimas y existe una necesidad real de una formulación que tenga un tiempo de acción incluso más corto con el fin de aproximarse a las cinéticas de secreción de la insulina endógena en las personas sanas.
La compañía Biodel ha propuesto una solución a este problema con una formulación de insulina humana que comprende EDTA y ácido cítrico tal como se describe en la solicitud de patente US200839365. El EDTA, por su capacidad para formar complejos con los átomos de cinc y el ácido cítrico, por sus interacciones con las zonas catiónicas presentes en la superficie de la insulina, se describen como desestabilizantes de la forma hexamérica de la insulina y que de ese modo reducen su tiempo de acción.
Sin embargo, una formulación de este tipo presenta en particular como inconveniente la disociación de la forma hexamérica de la insulina que es la única forma estable susceptible de responder a las exigencias de estabilidad de los reglamentos farmacéuticos.
A nombre de la solicitante también se conoce la solicitud PCTWO2010/122385 que describe unas formulaciones de insulina humana o análogo y que permite resolver los diferentes problemas mencionados anteriormente por la adición de un polisacárido sustituido que comprende unos grupos carboxilos.

Sin embargo, las exigencias generadas por el uso crónico e intensivo Incluso el uso pediátrico de las formaciones de este tipo llevan al experto en la materia a investigar para utilizar excipientes cuya masa molar y su tamaño sean lo más reducido posible para facilitar su eliminación.
Los polisacáridos que se describen en las solicitudes WO 2010/122385A1 y US2012/094902A1 como excipientes son compuestos constituidos por cadenas en las que las longitudes son estadísticamente

variables y presentan una gran riqueza de sitios de interacción posibles con unos principios activos proteicos. Esta riqueza podría inducir a una falta de especificidad en términos de interacción y una molécula más pequeña y mejor definida podría permitir ser más específica para este sujeto.

Además, una molécula con una cadena principal bien definida en general se puede trazar más fácilmente (MS/MS por ejemplo) en los medios biológicos durante experimentos de farmacocinética o de ADME (administración, distribución, metabolismo, eliminación) con respecto a un polímero que generalmente proporciona una señal muy difusa y que produce una señal de ruido en espectrometría de masas.

Por el contrario, no se excluye que una molécula bien definida y más corta pueda presentar un déficit de sitios de interacción posibles con unos principios activos proteicos. En efecto, debido a su tamaño reducido no presentan las mismas propiedades que los polímeros de tipo polisacárido ya que existe una pérdida del efecto de polímero tal como se ha demostrado en los ejemplos comparativos de la parte experimental, incluso en particular en los ensayos de solubilización de la insulina en el punto isoeléctrico y los ensayos de interacción con una proteína modelo tal como la albúmina.

A pesar de estos resultados desalentadores, la solicitante ha conseguido poner a punto unas formulaciones susceptibles de acelerar la insulina utilizando un compuesto aniónico sustituido en combinación con un compuesto polianiónico.

Además, como en el caso de la utilización de polisacáridos, la naturaleza hexamérica de la insulina no se ve afectada, por lo tanto la estabilidad de las formulaciones no se ve afectada, tal como por cierto se ha confirmado con los ejemplos de estado de asociación de insulina humana y análogo en dicroísmo circular en presencia de compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención.

La presente invención permite resolver los diferentes problemas que se han expuesto anteriormente ya que permite realizar en particular una formulación de insulina, humana o análogo, capaz, después de su administración, de acelerar el paso de la insulina humana o de sus análogos en la sangre y de reducir más rápidamente la leucemia en comparación con los productos comerciales de insulina correspondientes.

La invención consiste en una composición, en solución acuosa, que comprende insulina en forma hexamérica, al menos un compuesto aniónico sustituido y un compuesto polianiónico, no polimérico.

Por « compuesto aniónico sustituido » se hace referencia a compuestos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u comprendido entre 1 y 8 ($1 \leq u \leq 8$) de unidades de sacárido idénticas o diferentes, unidas por unos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes, siendo dichas unidades de sacárido elegidas entre el grupo constituido por las hexosas, en forma cíclica o en forma reducida abierta, comprendiendo dicho compuesto grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables.

En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.

En un modo de realización, la insulina es la insulina humana.

Por insulina humana se hace referencia a una insulina obtenida por síntesis o recombinación en la que la secuencia peptídica es la secuencia de la insulina humana, incluyendo las variaciones alélicas y los homólogos.

En un modo de realización, la insulina es una insulina humana recombinante tal como se describe en la Farmacopea europea y en la Farmacopea americana.

En un modo de realización, la insulina es un análogo de insulina.

Por análogo de insulina se hace referencia a una insulina recombinante en la que la secuencia primaria contiene al menos una modificación con respecto a la secuencia primaria de la insulina humana.

En un modo de realización el análogo de insulina es elegida entre el grupo constituido por la insulina lispro (Humalog®), la insulina Aspart (Novolog®, Novorapid®) y la insulina glulisina (Apidra®).

En un modo de realización, el análogo de insulina es la insulina lispro (Humalog®).

En un modo de realización, el análogo de insulina es la insulina Aspart (Novolog®, Novorapid®).

En un modo de realización, el análogo de insulina es la insulina glulisina (Apidra®).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido es elegido entre los compuestos aniónicos sustituidos, en estado aislado o en mezcla, constituidos por una cadena principal formada por un número discreto o comprendido entre 1 y 8 ($1 \leq u \leq 8$) de unidades de sacárido idénticas o diferentes, unidas por unos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes, siendo dichas unidades de sacárido elegidas entre el grupo constituido por las hexosas, en forma cíclica o en forma reducida abierta, caracterizadas porque ellos están substituidos por:

a) al menos un sustituyente de fórmula general I:

$$-[R_1]_a-[AA]_m \qquad \text{Fórmula I}$$

- los sustituyentes siendo idénticos o diferentes cuando hay al menos dos sustituyentes, en el que:
  - el radical -[AA] designa un resto de aminoácido,
  - el radical $-R_1$ siendo:
    - o bien un enlace y entonces a = 0, y el resto de aminoácido -[AA] se une directamente a la cadena principal mediante un grupo funcional G.
    - o bien una cadena de carbono y entonces a = 1, de C2 a C15 eventualmente sustituida y/o comprendiendo al menos un heteroátomo elegido entre O, N y S y al menos un grupo funcional ácido antes de la reacción con el aminoácido, formando dicha cadena

con el resto de aminoácido -[AA] un grupo funcional amida, y se fija sobre la cadena principal con la ayuda de un grupo funcional F resultante de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional o un sustituyente llevado por el precursor del radical -R1-,

- F es un grupo funcional elegido entre los grupos funcionales éter, éster o carbamato,
- G es un grupo funcional carbamato,
- m es igual a 1 ó 2,
- el grado de sustitución de las unidades de sacárido, j, en $-[R_1]_a-[AA]_m$ siendo estrictamente superior a 0 e inferior o igual a 6, $0 < j \leq 6$

b) y, eventualmente, uno o varios sustituyentes $-R'_1$,

- el sustituyente $-R_1$ siendo una cadena de carbono de C2 a C15, eventualmente sustituida y/o comprendiendo al menos un heteroátomo elegido entre O, N y S y al menos un grupo funcional ácido en forma de sal de cationes alcalinos estando dicha cadena unida a la cadena principal mediante un grupo funcional F' que resulta de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional o un sustituyente llevado por el precursor del sustituyente $-R'_1$,
- F' es un grupo funcional éter, éster o carbamato,
- el grado de sustitución de las unidades de sacárido, i, en $-R'_1$, estando comprendido entre 0 y 6-j, $0 \leq i \leq 6-j$ y,
- F y F' son idénticos o diferentes,
- F y G son idénticos o diferentes,
- $i + j \leq 6$.
- $-R'_1$ idéntico o diferente a $-R_1-$,
- Los grupos funcionales ácidos salificables libres llevados por el sustituyente $-R'_1$ se encuentran en forma de sales de cationes alcalinos,
- dichos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes siendo elegidos entre el grupo constituido por los enlaces glucosídicos de tipo (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) ó (1,6), en una geometría alfa ó beta.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, en estado aislado o en mezcla, es elegido entre les compuestos aniónicos sustituidos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto o comprendido entre 1 y 8 ($1 \leq u \leq 8$) de unidades de sacárido idénticas o diferentes, unidas por unos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes, siendo dichas unidades de sacárido elegidas entre las hexosas, en forma cíclica o en forma reducida abierta, caracterizadas:

a) porque ellos son sustituídos de forma estadística por:

- al menos un sustituyente de fórmula general I:

$$-[R_1]_a-[AA]_m \qquad \text{Fórmula I}$$

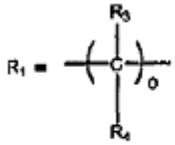
- los sustituyentes siendo idénticos o diferentes cuando hay al menos dos sustituyentes, en el que:
- el radical -[AA]- designa un resto de aminoácido, siendo dicho aminoácido elegido entre el grupo constituido por fenilalanina, alfa-metil-fenilalanina, 3,4 dihidroxifenilalanina, tirosina, alfa-metil-tirosina, O-metil-tirosina, alfa-fenilglicina, 4-hidroxifenilglicina, 3,5-dihidroxidfenilglicina y sus sales de cationes alcalinos, teniendo dichos derivados una configuración absoluta L o D, -[AA] es fijado sobre la cadena principal de la molécula por medio de una ramificación de enlace $-R_1-$ o se une directamente a la cadena principal mediante un grupo funcional G,
- $-R_1-$ siendo:
  - o bien un enlace G, y entonces a = 0,
  - o bien una cadena de carbono, y entonces a = 1, de C2 a C15 eventualmente sustituida y/o comprendiendo al menos un heteroátomo elegido entre O, N y S y que lleva al menos un grupo funcional ácido antes de la reacción con el aminoácido, formando dicha cadena con el resto de aminoácido
  - [AA] un enlace amida, y es fijado sobre la cadena principal de sacárido con la ayuda de un grupo funcional F resultante de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional llevado por el precursor de R_1,
- F es un grupo funcional éter, éster o carbamato,
- G es un grupo funcional carbamato,
- m es igual a 1 ó 2,
- el grado de sustitución, j, en $-[R_1]_a-[AA]_m$ siendo estrictamente superior a 0 e inferior o igual a 6, $0 < j \leq 6$,

y, eventualmente,

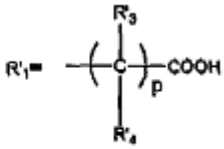
- uno o varios sustituyentes $-R'_1$,
- $-R'_1$ siendo una cadena de carbono de C2 a C15, eventualmente sustituida y/o que comprende al menos un heteroátomo (tales como O, N y S) y que lleva al menos un grupo funcional ácido en forma de sal de cationes alcalinos estando dicha cadena fijada sobre la cadena principal de sacárido con un grupo funcional F' que resulta de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional llevado por el precursor de $-R'_1$,

- F' es un grupo funcional éter, éster o carbamato,
- el grado de sustitución i, en $-R'_1$ estando comprendido entre 0 y 6-j, $0 \leq i \leq 6-j$, y,
- $-R'_1-$ idéntico o diferente a $-R_1$,
- F y F' idénticos o diferentes,
- F' y G idénticos o diferentes
- Los grupos funcionales ácidos salifiables libres se encuentran en forma de sales de cationes alcalinos,

b) dichos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes siendo elegidos entre el grupo constituido por los enlaces glucosídicos de tipo (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) ó (1,6), en una geometría alfa o beta,
c) $i + j \leq 6$.
En un modo de realización, m es igual a 1.
En un modo de realización, $-R_1$ y -R'1, idénticos o diferentes son una cadena de carbono de C2 a C8.
En un modo de realización, $-R_1$ y -R'1, idénticos o diferentes son una cadena de carbono de C2 a C4.
i y j son grados de sustitución estadísticos y representan el número promedio de sustituyentes por unidad de sacárido. Al tener cada unidad de sacárido varios grupos funcionales hidroxilo de reactividad diferente, la distribución de los sustituyentes en los compuestos aniónico sustituidos puede ser diferente de una unidad de sacárido a otra en el seno de un mismo compuesto polianiónico.
En un modo de realización $0,3 \leq i$.
En un modo de realización $0,4 \leq i$.
En un modo de realización $i \leq 3$.
En un modo de realización $i \leq 2,5$.
En un modo de realización $0,3 \leq j$.
En un modo de realización $0,4 \leq j$.
En un modo de realización $j \leq 2$.
En un modo de realización $j \leq 1,8$.
En un modo de realización, se tiene i y j de modo que $0 < i + j \leq 6$.
En un modo de realización, $0 < i + j \leq 5$.
En un modo de realización, $0 < i + j \leq 4$.
En un modo de realización, $0 < i + j \leq 3$.
En un modo de realización, $0 < i + j \leq 2,5$.
En un modo de realización, $0 < i + j \leq 2$.
En un modo de realización, $0,5 \leq i + j \leq 3$.
En un modo de realización, $0,5 \leq i + j \leq 2,5$.
En un modo de realización, $0,5 \leq i + j \leq 2$.
En un modo de realización, $0,6 \leq i + j \leq 3,5$.
En un modo de realización, $0,8 \leq i + j \leq 2,5$.
En un modo de realización, $0,7 \leq i + j \leq 2,5$.
En un modo de realización, $0,7 \leq i + j \leq 2$.
En un modo de realización, $1 < i + j \leq 2,5$.
En un modo de realización, $1 < i + j \leq 2$.
En un modo de realización, -R1 y -R'1 se fijan a la cadena principal mediante un enlace éter.
En un modo de realización cuando -R1- es una cadena de carbono que se fija directamente sobre la cadena principal mediante un enlace éter.
En un modo de realización, cuando -R1- es una cadena de carbono ésta comprende eventalmente un heteroátomo elegido entre el grupo constituido por O, N y S.
En un modo de realización, -R1- forma con el resto de aminoácido AA un enlace amida, y se fija directamente sobre la cadena principal mediante un grupo funcional F éter.
En un modo de realización, -R1- forma con el resto de aminoácido AA un enlace amida, y se fija directamente sobre la cadena principal mediante un grupo funcional F carbamato.
En un modo de realización, -R1- forma con el resto de aminoácido AA un enlace amida, y se fija directamente sobre la cadena principal mediante un grupo funcional F éster.
En un modo de realización, -R1- y -R'1 son elegidos entre los radicales de fórmulas II y III



Fórmula II

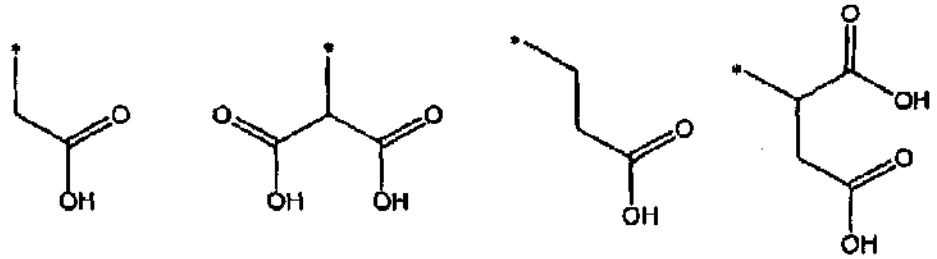


Fórmula III

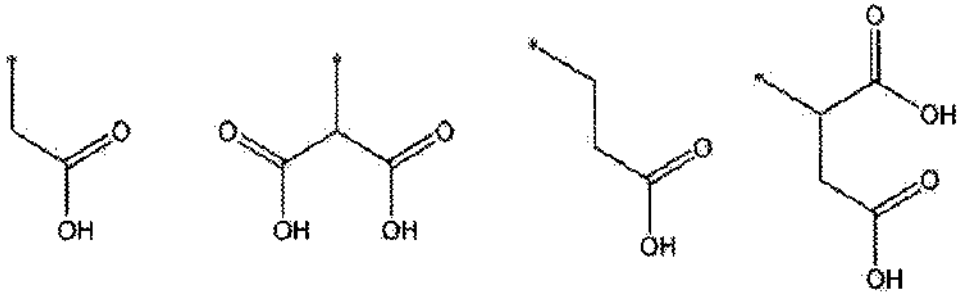
en las cuales;

- o y p son idénticos o diferentes, superiores o iguales a 1 e inferiores o iguales a 12, y
- $-R_3$, $-R'_3$, $-R_4$ y $-R'_4$ idénticos o diferentes son elegidos entre el grupo constituido por un átomo de hidrógeno, un alquilo saturado o insaturado, lineal, ramificado o cíclico de C1 a C6, un bencilo, un alquil-arilo de C7 a C10 y que comprende eventualmente unos heteroátomos elegidos entre el grupo constituido por O, N y/o S, o los grupos funcionales elegidos entre el grupo constituido por los grupos funcionales ácido carboxílico, amino, alcohol o tiol.

En un modo de realización, -R1- antes de su unión a -AA-, es $-CH_2-COOH$.
En un modo de realización, los compuestos aniónicos sustituidos de acuerdo con la invención, se caracterizan porque el radical -R'1 es $-CH_2-COOH$.
En un modo de realización, -R1- antes de su unión opcional a -AA-, se obtiene a partir del ácido cítrico.
En un modo de realización, -R1- antes de su unión opcional a -AA-, se obtiene a partir del ácido málico.
En un modo de realización, -R'1 se obtiene a partir del ácido cítrico.
En un modo de realización, -R'1 se obtiene a partir del ácido málico.
En un modo de realización, -R1-, antes de su unión a -AA, es elegido entre los siguientes grupos, en los que * representa el sitio de unión a F:



o sus sales de cationes alcalinos elegidos entre el grupo constituido por Na + o K +.
En un modo de realización, -R'1 es elegido entre los siguientes grupos, en los cuales * representa el sitio de unión a F:



o sus sales de cationes alcalinos elegidos entre el grupo constituido por Na + o K +.
En un modo de realización, el radical -[AA] es un resto de fenilalanina y de sus sales de cationes alcalinos de configuración absoluta L, D o racémica.
En un modo de realización, el radical -[AA] es un resto de alfa-metil-fenilalanina y de sus sales de cationes alcalinos de configuración absoluta L, D o racémica.
En un modo de realización, el radical -[AA] es un resto de 3,4 dihidroxifenilalanina y de sus sales de cationes alcalinos de configuración absoluta L, D o racémica.
En un modo de realización, el radical -[AA] es un resto de la tirosina y de sus sales de cationes alcalinos de configuración absoluta L, D o racémica.
En un modo de realización, el radical -[AA] es un resto de alfa-metil-tirosina y de sus sales de cationes alcalinos de configuración absoluta L, D o racémica.
En un modo de realización, el radical -[AA] es un resto de O-metil-tirosina y de sus sales de cationes alcalinos de configuración absoluta L, D o racémica.
En un modo de realización, el radical -[AA] es un resto de alfa-fenilglicina y de sus sales de cationes alcalinos de configuración absoluta L, D o racémica.
En un modo de realización, el radical -[AA] es un resto de 4-hidroxifenilglicina y de sus sales de cationes alcalinos de configuración absoluta L, D o racémica.
En un modo de realización, el radical -[AA] es un resto de 3,5-dihidroxifenilglicina y de sus sales de cationes alcalinos de configuración absoluta L, D o racémica.
En un modo de realización, el radical -[AA] es un resto de aminoácido en forma de mezcla racémica.
En un modo de realización, el radical -[AA] es un resto de aminoácido en forma de isómeros de configuración absoluta D, aislados.
En un modo de realización, el radical -[AA] es un resto de aminoácido en forma de isómeros de configuración absoluta L, aislados.
En un modo de realización, u está comprendido entre 1 y 5.
En un modo de realización, u está comprendido entre 3 y 5.
En un modo de realización, u = 8.
En un modo de realización, u = 7.
En un modo de realización, u = 6.
En un modo de realización, u = 5.
En un modo de realización, u = 4.

En un modo de realización, u = 3.
En un modo de realización, u = 2.
En un modo de realización, u = 1.
En un modo de realización, las hexosas son elegidas entre el grupo constituido por manosa, glucosa, fructosa, sorbosa, tagatosa, psicosa, galactosa, alosa, altrosa, talosa, idosa, gulosa, fucosa, fuculosa, ramnosa, manitol, sorbitol y galactitol (dulcitol).
En un modo de realización, los enlaces glucosídicos son de tipos (1,4) ó (1,6).
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido idénticas o diferentes escogidas entre las hexosas unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,1).
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido diferentes elegidas entre las hexosas y unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,1), siendo dicha cadena principal de sacárido elegida entre el grupo constituido por trehalosa y sacarosa.
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido idénticas o diferentes elegidas entre las hexosas unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,2).
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido idénticas o diferentes elegidas entre las hexosas unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,2), dicha cadena principal de sacárido siendo kojibiosa.
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido idénticas o diferentes elegidas entre las hexosas unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,3).
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido idénticas o diferentes elegidas entre las hexosas unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,3), siendo dicha cadena principal de sacárido elegida entre el grupo constituido por nigeriosa y laminarribiosa.
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido idénticas o diferentes elegidas entre las hexosas unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,4).
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido idénticas o diferentes elegidas entre las hexosas unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,4), siendo elegida dicha cadena principal de sacárido entre el grupo constituido por maltosa, lactosa y celobiosa.
En un modo de realización el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido idénticas o diferentes elegidas entre las hexosas unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,6).
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido idénticas o diferentes elegidas entre las hexosas unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,6), siendo dicha cadena principal de sacárido elegida entre el grupo constituido por isomaltosa, melibiosa y gentiobiosa.
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido idénticas o diferentes elegidas entre las hexosas unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,6), siendo dicha cadena principal de sacárido isomaltosa.
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido en la que una está en forma cíclica y la otra en forma reducida abierta.
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u = 2 de unidades de sacárido en la que una está en forma cíclica y la otra en forma reducida abierta, siendo dicha cadena principal de sacárido elegida entre el grupo constituido por maltitol e isomaltitol.
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido está formada por un número discreto $3 \leq u \leq 8$ de unidades de sacárido idénticas o diferentes.
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque al menos una de las unidades de sacárido idénticas o diferentes, que componen la

cadena principal de sacárido formada por un número discreto 3 ≤ u ≤ 8 de unidades de sacárido, es elegido entre el grupo constituido por motivos de hexosa unidos por enlaces glucosídicos idénticos o diferentes.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes, que componen la cadena principal de sacárido formada por un número discreto 3 ≤ u ≤ 8 de unidades de sacárido, son elegidas entre las hexosas y están unidas por al menos un enlace glucosídico de tipo (1,2).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes, que componen la cadena principal de sacárido formada por un número discreto 3 ≤ u ≤ 8 de unidades de sacárido, son elegidas entre las hexosas y están unidas por al menos un enlace glucosídico de tipo (1,3).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes, que componen la cadena principal de sacárido formada por un número discreto 3 ≤ u ≤ 8 de unidades de sacárido, son elegidas entre las hexosas y están unidas por al menos un enlace glucosídico de tipo (1,4).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes, que componen la cadena principal de sacárido formada por un número discreto 3 ≤ u ≤ 8 de unidades de sacárido, son elegidas entre las hexosas y están unidas por al menos un enlace glucosídico de tipo (1,6).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido está formada por un número discreto u = 3 de unidades de sacárido idénticas o diferentes.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque comprende al menos una unidad de sacárido elegida entre el grupo constituido por hexosas en forma cíclica y al menos una unidad de sacárido elegida entre el grupo constituido por hexosas en forma abierta.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las tres unidades de sacárido son idénticas.

En un modo de realización el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque dos de las tres unidades de sacárido son idénticas.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas son elegidas entre las hexosas en las que dos se encuentran en forma cíclica y una se encuentra en forma reducida abierta y están unidas por enlaces glucosídicos de tipo (1,4).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza por que las unidades de sacárido idénticas son elegidas entre las hexosas en las que dos se encuentran en forma cíclica y una se encuentra en forma reducida abierta y están unidas por enlaces glucosídicos de tipo (1,6).

En un modo de realización el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes son elegidas entre las hexosas y porque la hexosa central está unida por un enlace glucosídico de tipo (1,2) y por un enlace glucosídico de tipo (1,4).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes son elegidas entre las hexosas y porque la hexosa central está unida por un enlace glucosídico de tipo (1,3) y por un enlace glucosídico de tipo (1,4).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes son elegidas entre las hexosas y porque la hexosa central está unida por un enlace glucosídico de tipo (1,2) y por un enlace glucosídico de tipo (1,6).

En un modo de realización el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes son elegidas entre las hexosas y porque la hexosa central está unida por un enlace glucosídico de tipo (1,2) y por un enlace glucosídico de tipo (1,3).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes son elegidas entre las hexosas y porque la hexosa central está unida por un enlace glucosídico de tipo (1,4) y por un enlace glucosídico de tipo (1,6).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la erlosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las tres unidades de sacárido idénticas o diferentes son motivos de hexosa elegidos entre el grupo constituido por manosa y glucosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la maltotriosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la isomaltotriosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido está formada por un número discreto u = 4 de unidades de sacárido idénticas o diferentes.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las cuatro unidades de sacárido son idénticas.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque tres de las cuatro unidades de sacárido son idénticas.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las cuatro unidades de sacárido son motivos de hexosa elegidos entre el grupo constituido por manosa y glucosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza por que la cadena principal de sacárido es la maltotetraosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes son elegidas entre las hexosas y porque una hexosa terminal está unida por un enlace glucosídico de tipo (1,2) y porque las otras están unidas entre sí por un enlace glucosídico de tipo (1,6).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes son elegidas entre las hexosas y están unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,6).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido está formada por un número discreto u = 5 de unidades de sacárido idénticas o diferentes.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las cinco unidades de sacárido son idénticas.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las cinco unidades de sacárido son unos motivos de hexosa elegidos entre el grupo constituido por manosa y glucosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes son elegidas entre las hexosas y están unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,4).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la maltopentaosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido está formada por un número discreto u = 6 de unidades de sacárido idénticas o diferentes.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las seis unidades de sacárido son idénticas.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes son elegidas entre las hexosas y están unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,4).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las seis unidades de sacárido idénticas o diferentes son motivos de hexosa elegidos entre el grupo constituido por manosa y glucosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la maltohexaosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido está formada por un número discreto u = 7 de unidades de sacárido idénticas o diferentes.

En un modo de realización el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las siete unidades de sacárido son idénticas.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes son elegidas entre las hexosas y están unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,4).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las siete unidades de sacárido son motivos de hexosa elegidos entre el grupo constituído por manosa y glucosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la maltoheptaosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido está formada por un número discreto u = 8 de unidades de sacárido idénticas o diferentes.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las ocho unidades de sacárido son idénticas.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque las unidades de sacárido idénticas o diferentes son elegidas entre las hexosas y están unidas por un enlace glucosídico de tipo (1,4).

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se

caracteriza porque las ocho unidades de sacárido son motivos de hexosa elegidos entre el grupo constituido por manosa y glucosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la maltooctaosa.

En un modo de realización el compuesto aniónico sustituido que comprende un número discreto de motivos de sacárido es un compuesto natural.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido que comprende un número discreto de motivos de sacárido es un compuesto sintético.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque se obtiene por degradación enzimática de un polisacárido seguido por una purificación.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque es obtenido por degradación química de un polisacárido seguido de una purificación.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque es obtenido por vía química, por acoplamiento covalente de precursores de peso molecular más bajo.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la soforosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la sacarosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la lactulosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la maltulosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la leucrosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la rutinosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la isomaltulosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la fucosillactosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la gentianosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la rafinosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la melecitosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la panosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la cestosa.

En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la cadena principal de sacárido es la estaquiosa.

En un modo de realización, el compuesto polianiónico es un compuesto polianiónico no polimérico (PNP) en el que la afinidad hacia el cinc es inferior a la afinidad de la insulina hacia el cinc y en el que la constante de disociación Kd_{Ca} = [compuesto PNP]^r [Ca^2 +]^s/[compuesto PNP)^r-(Ca^2 +)^s] es inferior o igual a $10^{-1,5}$.

Las constantes de disociación (Kd) de los diferentes compuestos polianiónicos con respecto a iones de calcio se determinan mediante calibración externa con la ayuda de un electrodo específico para los iones de Calcio (Mettler Toledo) y un electrodo de referencia. Todas las mediciones son efectuadas en 150 mM de NaCl a pH 7. Solamente se determinan las concentraciones de iones de calcio libres; los iones de calcio unidos al compuesto polianiónico no inducen potencial de electrodo.

En un modo de realización, el compuesto polianiónico es elegido entre el grupo constituido por poliácidos carboxílicos y sus sales de Na^+, K^+, Ca^{2+} o Mg^{2+}.

En un modo de realización, el poliácido carboxílico es elegido entre el grupo constituido por ácido cítrico, ácido tartárico, y sus sales de Na^+, K^+, Ca^{2+} o Mg^{2+}.

En un modo de realización, el compuesto polianiónico es elegido entre el grupo constituido por poliácidos fosfóricos y sus sales de Na^+, K^+, Ca^{2+} o Mg^{2+}.

En un modo de realización, el poliácido fosfórico es el trifosfato y sus sales de Na^+, K^+, Ca^{2+} o Mg^{2+}.

En un modo de realización, el compuesto polianiónico es el ácido cítrico y sus sales de Na^+, K^+, Ca^{2+} o Mg^{2+}.

En un modo de realización, el compuesto polianiónico es el ácido tartárico y sus sales de Na^+, K^+, Ca^{2+} o Mg^{2+}.

En un modo de realización, el compuesto polianiónico es el ácido trifosfórico y sus sales de Na^+, K^+, Ca^{2+} o Mg^{2+}.

En un modo de realización, el compuesto polianiónico es un compuesto constituido por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto de unidades de sacárido obtenido a partir de un compuesto disacárido elegido entre el grupo constituido por trehalosa, maltosa, lactosa, sacarosa, celobiosa, isomaltosa, maltitol e isomaltitol.

En un modo de realización, el compuesto polianiónico constituido por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto de unidades de sacárido es obtenido a partir de un compuesto constituido por una cadena principal formada por un número discreto de unidades de sacárido elegida entre el grupo constituido por maltotriosa, la maltotetraosa, la maltopentaosa, la maltohexaosa, la maltoheptaosa, la maltooctaosa e y la isomaltotriosa.

En un modo de realización, el compuesto polianiónico constituido por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto de unidades de sacárido es elegida entre el grupo constituido por carboximetilmaltotriosa, carboximetilmaltotetraosa, carboximetilmaltopentaosa, carboximetilmaltohexaosa, carboximetilmaltoheptaosa, carboximetilmaltooactosa y carboximetilisomaltotriosa.

En un modo de realización, la proporción (número de moles de grupos funcionales ácidos que posee el compuesto polianiónico / número de moles de compuesto aniónico) es superior o igual a 3.

En un modo de realización, la proporción (número de moles de grupos funcionales ácidos que tiene el compuesto polianiónico / número de moles de compuesto aniónico) es superior o igual a 4.

En un modo de realización, la proporción (número de moles de grupos funcionales ácidos que tiene el compuesto polianiónico constituido por una cadena principal de sacárido / número de moles de compuesto aniónico) es superior o igual a 5.

En un modo de realización, la proporción (número de moles de grupos funcionales ácidos que tiene el compuesto polianiónico constituido por una cadena principal de sacárido / número de moles de compuesto aniónico) es superior o igual a 8.

En un modo de realización, las proporciones molares de compuesto aniónicos sustituido/insulina están comprendidas entre 0,6 y 75.

En un modo de realización, las proporciones molares están comprendidas entre 0,7 y 50.

En un modo de realización, las proporciones molares están comprendidas entre 1,4 y 35.

En un modo de realización, las proporciones molares están comprendidas entre 1,9 y 30.

En un modo de realización, las proporciones molares están comprendidas entre 2,3 y 30.

En un modo de realización, la proporción molar de compuesto aniónicos sustituido/insulina es igual a 8.

En un modo de realización, la proporción molar de compuesto aniónicos sustituido/insulina es igual a 12.

En un modo de realización, la proporción molar de compuesto aniónicos sustituido/insulina es igual a 16.

En un modo de realización, las proporciones de masa de compuesto aniónico sustituido/insulina están comprendidas entre 0,5 y 10.

En un modo de realización, las proporciones de masa están comprendidas entre 0,6 y 7.

En un modo de realización, las proporciones de masa están comprendidas entre 1,2 y 5.

En un modo de realización, las proporciones de masa están comprendidas entre 1,6 y 4.

En un modo de realización, las proporciones de masa están comprendidas entre 2 y 4.

En un modo de realización, la proporción de masa de compuesto aniónico sustituido/insulina es 2.

En un modo de realización, la proporción de masa de compuesto aniónico sustituido/insulina es 3.

En un modo de realización, la proporción de masa de compuesto aniónico sustituido/insulina es 4.

En un modo de realización, la proporción de masa de compuesto aniónico sustituido/insulina es 6.

En un modo de realización, la concentración de compuesto aniónico sustituido está comprendida entre 1,8 y 36 mg/ml.

En un modo de realización, la concentración de compuesto aniónico sustituido está comprendida entre 1,8 y 36,5 mg/ml.

En un modo de realización, la concentración de compuesto aniónico sustituido está comprendida entre 2,1 y 25 mg/ml.

En un modo de realización, la concentración de compuesto aniónico sustituido está comprendida entre 4,2 y 18 mg/ml.

En un modo de realización, la concentración de compuesto aniónico sustituido está comprendida entre 5,6 y 15 mg/ml.

En un modo de realización, la concentración de compuesto aniónico sustituido está comprendida entre 7 y 15 mg/ml.

En un modo de realización, la concentración de compuesto aniónico sustituido es 7,3 mg/ml.

En un modo de realización, la concentración de compuesto aniónico sustituido es 10,5 mg/ml.

En un modo de realización, la concentración de compuesto aniónico sustituido es 14,6 mg/ml.

En un modo de realización, la concentración de compuesto aniónico sustituido es 21,9 mg/ml.

En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 2 y 150 mM.

En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 2 y 100 mM.

En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 2 y

75 mM.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 2 y 50 mM.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 2 y 30 mM.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 2 y 20 mM.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 2 y 10 mM.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 5 y 150 mM.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 5 y 100 mM.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 5 y 75 mM.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 5 y 50 mM.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 5 y 30 mM.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 5 y 20 mM.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 5 y 10 mM.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 0,5 y 30 mg/ml.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 0,5 y 25 mg/ml.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 0,5 y 10 mg/ml.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 0,5 y 8 mg/ml.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 1 y 30 mg/ml.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 1,5 y 25 mg/ml.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 2 y 25 mg/ml.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 2 y 10 mg/ml.
En un modo de realización, la concentración de compuesto polianiónico está comprendida entre 2 y 8 mg/ml.
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido es el maltotriosametilcarboxilato de sodio modificado con fenilalaninato de sodio, u = 3, i = 0,65, j = 1,0.
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido es el maltotriosametilcarboxilato de sodio modificado con fenilalaninato de sodio, u = 3, i = 1,0, j = 0,65.
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido es el maltotriosametilcarboxilato de sodio modificado con fenilalaninato de sodio, u = 3, i = 0,46, j = 1,2.
En un modo de realización, el compuesto aniónico sustituido es el maltotriosametilcarboxilato de sodio modificado con fenilalaninato de sodio, u = 3, i = 0,35, j = 0,65.
En un modo de realización, el compuesto polianiónico es el maltotriosametilcarboxilato de sodio.
En un modo de realización, el compuesto polianiónico es el citrato de sodio.
En un modo de realización, el compuesto polianiónico es el trifosfato en forma ácida o en forma básica en forma de sal de sodio o de sal de potasio.
En un modo de realización, el compuesto polianiónico es el tartrato, en forma ácida o en forma básica en forma de sal de sodio o de sal de potasio.
La invención igualmente se refiere a una formulación farmacéutica de insulina que comprende una composición de acuerdo con la invención en la que la insulina se encuentra en forma hexamérica.
En un modo de realización, se refiere a una formulación farmacéutica caracterizada porque la concentración de insulina está comprendida entre 240 y 3000 µM (de 40 a 500 UI/ml).
En un modo de realización, se refiere a una formulación farmacéutica caracterizada porque la concentración de insulina está comprendida entre 600 y 3000 µM (de 100 a 500 UI/ml).
En un modo de realización, se refiere a una formulación farmacéutica caracterizada porque la concentración de insulina está comprendida entre 600 y 2400 µM (de 100 a 400 UI/ml).
En un modo de realización, se refiere a una formulación farmacéutica caracterizada porque la concentración de insulina está comprendida entre 600 y 1800 µM (de 100 a 300 UI/ml).
En un modo de realización, se refiere a una formulación farmacéutica caracterizada porque la concentración de insulina está comprendida entre 600 y 1200 µM (de 100 a 200 UI/ml).

En un modo de realización, se refiere a una formulación farmacéutica caracterizada porque la concentración de insulina es 600 µM (100 UI/ml).
En un modo de realización, se refiere a una formulación farmacéutica caracterizada porque la concentración de insulina es 1200 µM (200 UI/ml).
En un modo de realización, se refiere a una formulación farmacéutica caracterizada porque la concentración de insulina es 1800 µM (300 UI/ml).
En un modo de realización, se refiere a una formulación farmacéutica caracterizada porque la concentración de insulina es 2400 µM (400 UI/ml).
En un modo de realización, se refiere a una formulación farmacéutica caracterizada porque la concentración de insulina es 3000 µM (500 UI/ml).
La invención se refiere a la utilización de al menos un compuesto aniónico sustituido, estando dicho compuesto constituido por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto o comprendido entre 1 y 8 ($1 \leq u \leq 8$) de unidades de sacárido idénticas o diferentes, unidas por unos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes, siendo dichas unidades de sacárido elegidas entre el grupo constituido por las hexosas, en forma cíclica o en forma reducida abierta, comprendiendo dicho compuesto grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables para preparar una formulación farmacéutica de insulina humana, en combinación con un compuesto polianiónico, que permite, después de su administración, acelerar el paso de la insulina en la sangre y reducir más rápidamente la glucemia con respecto a una formulación exenta de compuesto aniónico sustituido, y eventualmente de compuestos aniónicos.
En un modo de realización, la invención se refiere a la utilización de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, para preparar una formulación farmacéutica de insulina humana, en combinación con un compuesto polianiónico, que permite, después de su administración, acelerar el paso de la insulina en la sangre y reducir más rápidamente la glucemia con respecto a una formulación exenta de compuesto aniónico sustituido, y opcionalmente de compuestos aniónicos.
En un modo de realización, la invención se refiere a la utilización de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, para preparar una formulación de insulina análoga, en combinación con un compuesto polianiónico, que permite, después de su administración, acelerar el paso del análogo de insulina en la sangre y reducir más rápidamente la glucemia con respecto a una formulación exenta de compuesto aniónico sustituido, y opcionalmente de compuestos aniónicos.
La utilización de al menos un compuesto aniónico funcionalizado constituido por una cadena principal formada por un número discreto u comprendido entre 1 y 3 ($1 \leq u \leq 3$) de unidades de sacárido idénticas o diferentes, unidas por enlaces glucosídicos idénticos o diferentes, siendo dichas unidades de sacárido elegidas entre el grupo constituido por, las hexosas, en forma cíclica o en forma reducida abierta, comprendiendo dicho compuesto grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables para preparar una formulación farmacéutica de insulina que permite, después de su administración, acelerar el paso de la insulina en la sangre y reducir más rápidamente la glucemia con respecto a una formulación exenta de compuesto aniónico sustituido en asociación con al menos dicho compuesto polianiónico siendo un compuesto polianiónico no polimérico (PNP) en el que la afinidad hacia el cinc es inferior a la afinidad hacia el cinc de la insulina y en el que la constante de disociación KdCa =[compuesto PNP]^{r} [Ca^{2} +]^{s}/[(compuesto PNP)$_{r}$-(Ca^{2} +)s] es inferior o igual a $10^{-1,5}$. 25
En un modo de realización, la utilización se caracteriza por que el compuesto aniónico funcionalizado está en mezcla con un compuesto polianiónico.
En un modo de realización, la insulina es insulina humana.
Por insulina humana se hace referencia a una insulina obtenida mediante síntesis o recombinación en la que la secuencia peptídica es la secuencia de la insulina humana, incluyendo las variaciones alélicas y los homólogos.
En un modo de realización, la insulina es una insulina humana recombinante tal como se describe en la Farmacopea europea y en la Farmacopea americana.
En un modo de realización, la insulina es un análogo de insulina.
Por análogo de insulina se hace referencia a una insulina recombinante en la que la secuencia primaria contiene al menos una modificación con respecto a la secuencia primaria de la insulina humana.
En un modo de realización el análogo de insulina es elegida entre el grupo constituido por la insulina lispro (Humalog®), la insulina Aspart (Novolog®, Novorapid®) y la insulina glulisina (Apidra®).
En un modo de realización, el análogo de insulina es la insulina lispro (Humalog®).
En un modo de realización, el análogo de insulina es la insulina Aspart (Novolog®, Novorapid®).
En un modo de realización, el análogo de insulina es la insulina glulisina (Apidra®).
En un modo de realización, la utilización se caracteriza porque el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre los compuestos aniónicos sustituidos en estado aislado o en mezcla, constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u comprendido entre 1 y 8 ($1 \leq u \leq 8$) de unidades de sacárido idénticas o diferentes, unidas por enlaces glucosídicos idénticos o

diferentes, siendo dichas unidades de sacárido elegidas entre las hexosas, en forma cíclica o en forma reducida abierta, caracterizadas por que están sustituidas con:

a) al menos un sustituyente de fórmula general I:

$$-[R_1]_a-[AA]_m \qquad \text{Fórmula I}$$

- los sustituyentes siendo idénticos o diferentes cuando hay al menos dos sustituyentes, en el que;
- el radical -[AA] designa un resto de aminoácido,
- el radical $-R_1-$ siendo:
  - o bien un enlace y entonces a = 0, y el resto de aminoácido -[AA]- se une directamente a la cadena principal mediante un grupo funcional G.
  - o bien una cadena de carbono y entonces a = 1, de C2 a C15 eventualmente sustituida y/o que comprende al menos un heteroátomo elegido entre O, N y S y al menos un grupo funcional ácido antes de la reacción con el aminoácido, formando dicha cadena con el resto de aminoácido -[AA]- un grupo funcional amida, y es fijada sobre la cadena principal con la ayuda de un grupo funcional F que resulta de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional o un sustituyente llevado por el precursor del radical $-R_1-$
- F es un grupo funcional elegido entre los grupos funcionales éter, éster o carbamato,
- G es un grupo funcional carbamato,
- m es igual a 1 ó 2,
- el grado de sustitución de las unidades de sacárido, j, en $-[R_1]_a-[AA]_m$ –siendo estrictamente superior a 0 e inferior o igual a la 6, $0 < j \leq 6$

b) y, eventualmente, uno o varios sustituyentes $-R'_1$,

- el sustituyente $-R'_1$ siendo una cadena de carbono de C2 a C15, eventualmente sustituida y/o que comprende al menos un heteroátomo elegido entre O, N y S y al menos un grupo funcional ácido en forma de sal de cationes alcalinos estando dicha cadena unida a la cadena principal mediante un grupo funcional F' que resulta de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional o un sustituyente llevado por el precursor del sustituyente $-R'_1$,
- F' es un grupo funcional éter, éster, o carbamato,
- el grado de sustitución de las unidades de sacárido, I, en $-R'_1$ estando comprendido entre 0 y 6-j, $0 \leq i \leq 6-j$ y,
- F y F' son idénticos o diferentes,
- F y G son idénticos o diferentes,
- $i + j \leq 6$.
- $-R'_1$ idéntico o diferente a $-R_1-$
- Los grupos funcionales ácidos salificables libres llevados por el sustituyente $-R'_1$ se encuentran en forma de sales de cationes alcalinos,
- dichos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes siendo elegidos entre el grupo constituido por los enlaces glucosídicos de tipo (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) ó (1,6), en una geometría alfa o beta,

En un modo de realización, la utilización se caracteriza porque el compuesto aniónico sustituido, en estado aislado o en mezcla, es elegido entre les compuestos aniónicos sustituidos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto o comprendido entre 1 y 8 ($1 \leq u \leq 8$) de unidades de sacárido idénticas o diferentes, unidas por unos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes, siendo dichas unidades de sacárido elegidas entre las hexosas, en forma cíclica o en forma reducida abierta, caracterizadas:

a) porque son sustituyentes de forma estadística con:

- al menos un sustituyente de fórmula general I:

$$-[R_1]_a-[AA]_m \qquad \text{Fórmula I}$$

- los sustituyentes siendo idénticos o diferentes cuando hay al menos dos sustituyentes, en el cual:
- el radical -[AA]- designa un resto de aminoácido, siendo dicho aminoácido elegido entre el grupo constituido por fenilalanina, alfa-metil-fenilalanina, 3,4 dihidroxifenilalanina, tirosina, alfa-metil-tirosina, O-metil-tirosina, alfa-fenilglicina, 4-hidroxifenilglicina, 3,5-dihidroxifenilglicina y sus sales de cationes alcalinos, teniendo dichos derivados una configuración absoluta L o D, -[AA]- es fijado sobre la cadena principal de la molécula por medio de una ramificación de enlace $-R_1-$ o se une directamente a la cadena principal mediante un grupo funcional G,
- R_1- siendo:
  - o bien un enlace G, y entonces a = 0,
  - o bien una cadena de carbono, y entonces a = 1, de C2 a C15 eventualmente sustituida y/o que comprende al menos un heteroátomo elegido entre O, N y S y que lleva al menos un grupo funcional ácido antes de la reacción con el aminoácido, formando dicha cadena con el resto de aminoácido -[AA]- un enlace amida, y es fijado sobre la cadena principal de sacárido con la ayuda de un grupo funcional F

que resulta de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional llevado por el precursor de R_1,

- F es un grupo funcional éter, éster o carbamato,
- G es un grupo funcional carbamato,
- m es igual a 1 ó 2,
- el grado de sustitución, j, en $-[R_1]_a-[AA]_m$ siendo estrictamente superior a 0 e inferior o igual a 6, $0 < j \leq 6$,

y, eventualmente, ➢

uno o varios sustituyentes $-R'_1$

- $-R'_1$ siendo una cadena de carbono de C2 a C15, eventualmente sustituida y/o que comprende al menos un heteroátomo (tal como O, N y S) y que lleva al menos un grupo funcional ácido en forma de sal de cationes alcalinos, estando dicha cadena fijada sobre la cadena principal de sacárido mediante un grupo funcional F' que resulta de una reacción entre un cupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional llevado por el precursor de $-R'_1$
- F' es un grupo funcional éter, éster o carbamato,
- estando comprendido el grado de sustitución i, en $-R'_1$, entre 0 y 6-j, $0 \leq i \leq 6-j$, y,
- $-R'_1-$ idéntico o diferente a $-R_1$,
- F y F' idénticos o diferentes,
- F' y G idénticos o diferentes
- Los grupos funcionales ácidos salificables libres se encuentran en forma de sales de cationes alcalinos,

b) siendo dichos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes elegidos entre el grupo constituido por los enlaces glucosídicos de tipo (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) ó (1,6), en una geometría alfa o beta,

c) $i + j \leq 6$.

En un modo de realización, m es igual a 1.

En un modo de realización, -R1 y -R'1, idénticos o diferentes son una cadena de carbono de C1 a C8.

En un modo de realización, -R1 y -R'1, idénticos o diferentes son una cadena de carbono de C1 a C4.

En un modo de realización, -R1 y -R'1, idénticos o diferentes son una cadena de carbono de C1 a C2.

El experto en la materia sabe que el periodo de acción de las insulinas depende de la concentración de la insulina. Sólo se documentan los valores del periodo de acción de las formulaciones a 100 UI/ml.

Las formulaciones de insulina humana « regular » en el mercado con una concentración de 600 µM (100 UI/ml) tienen un periodo de acción comprendido entre 50 y 90 minutos y un final de la acción de aproximadamente 360 a 420 minutos en el ser humano. El periodo de tiempo para alcanzar la concentración máxima de insulina en la sangre está comprendido entre 90 y 180 minutos en el ser humano.

Las formulaciones de análogos de insulina rápidas en el mercado con una concentración de 600 µM (100 UI/ml) tienen un periodo de acción comprendido entre 30 y 60 minutos y un final de la acción de aproximadamente 240-300 minutos en el ser humano. El periodo de tiempo para alcanzar la concentración máxima de insulina en la sangre está comprendido entre 50 y 90 minutos en el ser humano.

La invención también se refiere a un método de preparación de una formulación de insulina humana que posee una concentración de insulina comprendida entre 240 y 3000 µM (40 y 500 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior al de la formulación de referencia con la misma concentración de insulina en ausencia de compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.

En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.

La invención también se refiere a un método de preparación de una formulación de insulina humana que presenta una concentración de insulina comprendida entre 600 y 1200 µM (100 y 200 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior al de la formulación de referencia con la misma concentración de insulina en ausencia de compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.

En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.

La invención se refiere igualmente a un método de preparación de una formulación de insulina humana que presenta una concentración de insulina de 600 µM (100 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior a 60 minutos caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.

En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.

La invención también se refiere a un método de preparación de una formulación de insulina humana que tiene una concentración de insulina de 1200 µM (200 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior en al menos un 10 % con respecto a la de la formulación de la insulina humana a la misma concentración (200 UI/ml) y en ausencia de compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.
En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.
La invención se refiere igualmente a un método de preparación de una formulación de insulina humana que presenta una concentración de insulina de 1800 µM (300 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior en al menos un 10 % con respecto a la de la formulación de la insulina humana a la misma concentración (300 UI/ml) y en ausencia de compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.
En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.
La invención se refiere también a un método de preparación de una formulación de insulina humana que posee una concentración de insulina de 2400 µM (400 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior en al menos un 10 % con respecto a la de la formulación de la insulina humana a la misma concentración (400 UI/ml) y en ausencia de compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, los grupos funcionales carboxilos no sustituidos siendo salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.
En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.
La invención también se refiere a un método de preparación de una formulación de insulina humana que presenta una concentración de insulina de 3000 µM (500 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior en al menos un 10 % con respecto a la de la formulación de la insulina humana a la misma concentración (500 UI/ml) y en ausencia de compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.
En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.
La invención consiste en la preparación de una formulación de insulina humana denominada rápida caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.
En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.
La invención se refiere igualmente a un método de preparación de una formulación de insulina humana a una concentración de 600 µM (100 UI/ml) en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior a 60 minutos, de preferencia a inferior a 45 minutos, e incluso de preferencia a inferior a 30 minutos caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.
En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.
La invención también se refiere a un método de preparación de una formulación de análogo de insulina que tiene una concentración de insulina comprendida entre 240 y 3000 µM (40 y 500 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior al de la formulación de referencia con la misma concentración de insulina en ausencia de compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.
En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.
La invención se refiere también a un método de preparación de una formulación de análogo de insulina que tiene una concentración de insulina comprendida entre 600 y 1200 µM (100 y 200 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior al de la formulación de referencia a la misma concentración de análogo de insulina en ausencia de compuesto aniónico sustituido compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico, caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales

carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.

En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.

La invención se refiere igualmente a un método de preparación de una formulación de análogo de insulina que tiene una concentración de insulina de 600 µmol/l (100 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior a 30 minutos, caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.

En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.

La invención también se refiere a un método de preparación de una formulación de análogo de insulina que posee una concentración de insulina de 1200 µM (200 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior en al menos un 10 % al de la formación del análogo de insulina en ausencia de compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.

En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.

La invención también se refiere a un método de preparación de una formulación de análogo de insulina que presenta una concentración de insulina de 1800 µM (300 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior en al menos un 10 % al de la formulación de análogo de insulina en ausencia de compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.

En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.

La invención se refiere también a un método de preparación de una formulación de análogo de insulina que posee una concentración de insulina de 2400 µM (400 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior en al menos un 10 % al de la formulación de análogo de insulina en ausencia de compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.

En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.

La invención también se refiere a un método de preparación de una formulación de análogo de insulina que tiene una concentración de insulina de 3000 µM (500 UI/ml), en la que el plazo de acción en el ser humano es inferior en al menos un 10 % al de la formulación de análogo de insulina en ausencia de compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico caracterizada porque comprende (1) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos siendo salificables, y (2) una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.

En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.

La invención consiste en la preparación de una formulación de análogo de insulina denominada muy rápida caracterizada porque comprende una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto aniónico sustituido, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables.

En un modo de realización, la preparación comprende además una etapa de adición a dicha formulación de al menos un compuesto polianiónico.

En un modo de realización, la insulina se encuentra en forma hexamérica.

En un modo de realización el análogo de insulina es elegida entre el grupo constituido por la insulina lispro (Humalog®), la insulina Aspart (Novolog®, Novorapid®) y la insulina glulisina (Apidra®).

En un modo de realización, el análogo de insulina es la insulina lispro (Humalog®).

En un modo de realización, el análogo de insulina es la insulina Aspart (Novolog®, Novorapid®).

En un modo de realización, el análogo de insulina es la insulina glulisina (Apidra®).

En un modo de realización, la insulina es una insulina humana recombinante tal como se describe en la Farmacopea europea y en la Farmacopea americana.

En un modo de realización, la insulina es un análogo de insulina elegido entre el grupo constituido por la insulina lispro (Humalog®), la insulina Aspart (Novolog®, Novorapid®) y la insulina glulisina (Apidra®).

La composición puede ser realizada mediante una simple mezcla de una solución acuosa de insulina humana o análogo y de una solución acuosa de compuesto aniónico sustituido en mezcla con un compuesto polianiónico.

En un modo de realización, la composición puede ser realizada mediante una simple mezcla de una solución acuosa de insulina humana o análogo, de una solución acuosa de compuesto aniónico sustituido y de compuesto polianiónico en solución o en forma de liofilizado.
En un modo de realización, la composición se puede realizar mediante una simple mezcla de una solución acuosa de insulina humana o análogo, de compuesto aniónico sustituido en forma de liofilizado y de compuesto polianiónico en solución o en forma de liofilizado.
De preferencia esta composición se encuentra en forma de una solución inyectable.
En un modo de realización, la concentración de insulina humana o análogo está comprendida entre 240 y 3000 µM (de 40 a 500 UI/ml).
En un modo de realización, la concentración de insulina humana o análogo está comprendida entre 600 y 3000 µM (de 100 a 500 UI/ml).
En un modo de realización, la concentración de insulina humana o análogo está comprendida entre 600 y 2400 µM (de 100 a 400 UI/ml).
En un modo de realización, la concentración de insulina humana o análogo está comprendida entre 600 y 1800 µM (de 100 a 300 UI/ml).
En un modo de realización, la concentración de insulina humana o análogo está comprendida entre 600 y 1200 µM (de 100 a 200 UI/ml).
En un modo de realización, la concentración de insulina humana o análogo es 600 µM (100 UI/ml).
En un modo de realización, la concentración de insulina humana o análogo es 1200 µM (200 UI/ml).
En un modo de realización, la concentración de insulina humana o análogo de 600 µM (100 UI/ml) se puede reducir mediante simple dilución, en particular para las aplicaciones pediátricas.
En un modo de realización, la concentración de insulina humana o análogo es 1800 µM (300 UI/ml).
En un modo de realización, la concentración de insulina humana o análogo es 2400 µM (400 UI/ml).
En un modo de realización, la concentración de insulina humana o análogo es 3000 µM (500 UI/ml).
La invención también se refiere a una formulación farmacéutica de acuerdo con la invención, caracterizada porque es obtenida por secado y/o liofilización.
En un modo de realización, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden además la adición de sales de cinc a una concentración comprendida entre 0 y 500 µM.
En un modo de realización, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden además la adición de sales de cinc a una concentración comprendida entre 0 y 300 µM.
En un modo de realización, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden además la adición de sales de cinc a una concentración comprendida entre 0 y 200 µM.
En un modo de realización, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden unos tampones a concentraciones comprendidas entre 0 y 100 mM, de preferencia entre 0 y 50 mM o entre 15 y 50 mM.
En un modo de realización el tampón es Tris.
En un modo de realización, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden además unos conservantes.
En un modo de realización, los conservantes se eligen entre el grupo constituido por m-cresol y fenol solos o en mezcla.
En un modo de realización, la concentración de los conservantes está comprendida entre 10 y 50 mM.
En un modo de realización, la concentración de los conservantes está comprendida entre 10 y 40 mM.
Las composiciones de acuerdo con la invención pueden comprender además unos aditivos tales como agentes de tonicidad tales como la glicerina, el cloruro de sodio (NaCl), el manitol y la glicina.
Las composiciones de acuerdo con la invención pueden comprender además unos aditivos de acuerdo con las farmacopeas como unos tensioactivos por ejemplo polisorbato.
Las composiciones de acuerdo con la invención pueden comprender además todos los excipientes de acuerdo con las farmacopeas y que son compatibles con las insulinas utilizadas en las concentraciones de uso.
En el caso de las liberaciones local y sistémica, los modos de administración previstos son por vía intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular.
También se prevén las vías de administración transdérmica, oral, nasal, vaginal, ocular, bucal, pulmonar.
La invención se refiere igualmente a la utilización de una composición de acuerdo con la invención para la formulación de una solución de insulina humana o análogo de concentración de 100 UI/ml destinada a las bombas de insulina implantables o transportables.
La invención también se refiere a la utilización de una composición de acuerdo con la invención para la formulación de una solución de insulina humana o análogo de concentración de 200 UI/ml destinada a las bombas de insulina implantables o transportables.
La invención también se refiere a los compuestos aniónicos sustituidos, en estado aislado o en mezcla, elegidos entre los compuestos aniónicos sustituidos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto u comprendido entre 1 y 8 ($1 \leq u \leq 8$) de unidades de sacárido idénticas o diferentes, unidas por unos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes, siendo dichas unidades de sacárido elegidas entre las hexosas, en forma cíclica o en forma reducida abierta, caracterizadas porque se sustituyen con:

a) al menos un sustituyente de fórmula general I:

$$-[R_1]_a-[AA]_m \qquad \text{Fórmula I}$$

- los sustituyentes siendo idénticos o diferentes cuando hay al menos dos sustituyentes, en la cual:
  - el radical -[AA] designa un resto de aminoácido,
  - el radical-R_1- siendo:
    - o bien un enlace y entonces a = 0, y el resto de aminoácido -[AA]- se une directamente a la cadena principal mediante un grupo funcional G.
    - o bien una cadena de carbono y entonces a = 1, de C2 a C15 opcionalmente sustituida y/o que comprende al menos un heteroátomo elegido entre O, N y S y al menos un grupo funcional ácido antes de la reacción con el aminoácido, dicha cadena formando con el resto de aminoácido -[AA]- un grupo funcional amida, y se fija sobre la cadena principal con la ayuda de un grupo funcional F que resulta de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional o sustituyente llevado por el precursor del radical -R_1-,
- F es un grupo funcional elegido entre los grupos funcionales éter, éster o carbamato,
- G es un grupo funcional carbamato,
- m es igual a 1 ó 2,
- el grado de sustitución de las unidades de sacárido, j, en -$[R_1]_a$-$[AA]_m$, -
  siendo estrictamente superior a 0 e inferior o igual a 6, $0 < j \leq 6$

b) y, eventualmente, uno o varios sustituyentes -R'_1,

- siendo el sustituyente -R'_1 una cadena de carbono de C2 a C15, eventualmente sustituida y/o que comprende al menos un heteroátomo elegido entre O, N y S y al menos un grupo funcional ácido en forma de sal de cationes alcalinos estando dicha cadena unida a la cadena principal mediante un grupo funcional F' que resulta de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional o un sustituyente llevado por el precursor del sustituyente -R'_1,
- F' es un grupo funcional éter, éster o carbamato,
- el grado de sustitución de las unidades de sacárido, i, en -R'_1, estando comprendidos entre 0 y 6-j, $0 \leq i \leq 6-j$ y,
- F y F' son idénticos o diferentes,
- F y G son idénticos o diferentes,
- $l + j \leq 6$.
- -R'_1 idéntico o diferente a -R'_1-,
- Los grupos funcionales ácidos salificables libres llevados por el sustituyente -R'_1 se encuentran en forma de sales de cationes alcalinos,
- siendo dichos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes elegidos entre el grupo constituido por los enlaces glucosídicos de tipo (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) o (1,6), en una geometría alfa o beta.

En la fórmula que sigue a continuación las diferentes variables tienen los valores que se han mencionado anteriormente.

Los compuestos aniónicos sustituidos de acuerdo con la invención pueden ser obtenidos mediante injerto estadístico de los sustituyentes en la cadena principal de sacárido.

En un modo de realización, los compuestos aniónicos sustituidos elegidos entre los compuestos aniónicos sustituidos con sustituyentes de fórmulas I o II se caracteriza porque se pueden obtener mediante injerto de los sustituyentes en posiciones precisas en las unidades de sacárido mediante un método que lleva a cabo unas etapas de protección/desprotección de los grupos alcohol o ácido carboxílico llevados de forma natural por la cadena principal. Esta estrategia conduce a un injerto selectivo, en particular regloselectivo, de los sustituyentes en la cadena principal. Los grupos protectores incluyen, pero no se limitan a, los que se describen en la obra (Wuts, PGM et ál., Greene's Protective Groups in Organic Synthesls 2007).

La cadena principal de sacárido puede ser obtenida por degradación de un polisacárido de alto peso molecular. Las vías de degradación incluyen, pero no se limitan a, la degradación química y/o la degradación enzimática.

La cadena principal de sacárido también se puede obtener mediante formación de enlaces glucosídicos entre dos moléculas de monosacáridos u oligosacáridos utilizando una estrategia de acoplamiento químico o enzimático. Las estrategias de acoplamiento incluyen las que se describen en la publicación (Smoot, JT et ál., Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 2009, 62,162-250) y en la obra (Lindhorst, TK, Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 2007, 157-208). Las reacciones de acoplamiento se pueden realizar en solución o sobre soporte sólido. Las moléculas de sacáridos, antes de su acoplamiento, pueden llevar sustituyentes de interés y/o se pueden funcionalizar una vez acopladas entre ellas de forma estadística o regioselectiva.

Por lo tanto, a título de ejemplos, los compuestos de acuerdo con la invención se pueden obtener de acuerdo con uno de los métodos que siguen a continuación:

- el injerto estadístico de los sustituyentes sobre una cadena principal de sacárido
- una o varias etapas de glicosilación entre moléculas de monosacáridos u oligosacáridos que llevan sustituyentes
- una o varias etapas de glicosilación entre una o varias moléculas de monosacáridos u oligosacáridos que llevan unos sustituyentes y una o varias moléculas de monosacáridos u

oligosacáridos

- una o varias etapas de introducción de grupos protectores sobre alcoholes o ácidos llevados de forma natural por la cadena principal de sacárido seguido por una o varias reacciones de injerto de los sustituyentes y por último una etapa de eliminación de los grupos protectores
- una o varias etapas de glicosilación entre una o varias moléculas de monosacáridos u oligosacáridos que llevan grupos protectores sobre alcoholes o ácidos llevados de forma natural por la cadena principal de sacárido, una o varias etapas de injerto de sustituyentes sobre la cadena principal obtenida después de una etapa de eliminación de los grupos protectores
- una o varias etapas de glicosilación entre una o varias moléculas de monosacáridos u oligosacáridos que llevan grupos protectores sobre alcoholes o ácidos llevados de forma natural por la cadena principal de sacárido, y una o varias moléculas de monosacáridos u oligosacáridos, una o varias etapas de injerto de sustituyentes y a continuación una etapa de eliminación de los grupos protectores.

Los compuestos de acuerdo con la invención, aislados o en mezcla, se pueden separar y/o purificar de diferentes maneras, en particular después de su obtención con los métodos que se han descrito anteriormente.

En particular se pueden mencionar los métodos cromatográficos, en particular los denominados « preparativos » o « de preparación » tales como:

- las cromatografías ultrarrápidas o « flash chromatography », en particular sobre sílice, y
- las cromatografías de tipo HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) (Chromatographie liquide haute performance), en particular RP-HPLC o « HPLC en fase inversa » (Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa).

También se pueden utilizar métodos de precipitación selectiva.

La invención se ilustra con los ejemplos que siguen a continuación.

Ejemplos

Las estructuras de los compuestos aniónicos sustituidos de acuerdo con la invención son presentadas en la Tabla 1. Las estructuras de los polisacáridos a modo de contra-ejemplos se presentan en la Tabla 2.

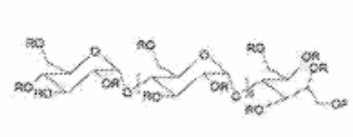
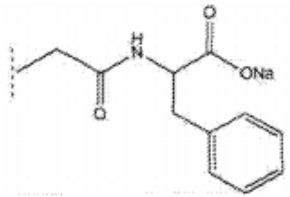
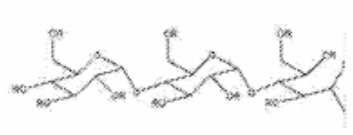
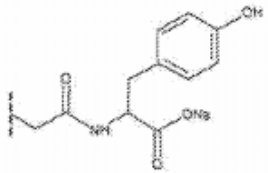
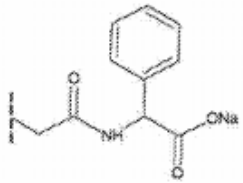
AA Compuestos aniónicos sustituidos

R = H, R'_1, $-[R_1]_a-[AA]_m$,

Tabla 1

Compuesto	i	j	Encadenamiento de sacáridos	Sustituyente $-R'_1$	Sustituyente $-[R_1]_a-[AA]_m$
1	0,65	1,0			
2	1,0	0,65			
3	0,46	1,2			
4	0,35	0,65			

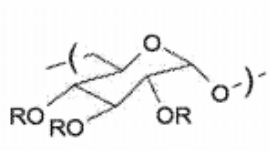
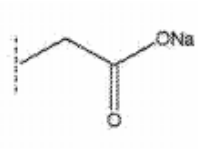
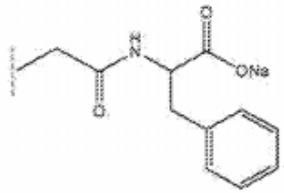
Compuesto	i	j	Encadenamiento de sacáridos	Sustituyente $-R'_1$	Sustituyente $-[R_1]_a-[AA]_m$
5	1,25	0,4			
6	0,8	0,65			
7	2,65	0,65			
8	1,0	0,75			

Compuesto	i	j	Encadenamiento de sacáridos	Sustituyente $-R'_1$	Sustituyente $-[R_1]_a-[AA]_m$
9	1,0	0,65			
10	0,83	0,81			
11	1,12	0,52			

AB Polisacáridos a modo de contra-ejemplos

Tabla 2

olisacáridos a modo le contra-ejemplos	i	j	Encadenamiento de sacáridos	Masa molar media en peso (kg/mol)	Sustituyente -R'$_1$	Sustituyente- $[R_1]_a$-$[AA]_m$
Polisacáridos a modo de contra-ejemplos AB1, AB2, AB3, AB4 y AB5: R = H, R'$_1$, -$[R_1]_a$-$[AA]_m$						
AB1	0,6	0,46		10		
AB2	1,01	0,64		5		
AB3	0,65	0,45		5		
AB4	1,01	0,64		10		

Polisacáridos a modo de contra-ejemplos	i	j	Encadenamiento de sacáridos	Masa molar media en peso (kg/mol)	Sustituyente $-R'_1$	Sustituyente- $[R_1]_a$-$[AA]_m$
Polisacáridos a modo de contra-ejemplos AB1, AB2, AB3, AB4 y AB5: R = H, R'_1, -$[R_1]_a$-$[AA]_m$						
AB5	0,45	0,65		5		

AA1. Compuesto 1: Maltotriosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio

A 8 g (143 mmol de grupos funcionales hidroxilo) de maltotriosa (CarboSynth) disueltos en agua a 65 ºC se añaden 0,6 g (16 mmol) de borohidruro sódico. Después de 30 min de agitación, se añaden 28 g (238 mmol) de cloroacetato sódico. A esta solución a continuación se le añaden, gota a gota, 24 ml de NaOH 10 N (24 mmol) y a continuación la mezcla es calentada a 65 ºC durante 90 minutos. A continuación se añaden 16,6 g (143 mmol) de cloroacetato sódico al medio de reacción así como 14 ml de NaOH 10 N (14 mmol) gota a gota. Después de 1 h de calentamiento, la mezcla es diluida con agua, es neutralizada con ácido acético a continuación es purificada mediante ultrafiltración sobre membrana de PES de 1 kDa con respecto a agua. La concentración de moléculas de la solución final es determinada mediante extracto seco, a continuación se realiza una dosificación de ácido/base en una mezcla de agua/acetona a 50/50 (V/V) para determinar el grado de sustitución de metilcarboxilato.
Basándose en el extracto seco: [compuesto] = 32,9 mg/g
Basándose en la dosificación de ácido/base, el grado de sustitución de metilcarboxilato es de 1,65 por unidad de sacárido.
La solución de maltotriosametilcarboxilato de sodio es acidificada sobre una resina Purolite (aniónica) para obtener el ácido maltotriosametilcarboxílico que a continuación se liofiliza durante 18 horas.
Se solubilizan 10 g de ácido maltotriosametilcarboxílico (63 mmol de grupos funcionales ácido metilcarboxílico) en DMF y a continuación se enfría a 0 ºC. Se prepara una mezcla de fenilalaninato de etilo, sal de hidrocarburos (8,7 g, 38 mmol) en DMF. A esta mezcla se añaden 3,8 g de trietilamina (38 mmol). A continuación se añade una solución de NMM (6,3 g, 63 mmol) y de EtOCOCl (6,8 g, 63 mmol) a la mezcla a 0 ºC. A continuación es añadida la solución de fenilalaninato de etilo y la mezcla se agita a 10 ºC. Una solución acuosa de imidazol es añadida a continuación a la mezcla calentada a 30 ºC. El medio se diluye con agua y a continuación la solución obtenida es purificada mediante ultrafiltración sobre membrana de PES de 1 kDa con respecto a NaOH 0,1 N, NaCl al 0,9 % y agua. La concentración de moléculas de la solución final es determinada mediante extracto seco. Una muestra de solución es liofilizada y analizada por RMN ^{1}H en D_2O para determinar el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados con el L-fenilalaninato de sodio.
Basándose en el extracto seco: [compuesto 1] = 29,4 mg/g
Basándose en la dosificación de ácido/base, el grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 0,65.
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados con el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 1,0.

AA2. Compuesto 2: Maltotriosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio

Con un método similar al que se ha utilizado para la preparación del compuesto 1, es obtenido un maltotriosacarboxilato de sodio funcionalizado con L-fenilalaninato de sodio. Basándose en la dosificación de ácido/base, el grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 1,0.
Basándose en el extracto seco: [compuesto 2] = 20,2 mg/g
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados por el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 0,65.

AA3. Compuesto 3: Maltotriosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio

Con un método similar al que se ha utilizado para la preparación del compuesto 1, un maltotriosacarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio es obtenido. Basándose en la dosificación de ácido/base, el grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 0,46.
Basándose en el extracto seco: [compuesto 3] = 7,2 mg/g
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados por el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 1,2.

AA4. Compuesto 4: Maltotriosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio

Con un método similar al que se ha utilizado para la preparación del compuesto 1, es obtenido un maltotriosacarboxilato de sodio funcionalizado con L-fenilalaninato de sodio. Basándose en la dosificación de ácido/base, el grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 0,35.
Basándose en el extracto seco: [compuesto 4] = 3,1 mg/g

[000388] Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados por el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 0,65.

AA5. Compuesto 5: **Maltotriosametilcarboxilato de sodio funcionalizado con L-fenilalaninato de sodio**

Con un método similar al que se ha utilizado para la preparación del compuesto 1, es obtenido un maltotriosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio.
Basándose en el extracto seco: [compuesto 5] = 10,9 mg/g
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados con el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 0,40.
El grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 1,25.

AA6. Compuesto 6: **Maltotriosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio**

A 8 g (143 mmol de grupos funcionales hidroxilo) de maltotriosa (CarboSynth) disueltos en agua a 65 ºC se añaden 0,6 g (16 mmol) de borohidruro sódico. Después de 30 min de agitación, se añaden 28 g (237 mmol) de cloroacetato sódico. A esta solución a continuación se le añaden, gota a gota, 24 ml de NaOH 10 N (240 mmol). Después de calentamiento a 65 ºC durante 90 min, la mezcla es diluida con agua, neutralizada con ácido acético y a continuación es purificada mediante ultrafiltración sobre membrana de PES de 1 kDa con respecto a agua. La concentración de compuesto de la solución final es determinada mediante extracto seco, a continuación se realiza una dosificación de ácido/base en una mezcla de agua/acetona a 50/50 (V/V) para determinar el grado de sustitución de metilcarboxilato de sodio.
Basándose en el extracto seco: [compuesto] = 14,5 mg/g
Basándose en la dosificación de ácido/base, el grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 1,45.
La solución de maltotriosametilcarboxilato de sodio se acidifica sobre una resina Purolite (aniónica) para obtener el ácido maltotriosametilcarboxílico que a continuación se liofiliza durante 18 horas.
Con un método similar al que se ha utilizado para la preparación del compuesto 1, es obtenido un maltotriosametilcarboxilato de sodio funcionalizado con L-fenilalaninato de sodio.
Basándose en el extracto seco: [compuesto 6] = 10,8 mg/g
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados con el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 0,65.
El grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 0,8.

AA7. Compuesto 7: **Maltotriosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio**

Con un método similar al que se ha descrito en la preparación del compuesto 1, se sintetizan y se liofilizan 8 g de maltotriosametilcarboxilato de sodio caracterizado por un grado de sustitución en metilcarboxilato de sodio de 1,76.
Se disuelven 8 g (58 mmol de grupos funcionales hidroxilo) del liofilizado y 15 g (129 mmol) de cloroacetato sódico en agua a 65 ºC. A esta solución se le añaden, gota a gota, 13 ml de NaOH 10 N (130 mmol) y a continuación la mezcla se calienta a 65 ºC durante 90 minutos. A continuación se añaden 9 g (78 mmol) de cloroacetato sódico al medio de reacción así como 8 ml de NaOH 10 N (80 mmol) gota a gota. Después de 1 h de calentamiento, la mezcla se diluye con agua, se neutraliza con ácido acético y a continuación se purifica mediante ultrafiltración sobre membrana de PES de 1 kDa con respecto a agua. La concentración de compuesto de la solución final es determinada mediante extracto seco, y a continuación se realiza una dosificación de ácido/base en una mezcla de agua/acetona a 50 / 50 (VA/) para determinar el grado de sustitución en metilcarboxilatos de sodio.
Basándose en el extracto seco: [compuesto] = 11,7 mg/g
Basándose en la dosificación de ácido/base, el grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 3,30.
La solución de maltotriosametilcarboxilato de sodio se acidifica sobre una resina Purolite (aniónica) para obtener el ácido maltotriosametilcarboxílico que a continuación se liofiliza durante 18 horas.
Con un método similar al que se ha descrito en la preparación del Compuesto 1, se obtiene un maltotriosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio.
Basándose en el extracto seco: [compuesto 7] = 14,9 mg/g
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados con el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 0,65.
El grado de sustitución en metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 2,65.

AA8. Compuesto 8 Maltopentaosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio

Con un método similar al que se ha descrito en la preparación del compuesto 1 pero realizado con maltopentaosa (CarboSynth), se obtienen 10 g de ácido maltopentaosametilcarboxílico de grado de

sustitución en ácido metilcarboxílico de 1,75 por unidad de sacárido y a continuación se liofiliza.
Con un método similar al que se ha utilizado para la preparación del compuesto 1, se obtiene un maltopentaosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio.
Basándose en el extracto seco: [compuesto 8] = 7,1 mg/g
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados por el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 0,75.
El grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 1,0.

AA9. Compuesto 9: Maltooctaosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio

Con un método similar al que se ha descrito en la preparación del compuesto 1 pero realizado con maltooctaosa (CarboSynth), se obtienen 10 g de ácido maltooctaosametilcarboxílico de grado de sustitución en ácido metilcarboxílico de 1,65 por unidad de sacárido y a continuación se liofilizan.
Con un método similar al que se ha utilizado para la preparación del compuesto 1, se obtiene un maltooctaosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio.
Basándose en el extracto seco: [compuesto 9] = 26,3 mg/g
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados por el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 0,65.
El grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 1,0.

AA10. Compuesto 10: Maltotriosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-tirosinato de sodio

Con un método similar al que se ha descrito en la preparación del compuesto 1 pero realizado con el L-tirosinato de metilo, sal de ácido clorhídrico (Bachem), se obtiene un maltotriosametilcarboxilato de sodio, caracterizado por un grado de sustitución en metilcarboxilato de sodio por unidad de sacárido de 1,64 funcionalizado por el L-tirosinato de sodio.
Basándose en el extracto seco: [compuesto 10] = 9,1 mg/g
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados por el L-tirosinato de sodio por unidad de sacárido es de 0,81.
El grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 0,83.

AA11. Compuesto 11: Maltotriosametilcarboxilato de sodio funcionalizado por el alfa-fenilglicinato de sodio

Con un método similar al que se ha descrito en la preparación del compuesto 1, se obtienen 10 g de ácido maltotriosametilcarboxílico de grado de sustitución en ácido metilcarboxílico por unidad de sacárido de 1,64 y a continuación se liofilizan.
Se solubilizan 8 g de ácido maltotriosametilcarboxílico (50 mmol de grupos funcionales de ácido metilcarboxílico) en DMF y a continuación se enfría a 0 ºC. Se prepara una mezcla de alfa-fenilglicinato de sodio (Bachem, 5 g ; 33 mmol) y de trietilamina (33 mmol) en agua. A continuación se añade una solución de NMM (4,9 g; 49 mmol) y de EtOCOCl (5,3 g, 49 mmol) a la solución de ácido maltotriosametilcarboxílico a 0 ºC. A continuación se añade la solución de alfa-fenilglicinato de sodio y de trietilamina y la mezcla se agita a 30 ºC. Una solución acuosa de imidazol (340 g/l) se añade después de 90 minutos. El medio se diluye con agua y a continuación la solución obtenida es purificada mediante ultrafiltración sobre membranas de PES de 1 kDa con respecto a un tampón de $NaHCO_3/Na_2CO_3$ a pH 10,4 a 150 mM, NaCl al 0,9 % y agua. La concentración de compuesto de la solución final se determina mediante extracto seco. Una muestra de solución se liofiliza y se analiza por RMN ^{1}H en D_2O para determinar el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados con el alfa-fenilglicinato de sodio.
Basándose en el extracto seco: [compuesto 11] = 9,1 mg/g
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados con el alfa-fenilglicinato de sodio por unidad de sacárido es de 0,52.
El grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 1,12.

AB Polisacáridos a modo de contra-ejemplos

AB1. Polisacárido 1: Dextranometilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio
El polisacárido 1 es un dextranometilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio obtenido a partir de un dextrano de masa molar media en peso de 10 kg/mol (DP = 39, Pharmacosmos) de acuerdo con el método que se describe en la solicitud de patente FR 07/02316 publicada con el número FR2914305. Después de la dosificación de ácido/base, el grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 0,6.
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados por el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 0,46.

Este polisacárido corresponde al polisacárido 1 de la solicitud FR0901478.

AB2. Polisacárido 2: Dextranometilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio

El polisacárido 2 es un dextranometilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio obtenido a partir de un dextrano de masa molar media en peso de 5 kg/mol (DP = 19, Pharmacosmos) de acuerdo con el método que se describe en la solicitud de patente FR 07/02316 publicada con el número FR2914305. Basándose en la dosificación de ácido/base, el grado de sustitución en metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 1,01.
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados por el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 0,64.

AB3. Polisacárido 3: Dextranometilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio

El polisacárido 3 es un dextranometilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio obtenido a partir de un dextrano de masa molar media en peso de 5 kg/mol (DP = 19, Pharmacosmos) de acuerdo con el método descrito en la solicitud de patente FR 07/02316 publicada con el número FR2914305. Basándose en la dosificación de ácido/base, el grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 0,65.
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados por el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 0,45.

AB4. Polisacárido 4: Dextranometilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio

El polisacárido 4 es un dextranometilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio obtenido a partir de un dextrano de masa molar media en peso de 10 kg/mol (DP = 39, Pharmacosmos) de acuerdo con el método que se describe en la solicitud de patente FR 07/02316 publicada con el número FR2914305. Basándose en la dosificación de ácido/base, el grado de sustitución en metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 1,01.
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados por el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 0,64.

AB5. Polisacárido 5: Dextranometilcarboxilato de sodio funcionalizado con L-fenilalaninato de sodio

El polisacárido 5 es un dextranometilcarboxilato de sodio funcionalizado por el L-fenilalaninato de sodio obtenido a partir de un dextrano de masa molar media en peso de 5 kg/mol (DP = 19, Pharmacosmos) de acuerdo con el método que se describe en la solicitud de patente FR 07/02316 publicada con el número FR2914305. Basándose en la dosificación de ácido/base, el grado de sustitución en metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 0,45.
Basándose en la RMN ^{1}H: el grado de sustitución de metilcarboxilatos funcionalizados por el L-fenilalaninato de sodio por unidad de sacárido es de 0,65.

AC Compuesto polianiónico

Compuesto polianiónico 1: Maltotriosametilcarboxilato de sodio

A 8 g (143 mmol de grupos funcionales hidroxilo) de maltotriosa (CarboSynth) disueltos en agua a 65 ºC se añaden 0,6 g (16 mmol) de borohidruro sódico. Después de 30 min de agitación, se añaden 28 g (238 mmol) de cloroacetato sódico. A esta solución a continuación se le añaden, gota a gota, 24 ml de NaOH 10 N (240 mmol) y a continuación la mezcla se calienta a 65 ºC durante 90 minutos. A continuación se añaden 16,6 g (143 mmol) de cloroacetato sódico al medio de reacción así como 14 ml de NaOH 10 N (140 mmol) gota a gota. Después de 1 h de calentamiento, le mezcla es diluida con agua, se neutraliza con ácido acético y a continuación se purifica mediante ultrafiltración sobre membrana de PES de 1 kDa con respecto a agua. La concentración de compuesto de la solución final se determina mediante extracto seco, y a continuación se realiza una dosificación de ácido/base en una mezcla de agua/acetona a 50/50 (V/V) para determinar el grado de sustitución de metilcarboxilato de sodio.
Basándose en el extracto seco: [compuesto polianiónico 1] = 32,9 mg/g
Basándose en la dosificación de ácido/base: el grado de sustitución de metilcarboxilatos de sodio por unidad de sacárido es de 1,65.

B Preparación de las soluciones

B1. Solución de análogo rápido de insulina Novolog® a 100 UI/ml

Esta solución es una solución comercial de insulina Aspart de Novo Nordisk comercializada con el nombre de Novolog®. Este producto es un análogo de insulina Aspart rápida.

B2. Solución de análogo rápido de insulina Humalog® a 100 UI/ml

Esta solución es una solución comercial de insulina lispro de Eli Lilly comercializada con el nombre de Humalog®. Este producto es un análogo rápido de una insulina.

B3. Solución de insulina humana regular. Actrapid® a 100 UI/ml

Esta solución es una solución comercial de insulina humana de Novo Nordisk comercializada con el nombre de Actrapid®. Este producto es una insulina humana regular.

B4. Solución de insulina humana regular Humulin® R a 100 UI/ml

Esta solución es una solución comercial de insulina humana de Eli Lilly comercializada con el nombre de Humulin® R. Este producto es una insulina humana regular.

B5. Preparación de las soluciones de excipientes

Los compuestos polianiónicos no poliméricos son seleccionados por medición de sus constantes de disociación con respecto a iones de calcio y con respecto a su propiedad de no desestabilizar la forma hexamérica de la insulina.
Al tratarse de la constante de disociación con respecto a iones de calcio, ésta es determinada como sigue a continuación.
Son preparadas soluciones que contienen 2,5 mM de $CaCl_2$, 150 mM de NaCl y concentraciones crecientes de compuesto polianiónico (comprendidas entre 0 y 20 mM). El potencial de todas estas formulaciones se mide y se determinan las concentraciones de iones de calcio libres en las formulaciones. Después de linealización con el método de Scatchard, las constantes de disociación se establecen. Estos datos permiten comparar la afinidad de los carboxilatos y de los fosfatos de los diferentes compuestos polianiónicos hacia el calcio Ca.
Al tratarse de su propiedad de no desestabilizar la forma hexamérica de la insulina esta propiedad es medida mediante dicroísmo circular en comparación con la insulina sola (sin compuesto aniónico ni

compuesto polianiónico), véanse los protocolos experimentales en la parte experimental D.

Preparación de una solución de citrato de sodio a 1,188 M

Una solución de citrato de sodio es obtenida solubilizando 9,0811 g de citrato de sodio (30,9 mmol) en 25 ml de agua en un matraz graduado. El pH se ajusta exactamente a 7,4 mediante la adición de 1 ml de HCl 1 M. La solución es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm.

Preparación de una solución de m-cresol 130 mM

Una solución de *m*-cresol es obtenida solubilizando 14,114 g de *m*-cresol (130 mmol) en 986,4 ml de agua en un matraz graduado de 1 l.

Preparación de una solución de m-cresol y glicerina (m-cresol 96,6 mM y glicerina 566 mM)

73,3 g de la solución de *m*-cresol a 130 mM son añadidas a 5,26 g de glicerina y a continuación se diluyen mediante la adición de 22,25 g de agua. La solución obtenida de *m*-cresol y glicerina es homogenizada durante 30 minutos y a continuación se filtra sobre una membrana de 0,22 µm.

Preparación de una solución de Tween 20 a 32,7 mM

Una solución de Tween 20 es obtenida solubilizando 2,0079 g de Tween 20 (1,636 mmol) en 50 ml de agua en un matraz graduado. La solución es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm

.

B6. Preparación de una solución de insulina humana a 500 UI/ml

15 g de agua son añadidas a 563,6 mg de insulina humana, y a continuación el pH es reducido a pH ácido mediante la adición de 5,98 g de HCl 0,1 N. Después de la solubilización completa de la insulina a pH ácido, la solución es neutraizada a pH 7,2 mediante la adición de 8,3 ml de NaOH 0,1 N. A continuación la concentración es ajustada a 500 UI/ml mediante la adición de 0,76 g de agua. Por último la solución es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm.

B7. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina lispro] de 2,0, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 1 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B8. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos se añaden en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 1 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B9. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1 y del compuesto polianiónico 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 1]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina lispro] de 2,0/2,0/1, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el orden siguiente:

Compuesto 1 liofilizado	730 mg
Compuesto polianiónico 1 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml

El compuesto polianiónico 1 puede ser utilizado en la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B10. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1 y del compuesto polianiónico 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 1]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina lispro] de 2,0/5,5/1, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el orden siguiente:

Compuesto 1 liofilizado	730 mg
Compuesto polianiónico 1 liofilizado	2000 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml

El compuesto polianiónico 1 puede ser utilizado en la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio o de otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B11. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos se añaden en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 2 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y se almacena a 4 ºC.

B12. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 2 y del compuesto polianiónico 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 2]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina lispro] de 2,0/2,0/1, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 2 liofilizado	730 mg
Compuesto polianiónico 1 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml

El compuesto polianiónico 1 puede ser utilizado en la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final se ajusta a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y es almacenada a 4 ºC.

B13. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 2 y del compuesto polianiónico 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 2]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina lispro] de 2,0/5,5/1, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 2 liofilizado	730 mg
Compuesto polianiónico 1 liofilizado	2000 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml

El compuesto polianiónico 1 puede ser utilizado en la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B14. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina lispro] de 4, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades especificadas:

Compuesto 1 en forma liofilizada	1460 mg

Solución comercial Humalog® 100 UI/ml 100 ml

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y se almacena a 4 ºC.

B15. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 2.

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina lispro] de 4, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades especificadas:

Compuesto 2 en forma liofilizada 1460 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml 100 ml

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y se almacena a 4 ºC.

B16. Preparación de una solución de análogo de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de tartrato de sodio

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 80 mM de tartrato de sodio, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación:

Compuesto 1 en forma liofilizada 730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml 100 ml
Tartrato de sodio 1,552 g

Para el tartrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y se almacenada a 4 ºC.

B17. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1 y del compuesto polianiónico 1.

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 1]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina lispro] de 2/4/1, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación:

Compuesto 1 en forma liofilizada 730 mg
Compuesto polianiónico 1 en forma liofilizada 1460 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml 100 ml

El compuesto polianiónico 1 se puede utilizar en la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B18. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de trifosfato de sodio

Para un volumen final de 100 ml de formulación los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación:

Compuesto 1 en forma liofilizada 730 mg
Trifosfato de sodio 184 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml 100 ml

Para el trifosfato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B19. Preparación de una solución de análogo de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia de compuesto 2 y de tartrato de sodio

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 80 mM de tartrato de sodio, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación:

Compuesto 2 en forma liofilizada 730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml 100 ml
Tartrato de sodio 1,552 g

Para el tartrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22

µm y es almacena a 4 ºC.

B20. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de compuesto polianiónico 1.

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 2]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina lispro] de 2/4/1, los diferentes reactivos son añadidas en las cantidades que se especifican a continuación:

Compuesto 2 en forma liofilizada	730 mg
Compuesto polianiónico 1 en forma liofilizada	1460 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml

El compuesto polianiónico 1 se puede utilizar en la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final se ajusta a 7,4 ± 0,4. La solución transparente se filtra sobre una membrana de 0,22 µm y se almacena a 4 ºC.

B21. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de trifosfato de sodio

Para un volumen final de 100 ml de formulación los diferentes reactivos se añaden en las cantidades que se especifican a continuación:

Compuesto 2 en forma liofilizada	730 mg
Trifosfato de sodio	184 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml

Para el trifosfato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B22. Preparación de una solución de análogo de insulina (insulina lispro) a 200 UI/ml

La formulación comercial de insulina lispro (Humalog®) ha sido concentrada utilizando unos tubos de centrifugación AMICON Ultra-15 con una sección a 3 kDa. En primer lugar los tubos Amicon se enjuagaron con 12 ml de agua desionizada. Se centrifugaron 12 ml de la formulación comercial durante 35 minutos a 4000 g a 20 ºC. El volumen de la fracción retenida ha sido medida y la concentración así estimada. Todas las fracciones retenidas han sido puestas en común y la concentración global ha sido estimada (> 200 UI/ml).
La concentración de esta solución de insulina lispro concentrada ha sido ajustada a 200 UI/ml por adición de la formulación comercial de insulina lispro (Humalog®). La formulación de insulina lispro concentrada presenta las mismas concentraciones de excipientes (*m*-cresol, glicerina, fosfato) que la formulación comercial a 100 UI/ml.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B23. Preparación de una solución de insulina lispro a 200 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina lispro] de 2, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina lispro a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	1460 mg
Solución de citrato de sodio a 1,118 M	1566 µl

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrado sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B24. Preparación de una solución de insulina lispro a 200 UI/ml en presencia del compuesto 1 y del compuesto polianiónico 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina lispro] de 2/2/1, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación.

Insulina lispro a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	1460 mg
Liofilizado del compuesto polianiónico 1	1460 mg

El compuesto polianiónico 1 se puede utilizar en la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B25. Preparación de una solución de insulina lispro a 200 UI/ml en presencia del compuesto 1 y del compuesto polianiónico 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina lispro] de 2/4/1, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación.

Insulina lispro a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	1460 mg
Liofilizado del compuesto polianiónico 1	2920 mg

El compuesto polianiónico 1 puede ser utilizado en la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y se almacena a 4 ºC.

B26. Preparación de una solución de insulina lispro a 200 UI/ml en presencia del compuesto 2 y del compuesto polianiónico 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina lispro] de 2/4/1, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación.

Insulina lispro a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	1460 mg
Liofilizado del compuesto polianiónico 1	2920 mg

El compuesto polianiónico 1 puede ser utilizado en la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B27. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de tartrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina humana] de 2 y 80 mM de tartrato, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 500 UI/ml	20 ml
Solución del compuesto 1 a 36,01 mg/ml	20,27 ml
Solución de *m*-cresol 96,6 mM/glicerina 566 mM	30 ml
Agua	28,95 ml
Tartrato de sodio	1,552 g

Para el tartrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es de 7,4 ± 0,4. Esta solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y a continuación colocada a +4 ºC.

B28. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de trifosfato

Para un volumen final de 100 ml de formulación los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 500 UI/ml	20 ml
Solución del compuesto 1 a 36,01 mg/ml	20,27 ml
Solución de *m*-cresol 96,6 mM/glicerina 566 mM	30 ml
Agua	28,95 ml
Tartrato de sodio	184 mg

Para el trifosfato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es de 7,4 ± 0,4. Esta solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y a continuación colocada a +4 ºC.

B29. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de tartrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina

humana] de 2 y 80 mM de tartrato, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 500 UI/ml	20 ml
Solución del compuesto 2 a 36,01 mg/ml	20,27 ml
Solución de *m*-cresol 96,6 mM/glicerina 566 mM	30 ml
Agua	28,95 ml
Tartrato de sodio	1,552 g

Para el tartrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es de 7,4 ± 0,4.
Esta solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm a continuación colocada a +4 ºC.

B30. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de trifosfato

Para un volumen final de 100 ml de formulación los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 500 UI/ml	20 ml
Solución del compuesto 2 a 36,01 mg/ml	20,27 ml
Solución de *m*-cresol 96,6 mM/glicerina 566 mM	30 ml
Agua	28,95 ml
Trifosfato de sodio	184 mg

Para el trifosfato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es de 7,4 ± 0,4. Esta solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y a continuación colocada a +4 ºC.

B31. Preparación de una solución de insulina humana a 200 UI/ml

La formulación comercial de insulina humana (Humulin® R) ha sido concentrada utilizando unos tubos de centrifugación AMICON Ultra-15 con un corte a 3 kDa. En primer lugar los tubos Amicon se enjuagaron con 12 ml de agua desionizada. Se centrifugaron 12 ml de la formación comercial durante 35 minutos a 4000 g a 20 ºC. El volumen de la fracción retenida ha sido medida y la concentración se calculó de ese modo. Todas las fracciones retenidas han sido puestas en común y la concentración global ha sido estimada(> 200 UI/ml).
La concentración de esta solución de insulina humana concentrada ha sido ajustada a 200 UI/ml por adición de la formulación comercial de insulina humana (Humulin® R). La formulación de insulina humana concentrada presentan las mismas concentraciones de excipientes (*m*-cresol, glicerina) que la formulación comercial a 100 UI/ml
El pH final es ajustada a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B32. Preparación de una solución de insulina humana a 200 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina humana] de 2, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	1460 mg
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	1566 µl

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B33. Preparación de una solución de insulina humana a 200 UI/ml en presencia del compuesto 1 y del compuesto polianiónico 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina humana] de 2/2/1, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación

Insulina humana a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	1460 mg
Liofilizado del compuesto polianiónico 1	1460 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B34. Preparación de una solución de insulina humana a 200 UI/ml en presencia del compuesto 1 y del compuesto polianiónico 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina humana] de 2/4/1, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación

Insulina humana a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	1460 mg
Liofilizado del compuesto polianiónico 1	2920 mg

El compuesto polianiónico 1 puede ser utilizado en la forma ácida o en la forma básica bajo forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final se ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B35. Preparación de una solución de insulina humana a 200 UI/ml en presencia del compuesto 2 y **de citrato**

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina humana] de 2, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación

Insulina humana a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	1460 mg
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	1566 µl

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B36. Preparación de una solución de insulina humana a 200 UI/ml en presencia del compuesto 2 y del compuesto polianiónico 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina humana] de 2/2/1, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación

Insulina humana a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	1460 mg
Liofilizado del compuesto polianiónico 1	1460 mg

El compuesto polianiónico 1 puede ser utilizado en la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B37. Preparación de una solución de insulina humana a 200 UI/ml en presencia del compuesto 2 y del compuesto polianiónico 1

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[compuesto polianiónico 1]/[insulina humana] de 2/4/1, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación

Insulina humana a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	1460 mg
Liofilizado del compuesto polianiónico 1	2920 mg

El compuesto polianiónico 1 puede ser utilizado en la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC
.

B38. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina humana] de 2 y 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 500 UI/ml	20 ml
Solución del compuesto 2 a 36,01 mg/ml	20,27 ml
Solución de *m*-cresol 96,6 mM/glicerina 566 mM	30 ml
Agua	28,95 ml

Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es de 7,4 ± 0,4. Esta solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y a continuación es colocada a +4 ºC.

B39. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina humana] de 2 y 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 500 UI/ml	20 ml
Solución del compuesto 1 a 36,01 mg/ml	27 ml
Solución de *m*-cresol 96,6 mM/glicerina 566 mM	30 ml
Agua	28,95 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es de 7,4 ± 0,4. Esta solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y a continuación es colocada a +4 ºC.

B40. Preparación de una solución de insulina Aspart a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina Aspart] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 1 liofilizado	730 mg
Solución comercial Novolog® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y es almacenada a 4 ºC.

B41. Solución de insulina análoga rápida Apidra® a 100 UI/ml

Esta solución es una solución comercial de insulina glulisina de Sanofi-Aventis comercializada con el nombre de Apidra®. Este producto es un análogo rápido de insulina.

B42. Preparación de una solución de insulina glulisina a 100 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina glulisina] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos se añaden en las cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 1 liofilizado	730 mg
Solución comercial de Apidra® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B43. Preparación de una solución de insulina Aspart a 100 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina Aspart] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 2 liofilizado	730 mg
Solución comercial Novolog® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de

potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B44. Preparación de una solución de insulina glulisina a 100 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina glulisina] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en en las cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 2 liofilizado	730 mg
Solución comercial de Apidra® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B45. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 5 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 5]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 5 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC
.

B46. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 6 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 6]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 6 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B47. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 7 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 7]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 7 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y es almacenada a 4 ºC.

B48. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 8 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 8]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 8 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B49. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 9 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 9]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 9 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.

B50. Preparación de una solución de insulina humana a **100 UI/ml en presencia del compuesto 5 y de citrato**

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 5]/[insulina humana] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 5 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humulin® R 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B51. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 6 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 6]/[insulina humana] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 6 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humulin® R 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B52. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 7 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 7]/[insulina humana] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 7 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humulin® R 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B53. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 8 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 8]/[insulina humana] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 8 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humulin® R 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B54. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 9 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 9]/[insulina humana] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 9 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humulin® R 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B55.Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 2

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina humana] de 2,0, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 2 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humulin® R 100 UI/ml	100 ml

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y se almacena a 4 ºC.

B56.Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 7

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 7]/[insulina humana] de 2,0, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 7 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humulin® R 100 UI/ml	100 ml

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B57. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 10 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 10]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 10 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® R 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC
.

B58. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 11 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 11]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las

cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 11 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® R 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.

B59. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 10 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 10]/[insulina humana] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades especificadas a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 10 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humulin® R 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B60. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 11 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 11]/[insulina humana] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 11 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humulin® R 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B61. Preparación de una solución de insulina Aspart a 200 UI/ml

La formulación comercial de insulina Aspart (Novolog®) ha sido concentrada utilizando unos tubos de centrifugación AMICON Ultra-15 con un corte a 3 kDa. En primer lugar los tubos Amicon se enjuagaron con 12 ml de agua desionizada. Se centrifugaron 12 ml de la formulación comercial durante 35 minutos a 4000 g a 20 ºC. El volumen de la fracción retenida se midió y la concentración se calculó de ese modo. Todas las fracciones retenidas se pusieron en común y la concentración global ha sido estimada (> 200 UI/ml).
La concentración de esta solución de insulina Aspart concentrada ha sido ajustada a 200 UI/ml por adición de la formulación comercial de insulina Aspart (Novolog®). La formulación concentrada de insulina Aspart concentrada presenta las mismas concentraciones en excipientes (*m*-cresol, glicerina) que la formulación comercial a 100 UI/ml.
Jugando con el tiempo de centrifugación y con la dilución final con la formulación comercial, es posible preparar de la misma manera unas formulaciones de insulina Aspart a 300, 400 o 500 UI/ml.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B62. Preparación de una solución de insulina glulisina a 200 UI/ml

La formulación comercial de insulina glulisina (Apidra®) ha sido concentrada utilizando unos tubos de centrifugación AMICON Ultra-15 con un corte a 3 kDa. En primer lugar los tubos Amicon se enjuagaron con 12 ml de agua desionizada. Se centrifugaron 12 ml de la formación comercial durante 35 minutos a 4000 g a 20 ºC. El volumen de la fracción retenida se midió y la concentración se calculó de ese modo. Todas las fracciones retenidas han sido puestos en común y la concentración global ha sido estimada (> 200 UI/ml).
La concentración de esta solución de insulina glulisina concentrada ha sido ajustada a 200 UI/ml por adición de la formulación comercial de insulina glulisina (Apidra®). La formulación de insulina glulisina concentrada presentan las mismas concentraciones en excipientes (*m*-cresol, NaCl, TRIS) que la formulación comercial a 100 UI/ml.
Jugando con el tiempo de centrifugación y con la dilución final con la formulación comercial, es posible

preparar de la misma manera formulaciones de insulina glulisina a 300, 400 o 500 UI/ml.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B63. Preparación de una solución de insulina Aspart a 200 UI/ml en presencia del compuesto 1 a 14,6 mg/ml y de 18,6 mM de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina Aspart] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación y en el orden que sigue:

Liofilizado del compuesto 1	1460 mg
Insulina Aspart a 200 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	1566 µl

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente se filtra sobre una membrana de 0,22 µm y se almacena a 4 ºC.

B64. Preparación de una solución de insulina humana, de insulina lispro, de insulina Aspart o de insulina glulisina a 300, 400 y 500 UI/ml

Se preparan formulaciones concentradas de insulina humana, de insulina lispro, de insulina Aspart o de insulina glulisina a 300 UI/ml, 400 UI/ml ó 500 UI/ml (así como a todas las concentraciones intermedias) sobre la base del protocolo del ejemplo B62 con respecto a la preparación de una solución de insulina glulisina a 200 UI/ml La formulación comercial de insulina se concentra utilizando unos tubos de centrifugación AMICON Ultra-15 con un corte a 3 kDa. En primer lugar los tubos Amicon se enjuagan con 12 ml de agua desionizada. 12 ml de la formulación comercial son centrifugados a 4000 g y 20 ºC. Jugando con el tiempo de centrifugación es posible ajustar la concentración final de insulina en la formulación. El volumen de la fracción retenida es medida y la concentración es estimada. Todas las fracciones retenidas son puestas en común y la concentración global es estimada (> 300, 400 o 500 UI/ml).
La concentración de esta solución de insulina concentrada es ajustada a la concentración deseada (por ejemplo, 300 UI/ml, 400 UI/ml o 500 UI/ml) por adición de la formulación de insulina (Humulin® R, Novolog®, Humalog® o Apidra®). La formulación concentrada de insulina concentrada presentan las mismas concentraciones de excipientes que la formulación comercial a 100 UI/ml.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y se almacena a 4 ºC.

B65. Preparación de una solución de insulina glulisina a 200 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina glulisina] de 2, los diferentes reactivos se mezclan en las cantidades que se detallan a continuación y en el orden que sigue:

Liofilizado del compuesto 1	1460 mg
Insulina glulisina a 200 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	1566 µl

El pH final es ajustadop a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y se almacena a 4 ºC.

B66. Preparación de una solución de insulina Aspart a 300 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina Aspart] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina Aspart a 300 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	2190 mg
Citrato de sodio	720 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B67. Preparación de una solución de insulina glulisina a 300 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina glulisina] de 2,0 los diferentes reactivos se mezclan en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina glulisina a 300 UI/ml	100 ml

Liofilizado del compuesto 1	2190 mg
Citrato de sodio	720 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente se filtra sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B68. Preparación de una solución de insulina Aspart a 400 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina Aspart] de 2, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina Aspart a 400 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	2920 mg
Citrato de sodio	960 mg

El pH final se ajusta a 7,4 ± 0,4. La solución transparente se filtra sobre una membrana de 0,22 µm y se almacena a 4 ºC.

B69. Preparación de una solución de insulina glulisina a 400 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina glulisina] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina glulisina a 400 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	2920 mg
Citrato de sodio	960 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B70. Preparación de una solución de insulina Aspart a 500 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina Aspart] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina Aspart a 500 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	3650 mg
Citrato de sodio	1200 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B71. Preparación de una solución de insulina glulisina a 500 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina glulisina] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina glulisina a 500 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	3650 mg
Citrato de sodio	1200 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B72. Preparación de una solución de insulina humana a 300 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina humana] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 300 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	2190 mg
Citrato de sodio	720 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B73. Preparación de una solución de insulina lispro a 300 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina lispro] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina lispro a 300 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	2190 mg
Citrato de sodio	720 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B74. Preparación de una solución de insulina humana a 400 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina humana] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 400 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	2920 mg
Citrato de sodio	960 mg

El pH final se ajusta a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B75. Preparación de una solución de insulina lispro a 400 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina lispro] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina lispro a 400 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	2920 mg
Citrato de sodio	960 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B76. Preparación de una solución de insulina humana a 500 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina humana] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 500 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	3650 mg
Citrato de sodio	1200 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y es almacenada a 4 ºC.

B77. Preparación de una solución de insulina lispro a 500 UI/ml en presencia del compuesto 1 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 1]/[insulina lispro] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina lispro a 500 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 1	3650 mg
Citrato de sodio	1200 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente se filtra sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B78. Preparación de una solución de insulina lispro a 200 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina lispro] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina lispro a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	1460 mg
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	1566 µl

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B79. Preparación de una solución de insulina Aspart a 200 UI/ml en presencia del compuesto 2

y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina Aspart] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina Aspart a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	1460 mg
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	1566 µl

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B80. Preparación de una solución de insulina glulisina a 200 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina glulisina] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina glulisina a 200 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	1460 mg
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	1566 µl

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B81. Preparación de una solución de insulina Aspart a 300 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina Aspart] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina Aspart a 300 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	2190 mg
Citrato de sodio	720 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B82. Preparación de una solución de insulina glulisina a 300 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato.

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina glulisina] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina glulisina a 300 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	2190 mg
Citrato de sodio	720 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B83. Preparación de una solución de insulina Aspart a 400 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina Aspart] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina Aspart a 400 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	2920 mg
Citrato de sodio	960 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B84. Preparación de una solución de insulina glulisina a 400 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina glulisina] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina glulisina a 400 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	2920 mg
Citrato de sodio	960 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B85. Preparación de una solución de insulina Aspart a 500 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina Aspart] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:]

Insulina Aspart a 500 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	3650 mg
Citrato de sodio	1200 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B86. Preparación de una solución de insulina glulisina a 500 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina glulisina] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina glulisina a 500 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	3650 mg
Citrato de sodio	1200 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B87. Preparación de una solución de insulina humana a 300 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina humana] de 2, los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 300 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	2190 mg
Citrato de sodio	720 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B88. Preparación de una solución de insulina lispro a 300 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina lispro] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina lispro a 300 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	2190 mg
Citrato de sodio	720 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B89. Preparación de una solución de insulina humana a 400 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina humana] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 400 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	2920 mg
Citrato de sodio	960 mg

El pH final es ajustado 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B90. Preparación de una solución de insulina lispro a 400 UI/ml en presencia del compuesto 2 y

de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina lispro] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina lispro a 400 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	2920 mg
Citrato de sodio	960 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B91. Preparación de una solución de insulina humana a 500 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina humana] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina humana a 500 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	3650 mg
Citrato de sodio	1200 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtradada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B92. Preparación de una solución de insulina lispro a 500 UI/ml en presencia del compuesto 2 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación con una proporción de masa [compuesto 2]/[insulina lispro] de 2,0 los diferentes reactivos son mezclados en las cantidades que se detallan a continuación:

Insulina lispro a 500 UI/ml	100 ml
Liofilizado del compuesto 2	3650 mg
Citrato de sodio	1200 mg

El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4. La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B93. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 3 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 3]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 3 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final se ajusta a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B94. Preparación de una solución de insulina lispro a 100 UI/ml en presencia del compuesto 4 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 4]/[insulina lispro] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 4 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humalog® 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B95. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 3 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 3]/[insulina humana] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las

cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 3 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humulin® R 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

B96. Preparación de una solución de insulina humana a 100 UI/ml en presencia del compuesto 4 y de citrato

Para un volumen final de 100 ml de formulación, con una proporción de masa [compuesto 4]/[insulina humana] de 2,0 y una concentración de 9,3 mM de citrato, los diferentes reactivos son añadidos en las cantidades que se especifican a continuación y en el siguiente orden:

Compuesto 4 liofilizado	730 mg
Solución comercial Humulin® R 100 UI/ml	100 ml
Solución de citrato de sodio a 1,188 M	783 µl

Para el citrato, se puede utilizar, la forma ácida o la forma básica en forma de sal de sodio, de sal de potasio u otra sal compatible con una formulación inyectable.
El pH final es ajustado a 7,4 ± 0,4.
La solución transparente es filtrada sobre una membrana de 0,22 µm y almacenada a 4 ºC.

C Farmacodinámica y farmacocinética

C1 : Protocolo de medición de la farmacodinámica de las soluciones de insulina

12 cerdos domésticos de aproximadamente 50 kg, previamente cateterizados a nivel de la yugular, se dejan en ayunas 2,5 horas antes del comienzo del experimento. En la hora que precede a la inyección de insulina, se realizan 3 extracciones de sangre con el fin de determinar el nivel basal de glucosa y de insulina.
La inyección de insulina a la dosis de 0,09 UI/kg para la insulina lispro y a la dosis de 0,125 UI/kg para la insulina humana y la insulina Aspart es realizada por vía subcutánea a nivel del cuello, bajo la oreja del animal con la ayuda de la pluma de insulina Novopen equipada con una aguja de calibre 31 G.
A continuación se realizan extracciones sanguíneas cada 4 minutos durante 20 minutos y a continuación cada 10 minutos hasta 3 horas. Después de cada extracción con el catéter se enjuaga con una solución diluida de heparina.
Una gota de sangre es tomada para determinar la glucemia por medio de un glucómetro.
A continuación se trazan las curvas de farmacodinámica de la glucosa y el tiempo necesario para alcanzar la tasa mínima de glucosa en la sangre para cada cerdo es determinado e informado como Tmín de glucosa. A continuación es calculado el promedio de los Tmín.
La sangre restante es recogida en un tubo seco y es centrifugado para aislar el suero. Las tasas de insulina en las muestras de suero son medidas por el método inmunoenzimático ELISA en sándwich para cada cerdo.
A continuación se trazan las curvas de farmacocinética. El tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima de insulina en el suero para cada cerdo es determinado e informado como Tmáx de insulina. A continuación se calcula el promedio de los Tmáx de insulina.

C2: Resultados de farmacodinámica y de farmacocinética de las soluciones de insulinas de los ejemplos B2 y B8

Ejemplo	Insulina	Compuesto	Compuesto polianiónico	Número de cerdos
B2	Lispro	-	-	11
B8	Lispro	1	Citrato 9,3 mM	10

Los resultados de farmacodinámica obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B2 y B8 son presentados en la figura 1. De acuerdo con la invención, el análisis de estas curvas muestra que la formulación del ejemplo B8 que comprende el compuesto 1 y el citrato a 9,3 mM como excipiente (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B8, Tmín de glucosa = 30 ± 11 min) permite obtener una acción más rápida que la de la formulación comercial Humalog® del ejemplo B2 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B2, Tmín de glucosa = 44 ± 14 min).
Los resultados de farmacocinética obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B2 y B8 son representados en la figura 2. De acuerdo con la invención, el análisis de estas curvas muestra que la formulación del ejemplo B8 que comprende el compuesto 1 y el citrato a 9,3 mM como excipientes (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B8, Tmáx de insulina = 11 ± 6 min) induce una absorción más rápida de la insulina lispro que la formulación comercial Humalog® del

ejemplo B2 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B2, Tmáx de insulina = 18 ± 8 min).

C3: Resultados de farmacodinámica y de farmacocinética de las soluciones de insulinas De los ejemplos B2 y B10

Ejemplo	Insulina	Compuesto	Compuesto polianiónico	Número de cerdos
B2	Lispro	-	-	11
B10	Lispro	1	Compuesto polianiónico 1	11

Los resultados de farmacodinámica obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B2 y B10 son representados en la figura 3. De acuerdo con la invención, el análisis de estas curvas muestra que la formulación del ejemplo B10 que comprende el compuesto 1 y el compuesto polianiónico 1 como excipientes a 20 mg/ml (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B10, Tmín de glucosa = 33 ± 13 min) permite obtener una acción más rápida que la de la formulación comercial Humalog® del ejemplo B2 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B2, Tmín de glucosa = 44 ± 14 min).
Los resultados de farmacocinética obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B2 y B10 son representados en la figura 4. De acuerdo con la invención, el análisis de estas curvas muestra que la formulación del ejemplo B10 que comprende el compuesto 1 y el compuesto polianiónico 1 como excipientes a 20 mg/ml (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B10, Tmáx de insulina = 15 ± 9 min) induce una absorción más rápida de la insulina lispro que la formulación comercial Humalog® del ejemplo B2 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B2, Tmáx de insulina = 18 ± 8 min).

C4: Resultados de farmacodinámica y de farmacocinética de las soluciones de insulinas de los ejemplos B2 y B7

Ejemplo	Insulina	Compuesto	Compuesto polianiónico	Número de cerdos
B2	Lispro	-	-	12
B7	Lispro	1	-	12

Los resultados de farmacodinámica obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B2 y B7 son representadas en la figura 5. De acuerdo con la invención, el análisis de estas curvas muestra que la formulación del ejemplo B7 que comprende el compuesto 1 como excipiente (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B7, Tmín de glucosa = 41 ± 16 min) induce un inicio de la acción más rápido que la de la formulación comercial Humalog® del ejemplo B2 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B2, Tmín de glucosa = 50 ± 14 min).
Los resultados de farmacocinética obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B2 y B7 son representados en la figura 6. El análisis de estas curvas muestra que la formulación que comprende el compuesto 1 como excipiente (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B2, Tmáx de insulina = 21 ± 10 min) no induce una absorción más rápida de la insulina lispro que la formulación comercial Humalog® del ejemplo B2 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B2 (Tmáx de insulina = 20 ± 9 min). Por lo tanto el compuesto 1 solo no es suficiente para inducir una aceleración significativa de la farmacocinética de la insulina lispro.

C5: Resultados de farmacodinámica y de farmacocinética de las soluciones de insulinas de los ejemplos B1 y B3

Ejemplo	Insulina	Compuesto	Compuesto polianiónico	Número de cerdos
B1	Aspart	-	-	11
B3	Humana	-	-	11

Los resultados de farmacodinámica obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B1 y B3 son representados en la figura 7. El análisis de estas curvas muestra que la formulación de insulina humana del ejemplo B3 (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B3, Tmín de glucosa = 61 ± 31 min) tiene una acción bastante más lenta que la de la formulación comercial de insulina Aspart del ejemplo B1 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B1, Tmín de glucosa = 44 ± 13 min).
Los resultados de farmacocinética obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B1 y B3 son representadas en la figura 8. El análisis de estas curvas muestra que la formulación de insulina humana sola del ejemplo B3 (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B3, Tmáx de insulina = 36 ± 33 min) induce una absorción bastante más lenta que la formulación comercial de insulina Aspart (Novolog®) del ejemplo B1 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B1, Tmáx de insulina = 28 ± 13 min).

Estos resultados son conformes con los de la bibliografía con una aceleración de la disminución de la glucemia y de la absorción de la insulina para un análogo rápido de insulina con respecto a una insulina humana.

C6: Resultados de farmacodinámica y de farmacocinética de las soluciones de insulinas de los ejemplos B1 y B39

Ejemplo	Insulina	Compuesto	Compuesto polianiónico	Número de cerdos
B1	Aspart	-	-	14
B39	Humana	1	Citrato 9,3 mM	5

Los resultados de farmacodinámica obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B1 y B39 son representadas en la figura 9. El análisis de estas curvas muestra que la formulación a base de insulina humana del ejemplo B39 que comprende el compuesto 1 y el citrato a 9,3 mM como excipientes (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B39, Tmín de glucosa = 46 ± 9 min) permite obtener una acción similar a la de la formulación comercial de insulina Aspart (Novolog®) del ejemplo B1 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B1, Tmín de glucosa = 53 ± 24 min).
Los resultados de farmacocinética obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B1 y B39 son representadas en la figura 10. El análisis de estas curvas muestra que la formulación del ejemplo B39 que comprende el compuesto 1 y el citrato a 9,3 mM como excipientes (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B39, Tmáx de insulina = 20 ± 7 min) inducen una absorción de la insulina humana similar a la de la formulación comercial de insulina Aspart (Novolog®) del ejemplo B1 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B1, Tmáx de insulina = 22 ± 10 min).
Los parámetros de tiempo de la insulina Aspart (Novolog®) entre los ejemplos C5 y C6 siendo similares, se puede deducir por extrapolación que la formulación del ejemplo B39 induce una aceleración de la disminución de la glucemia y de la absorción de la insulina humana con respecto a la formulación comercial de la insulina humana (ejemplo B3).

C7: Resultados de farmacodinámica y de farmacocinética de las soluciones de insulinas de los ejemplos B2 y B11

Ejemplo	Insulina	Compuesto	Compuesto polianiónico	Número de cerdos
B2	Lispro	-	-	26
B11	Lispro	2	Citrato 9,3 mM	23

Los resultados de farmacodinámica obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B2 y B11 son representados en la figura 13. De acuerdo con la invención, el análisis de estas curvas muestra que la formulación del ejemplo B11 que comprende el compuesto 2 y el citrato a 9,3 mM como excipientes (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B11, Tmín de glucosa = 32 ± 10 min) permite obtener una acción más rápida que la de la formulación comercial Humalog® del ejemplo B2 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B2, Tmín de glucosa = 41 ± 21 min).
Los resultados de farmacocinética obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B2 y B11 son representados en la figura 14. De acuerdo con la invención, el análisis de estas curvas muestra que la formulación del ejemplo B11 que comprende el compuesto 2 y el citrato a 9,3 mM como excipientes (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B11, Tmáx de insulina = 13 ± 5 min) induce una absorción más rápida de la insulina lispro que la formulación comercial Humalog® del ejemplo B2 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B2, Tmáx de insulina = 22 ± 13 min).

C8: Resultados de farmacodinámica y de farmacocinética de las soluciones de insulinas de los ejemplos B1 y B38

Ejemplo	Insulina	Compuesto	Compuesto polianiónico	Número de cerdos
B1	Aspart	-	-	37
B38	Humana	2	Citrato 9,3 mM	31

Los resultados de farmacodinámica obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B1 y B38 son representados en la figura 15. El análisis de estas curvas muestra que la formulación a base de insulina humana del ejemplo B38 que comprende el compuesto 2 y el citrato a 9,3 mM como excipientes (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B102, Tmín de glucosa = 47 ± 30 min) permite obtener una acción similar a la de la formulación comercial de insulina Aspart (Novolog®) del ejemplo B1 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B1, Tmín de glucosa = 47 ± 15 min).

Los resultados de farmacocinética obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B1 y B38 son representados en la figura 16. El análisis de estas curvas muestra que la formulación del ejemplo B38 que comprende el compuesto 2 y el citrato a 9,3 mM como excipientes (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B38, Tmáx de insulina = 22 ± 21 min) induce una absorción de la insulina humana similar a la de la formulación comercial de insulina Aspart (Novolog®) del ejemplo B1 (curva trazada por los triángulos que corresponden al ejemplo B1, Tmáx de insulina = 19 ± 12 min).
Los parámetros de tiempo de la insulina Aspart (Novolog®) entre los ejemplos C5 y C8 siendo aproximados, se puede deducir por extrapolación que la formulación del ejemplo B38 induce una aceleración de la disminución de la glucemia y de la absorción de la insulina humana con respecto a la formulación comercial de la insulina humana (ejemplo B3).

C9: Resultados de farmacodinámica y de farmacocinética de las soluciones de insulinas de los ejemplos B1 y B53

Ejemplo	Insulina	Compuesto	Compuesto polianiónico	Número de cerdos
B1	Aspart	-	-	12
B53	Humana	Compuesto 8	Citrato 9,3 mM	8

Los resultados de farmacodinámica obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B1 y B53 son representadas en la figura 17. El análisis de estas curvas muestra que la formulación a base de insulina humana del ejemplo B53 que comprende el compuesto 8 y el citrato a 9,3 mM como excipientes (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B53, Tmín de glucosa = 63 ± 36 min) permite obtener una acción también casi tan rápida como la de la formulación comercial de insulina Aspart (Novolog®) del ejemplo B1 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B1, Tmín de glucosa = 53 ± 19 min).
Los resultados de farmacocinética obtenidos con las formulaciones descritas en los ejemplos B1 y B53 son representados en la figura 18. El análisis de estas curvas muestra que la formulación del ejemplo B53 que comprende el compuesto 8 y el citrato a 9,3 mM como excipientes (curva trazada con los cuadrados que corresponden al ejemplo B53, Tmáx de insulina = 19 ± 12 min) induce una absorción de la insulina humana similar a la de la formulación comercial de insulina Aspart (Novolog®) del ejemplo B1 (curva trazada con los triángulos que corresponden al ejemplo B1, Tmáx de insulina = 19 ± 6 min).
Los parámetros de tiempo de la insulina Aspart (Novolog®) entre los ejemplos C5 y C9 siendo aproximados, se puede deducir por extrapolación que la formulación del ejemplo B53 induce una aceleración de la disminución de la glucemia y de la absorción de la insulina humana con respecto a la formulación comercial de la insulina humana (ejemplo B3).

D Dicroísmo circular

D1: Estado de asociación de la insulina lispro evaluado mediante dicroísmo circular en presencia del compuesto 1

El dicroísmo circular permite estudiar la estructura secundaria y cuaternaria de la insulina. Los monómeros de insulina se organizan en dímeros y en hexámeros. El hexámero es la forma de la insulina más estable física y químicamente. Existen dos formas hexaméricas, la forma R6 y la forma T6. La insulina lispro presenta una señal de CD fuerte a 251 nm característica de la forma hexamérica R6 (la forma más estable). La pérdida de la señal de CD a 251 nm está relacionada con una desestabilización del hexámero (y por lo tanto la primera señal de transformación del hexámero en dímero).
El EDTA y la mezcla de EDTA/citrato destructuran completamente la forma R6 de la insulina lispro (figuras 11). Por lo tanto el EDTA tiene un efecto notable sobre el hexámero.
Por el contrario, el citrato solo, el compuesto 1 solo así como la mezcla de compuesto 1/citrato y compuesto 1/compuesto polianiónico 1 no tienen casi impacto sobre la señal de CD a 251 nm. Por lo tanto estos compuestos no tienen casi ningún impacto sobre la estructura R6 del hexámero y con mayor motivo sobre la estructura hexamérica.

D2: Estado de asociación de la insulina humana evaluado mediante dicroísmo circular en presencia del compuesto 1

El dicroísmo circular permite estudiar la estructura secundaria y cuaternaria de la insulina. Los monómeros de insulina se organizan en dímeros y en hexámeros. El hexámero es la forma de la insulina más estable física y químicamente. La señal de CD a 275 nm es característica de la forma hexamérica de la insulina (señal del hexámero alrededor de aproximadamente -300º, señal del dímero entre -200º y - 250º y señal del monómero por debajo de -200º). Por lo tanto la pérdida de la señal de CD a 275 nm es pues característica de una desestabilización del hexámero en dímeros o monómeros.

El EDTA y la combinación de EDTA/citrato tienen un impacto muy notable en la estructura hexamérica de la insulina humana (disociación completa del hexámero en dímeros, figura 12). Por el contrario, el citrato solo, el compuesto 1 solo, el compuesto polianiónico 1 solo así como las combinaciones del compuesto 1/citrato y compuesto 1/compuesto polianiónico 1 no tienen impacto solbre la estructura hexamérica de la insulina humana. A diferencia del EDTA, las formulaciones de la insulina humana que comprenden el compuesto 1 y el citrato o el compuesto polianiónico 1 no presentan disociación del hexámero de la insulina humana.

D3: Estado de asociación de la insulina lispro evaluado mediante dicroísmo circular en presencia de los compuestos 1 a 11

El dicroísmo circular permite estudiar la estructura secundaria y cuaternaria de la insulina. Los monómeros de insulina se organizan en dímeros y en hexámeros. El hexámero es la forma de la insulina más estable física y químicamente. Existen dos formas hexaméricas, la forma R6 y la forma T6. La insulina lispro presenta una señal de CD fuerte a 251 nm característica de la forma hexamérica R6 (la forma más estable). La pérdida de la señal de CD a 251 nm está relacionada con una desestabilización del hexámero (y por lo tanto la primera señal de transformación del hexámero en dímero). Los resultados obtenidos son representados en la figura 19. Esta figura describe en el eje de la abcisas:

- A: insulina lispro (100 UI/ml)
- B: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 2
- C: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 2 + citrato a 9,3 mM
- D: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 1
- E: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 1 + citrato a 9,3 mM
- F: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 3
- G: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 3 + citrato a 9,3 mM
- H: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 4
- I: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 4 + citrato a 9,3 mM
- J: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 5
- K: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 5 + citrato a 9,3 mM
- L: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 6
- M: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 6 + citrato a 9,3 mM
- N: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 7
- O: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 7 + citrato a 9,3 mM
- P: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 8
- Q: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 8 + citrato a 9,3 mM
- R: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 9
- S: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 9 + citrato a 9,3 mM
- T: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 10
- U: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 10 + citrato a 9,3 mM
- V: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 11
- W: insulina lispro + 7,3 mg/ml de compuesto 11 + citrato a 9,3 mM

y en el eje de ordenadas la señal de dicroísmo circular a 251 nm (grad.cm^2.dmol^{-1}).
Los compuestos 1 a 11 solos así como los compuestos 1 a 11 en combinación con el citrato no tienen impacto en la señal de CD a 251 nm de la insulina lispro. Por lo tanto los compuestos 1 a 11 no tienen ningún impacto en la estructura R6 del hexámero y con mayor motivo en la estructura hexamérica de la insulina lispro.

D4: Estado de asociación de la insulina humana evaluado mediante dicroísmo circular en presencia de los compuestos 1 a 11

El dicroísmo circular permite estudiar la estructura secundaria y cuaternaria de la insulina. Los monómeros de insulina se organizan en dímeros y en hexámeros. El hexámero es la forma de la insulina más estable física y químicamente. La señal de CD a 275 nm es característica de la forma hexamérica de la insulina (señal del hexámero alrededor de aproximadamente de -300º, señal del dímero entre -200º y - 250º y señal del monómero por debajo de -200º). Por lo tanto la pérdida de la señal de CD a 275 nm es característica de una desestabilización del hexámero en dímeros o monómeros. Los resultados obtenidos son representados en la figura 20. Esta figura describe en el eje de la abcisas:

A: insulina humana (100 UI/ml)
B: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 2
C: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 2 + citrato a 9,3 mM
D: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 1
E: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 1 + citrato a 9,3 mM
F: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 3
G: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 3 + citrato a 9,3 mM

H: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 4
I: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 4 + citrato a 9,3 mM
J: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 5
K: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 5 + citrato a 9,3 mM
L: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 6
M: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 6 + citrato a 9,3 mM
N: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 7
O: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 7 + citrato a 9,3 mM
P: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 8
Q: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 8 + citrato a 9,3 mM
R: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 9
S: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 9 + citrato a 9,3 mM
T: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 10
U: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 10 + citrato a 9,3 mM
V: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 11
W: insulina humana + 7,3 mg/ml de compuesto 11 + citrato a 9,3 mM

y en el eje de ordenadas la señal de dicroísmo circular a 275 nm (grad.cm^2.dmol^{-1}).
Los compuestos 1 a 11 solos así como los compuestos 1 a 11 en combinación con el citrato no tienen impacto en la señal de CD a 275 nm de la insulina humana. Por lo tanto los compuestos 1 a 11 no tienen ningún impacto en la estructura hexamérica de la insulina humana.

E Solubilización de insulinas humana y análogo en el punto isoeléctrico

E1. Solubilización de la insulina humana en su punto isoeléctrico

La insulina humana tiene un punto isoeléctrico a 5,3. En este pH de 5,3 la insulina humana precipita. Un ensayo que demuestra la formación de un complejo de la insulina humana con los diferentes compuestos es realizado en el punto isoeléctrico. Si existe una interacción, es posible solubilizar la insulina en su punto isoeléctrico.
Se prepara una solución de insulina humana a 200 UI/ml. Se preparan soluciones de compuestos a diferentes concentraciones (8, 30 o 100 mg/ml) en agua. Una mezcla del mismo volumen (50/50) entre la solución de insulina humana y la solución de compuesto es realizada para llegar a una solución que contiene 100 UI/ml de insulina humana y la concentración deseada de compuesto (4, 15 ó 50 mg/ml). El pH de las diferentes soluciones es ajustado a pH 5,3 mediante la adición de ácido acético 200 mM.
El aspecto de la solución es documentado. Si la solución es turbia, el compuesto a la concentración sometida a ensayo no permite la solubilización de la insulina humana. Si la solución es traslúcida, el compuesto permite la solubilización de la insulina humana a la concentración sometida a ensayo. De este modo, la concentración de compuesto necesaria para solubilizar la insulina humana en su punto isoeléctrico puede ser determinada. Cuanto más baja es esta concentración más importante es la afinidad del compuesto hacia la insulina humana.
Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3. Los resultados muestran que los compuestos y los polisacáridos no presentan las mismas propiedades en términos de solubilización de la insulina humana.

Tabla 3

Compuestos (ejemplos) o Polisacáridos (contra-ejemplos)	**Solubilización de la insulina humana a 100 UI/ml por el compuesto a 4 mg/ml**	**Solubilización de la insulina humana a 100 UI/ml por el compuesto a 15 mg/ml**	**Solubilización de la insulina humana a 100 UI/ml por el compuesto a 50 mg/ml**
Contra ejemplos			
Polisacárido 1	Si	Si	Si
Polisacárido 4	Si	Si	Si
Polisacárido 3	Si	Si	Si
Polisacárido 2	Si	Si	Si
Polisacárido 5	Si	Si	Si
Ejemplos			
Compuesto 1	No	No	Si
Compuesto 2	No	No	Si
Compuesto 3	No	No	Si

Compuestos (ejemplos) o Polisacáridos (contra-ejemplos)	Solubilización de la insulina humana a 100 UI/ml por el compuesto a 4 mg/ml	Solubilización de la insulina humana a 100 UI/ml por el compuesto a 15 mg/ml	Solubilización de la insulina humana a 100 UI/ml por el compuesto a 50 mg/ml
Compuesto 4	No	No	Si
Compuesto 6	No	No	Si
Compuesto 8	No	No	Si
Compuesto 9	No	No	Si
Compuesto 10	No	No	Si

E2. Solubilización de la insulina lispro en su punto isoeléctrico

La insulina lispro tiene un punto isoeléctrico a 5,3. A este pH la insulina lispro precipita. Un ensayo que demuestra la formación de un complejo de la insulina lispro con los diferentes compuestos es realizado en el punto isoeléctrico. Si existe una interacción, es posible solubilizar la insulina lispro en su punto isoeléctrico.
La formulación comercial de la insulina lispro (Humalog®) es dialisada contra el tampón de PO_4 1 mM (pH 7). Después de la diálisis, la concentración de insulina lispro es de aproximadamente 90 UI/ml. El liofilizado del compuesto es pesado y solubilizado en la solución de insulina lispro para conducir a unas formulaciones que contienen la insulina lispro a 90 UI/ml y el compuesto en las concentraciones deseadas (4, 15 o 50 mg/ml). El pH de las diferentes soluciones es ajustado a pH 5,3 mediante la adición de ácido acético 200 mM.
El aspecto de la solución es documentado. Si la solución es turbia, el compuesto a la concentración sometida a ensayo no permite la solubilización de la insulina lispro. Si la solución es traslúcida, el compuesto permite la solubilización de la insulina lispro a la concentración sometida a ensayo. De este modo, la concentración de compuesto necesaria para solubilizar la insulina lispro en su punto isoeléctrico puede ser determinada. Cuanto más baja es esta concentración más importante es la afinidad del compuesto hacia la insulina lispro.
Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4. Los resultados muestran que los compuestos y los polisacáridos no presentan las mismas propiedades en términos de solubilización de la insulina lispro.

Tabla 4

Compuestos (ejemplos) o Polisacáridos (contra-ejemplos)	Solubilización de la insulina lispro a 90 UI/ml por el compuesto a 4 mg/ml	Solubilización de la insulina lispro a 90 UI/ml por el compuesto a 15 mg/ml	Solubilización de la insulina lispro a 90 UI/ml por el compuesto a 50 mg/ml
Contra ejemplos			
Polisacárido 1	Si	Si	Si
Polisacárido 3	Si	Si	Si
Polisacárido 2	Si	Si	Si
Ejemplos			
Compuesto 1	No	No	Si
Compuesto 2	No	No	Si
Compuesto 3	No	No	Si

F Interacción con albúmina

F1: Con el fin de determinar las interacciones entre los diferentes polisacáridos o compuestos y una proteína modelo tal como la albúmina, ha sido realizado un ensayo en Centricon (membrana de Punto de Corte de 50 kDa). Una solución de polisacárido o de compuesto a 7,3 mg/ml ha sido diluido a una tercera parte en una solución de BSA (albúmina de suero bovino) a 20 mg/ml en PBS (concentración en la mezcla: 2,43 mg/ml de polisacárido o de compuesto, 13,3 mg/ml de albúmina y aproximadamente 100 mM de sales).
Esta mezcla ha sido centrifugada en Centricon para hacer pasar aproximadamente la mitad del

volumen a través de la membrana. La albúmina se retiene de forma cuantitativa en la membrana del Centricon. Los polisacáridos y los compuestos analizados compuestos solos pasan en gran parte a través de la membrana (para los polisacáridos que tienen las masas molares más importantes, se retiene aproximadamente un 20 % de polisacárido).

Después de la centrifugación el polisacárido o compuesto es dosificado por UV en el filtrado. El porcentaje de polisacárido o compuesto unido a la albúmina es calculado mediante la siguiente ecuación:

(1-[polisacárido o compuesto en el filtrado en presencia de albúmina]/[polisacárido o compuesto en el filtrado en ausencia de albúmina])*100.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5. Se observa muy claramente que los polisacáridos de masa molar de 5-15 kDa son fuertemente retenidos por la albúmina en este ensayo. Por el contrario, los compuestos de la invención de masa molar más baja son claramente menos retenidos por la albúmina en este ensayo.

Tabla 5

Polisacárido o Compuesto	**% de Polisacárido o % de Compuesto unido a BSA**
Contra ejemplos	
Polisacárido 4	97 %
Polisacárido 1	95 %
Polisacárido 3	77 %
Polisacárido 5	86 %
Polisacárido 2	82 %
Ejemplos	
Compuesto 2	21 %
Compuesto 1	20 %
Compuesto 3	27 %
compuesto 4	24 %
Compuesto 5	24 %
Compuesto 6	26 %
Compuesto 7	27 %
Ejemplos	
Compuesto 8	27 %
Compuesto 9	43 %
Compuesto 11	35 %

REIVINDICACIONES

1. Composición en solución acuosa, que comprende insulina en forma hexamérica, al menos un compuesto aniónico sustituido y un compuesto polianiónico no polimérico:

- dicho compuesto aniónico sustituido elegido entre los compuestos aniónicos sustituidos, en estado aislado o en mezcla, constituidos por una cadena principal formada por un número discreto o comprendido entre 1 y 8 ($1 \leq u \leq 8$) de unidades de sacárido idénticas o diferentes, unidas por unos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes, siendo dichas unidades de sacárido elegidas entre el grupo constituido por las hexosas, en forma cíclica o en forma reducida abierta, **caracterizadas porque** están sustituidas por:

a) al menos un sustituyente de fórmula general I:

$$-[R_1]_a-[AA]_m \qquad \text{Fórmula I}$$

• los sustituyentes siendo idénticos o diferentes cuando hay al menos dos sustituyentes, en el cual:

• el radical -[AA]- designa un resto de aminoácido,

• el radical $-R_1-$ siendo:

- o bien un enlace y entonces a = 0, y el resto de aminoácido -[AA] está unido directamente a la cadena principal mediante una función G.

- o bien una cadena de carbono y entonces a = 1, de C2 a C15 eventualmente sustituida y/o que comprende al menos un heteroátomo elegido entre O, N y S y al menos un grupo funcional ácido antes de la reacción con el aminoácido, formando dicha cadena con el resto de aminoácido -[AA] un grupo funcional amida, y es fijado sobre la cadena principal con la ayuda de un grupo funcional F que resulta de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional o un sustituyente llevado por el precursor del radical $-R_1-$,

• F es un grupo funcional elegido entre los grupos funcionales éter, éster o carbamato,

• G es un grupo funcional carbamato,

• m es igual a 1 ó 2,

• el grado de sustitución de las unidades de sacárido, j, en $-[R_1]_a-[AA]_m$ siendo estrictamente superior a 0 e inferior o igual a 6, $0 < j \leq 6$

b) y, eventualmente, uno o varios sustituyentes $-R'_1$,

• siendo el sustituyente $-R'_1$ una cadena de carbono de C2 a C15, eventualmente sustituida y/o que comprende al menos un heteroátomo elegido entre O, N y S y al menos un grupo funcional ácido en forma de sal de cationes alcalinos dicha cadena estando unida a la cadena principal mediante un grupo funcional F' resultante de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo o un grupo funcional ácido carboxílico llevado por la cadena principal y un grupo funcional o un sustituyente llevado por el precursor del sustituyente $-R'_1$,

• F' es un grupo funcional éter, éster o carbamato,

• el grado de sustitución de las unidades de sacárido, i, en $-R'_1$, estando comprendido entre 0 y 6-j, $0 \leq i \leq 6-j$ y,

• F y F' son idénticos o diferentes,

• F y G son idénticos o diferentes,

• $i + j \leq 6$.

• $-R'_1$ idéntico o diferente a $-R_1-$,

• Los grupos funcionales ácidos salificables libres llevados por el sustituyente $-R'_1$, se encuentran en forma de sales de cationes alcalinos,

• dichos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes siendo elegidos entre el grupo constituido por los enlaces glucosídicos de tipo (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) o (1,6), en una geometría alfa o beta.

2. Composición según la reivindicación 1, **caracterizada porque** el compuesto polianiónico es elegido entre el grupo constituido por unos poliácidos carboxílicos o entre el grupo constituido por unos poliácidos fosfóricos o entre el grupo de los compuestos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto de unidades sacarídicas obtenidas a partir de un compuesto disacárido elegido entre el grupo constituido por la trehalosa, la maltosa, la lactosa, la sacarosa, la celobiosa, la isomaltosa, el maltitol y el isomaltitol o entre el grupo de los compuestos polianiónicos constituidos por una cadena principal sacarídica formada por un número discreto de unidades sacarídicas elegidas entre el grupo constituido por el carboximetilmaltotriosa, el carboximetilmaltotetraosa, el carboximetilmaltopentaosa, el carboximetilmaltohexaosa, el carboximetilmaltoheptaosa, el carboximetilmaltooactosa y el carboximetilisomaltotriosa y sus sales de Na^+, K^+, Ca^{2+} o Mg^{2+}.

3. Composición de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada porque,** el poliácido carboxílico es elegido entre el grupo constituido por el ácido cítrico, el ácido tartárico, y sus sales de Na^+, K^+, Ca^{2+} o Mg^{2+}.

4. Composición de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada porque** el compuesto polianiónico constituido por una cadena principal sacarídica formada por un número discreto de unidades sacarídicas es elegido entre el grupo constituido por el carboximetilmaltotriosa, el carboximetilmaltotetraosa, el carboximetilmaltopentaosa, el carboximetilmaltohexaosa, el carboximetilmaltoheptaosa, el carboximetilmaltooactosa y el carboximetilisomaltotriosa y sus sales de Na^+, K^+, Ca^{2+} o Mg^{2+}.

5. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** la insulina es una insulina humana.

6. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** la insulina es un análogo de insulina.

7. Composición de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** el análogo de insulina es elegido entre el grupo constituido por la insulina lispro (Humalog®), la insulina Aspart (Novolog®, Novorapid®) y la insulina glulisina (Apidra®).

8. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada porque** el análogo de insulina es la insulina lispro (Humalog®).

9. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** la proporción de masa de compuesto aniónico sustituido/insulina está comprendida entre 0,5 y 10.

10. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** la concentración de compuesto aniónico sustituido está comprendida entre 1,8 y 36 mg/ml

11. Formulación farmacéutica que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

12. Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizada porque** la concentración de insulina está comprendida entre 240 y 3000 µM (de 40 a 500 UI/ml).

13. Utilización de al menos un compuesto aniónico sustituido constituido por una cadena principal formada por un número discreto o comprendido entre 1 y 8 ($1 \leq u \leq 8$) de unidades sacarídicas idénticas o diferentes, unidas por enlaces glicosídicos idénticos o diferentes, siendo dichas unidades sacarídicas elegidas entre el grupo constituido por, las hexosas, en forma cíclica o en forma reducida abierta, comprendiendo dicho compuesto unos grupos funcionales carboxilos parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilos no sustituidos salificables para preparar una formulación farmacéutica de análogo de insulina humana en mezcla con un compuesto polianiónico que permite, después de su administración, acelerar el paso de la insulina en la sangre y reducir más rápidamente la glucemia con respecto a una formulación exenta de compuesto aniónico sustituido y eventualmente de compuesto polianiónico.

14. Utilización de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizada porque** el compuesto aniónico sustituido, es elegido entre les compuestos aniónicos sustituidos constituidos por una cadena principal sacarídica formada por un número discreto u comprendido entre 1 y 8 ($1 \leq u \leq 8$) de unidades sacarídicas idénticas o diferentes, unidas por unos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes, siendo dichas unidades sacarídicas elegidas entre las hexosas, en forma cíclica o en forma reducida abierta, **caracterizadas:**

a) **porque** son sustituidas de forma estadística con:

- al menos un sustituyente de fórmula general I:

$$-[R_1]_a-[AA]_m \qquad \text{Fórmula I}$$

• siendo los sustituyentes idénticos o diferentes cuando hay al menos dos sustituyentes, en el cual:

• el radical -[AA]- designa un resto de aminoácido, siendo dicho aminoácido elegido entre el grupo constituido por la fenilalanina, la alfa-metil-fenilalanina, la 3,4 dihidroxifenilalanina, la tirosina, la alfa-metil-tirosina, la O-metil-tirosina, la alfa-fenilglicina, la 4-hidroxifenilglicina, la 3,5-dihidroxifenilglicina y sus sales de cationes alcalinos, teniendo dichos derivados una configuración absoluta L o D, -[AA]- es fijado sobre la cadena principal de la molécula por medio de una ramificación de enlace $-R_1-$ o se une directamente a la cadena principal

mediante un grupo funcional G,
• siendo $-R_1-$:
- o bien un enlace G, y entonces a = 0,
- o bien una cadena de carbono, y entonces a = 1, de C1 a C15 eventualmente sustituida y/o que comprende al menos un heteroátomo elegido entre O, N y S y que lleva al menos un grupo funcional ácido antes de la reacción con el aminoácido, formando dicha cadena formando con el resto de aminoácido -[AA]- un enlace amida, y es fijada sobre la cadena principal sacarídica con la ayuda de un grupo funcional F que resulta de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional llevado por el precursor de R_1,
• F es un grupo funcional éter, éster o carbamato,
• G es un grupo funcional éster o carbamato,
• m es igual a 1 ó 2,
• el grado de sustitución, j, en $-[R_1]_a-[AA]_m$ siendo estrictamente superior a 0 e inferior o igual a 6, $0 < j \leq 6$,
y, eventualmente,

➢ uno o varios sustituyentes $-R'_1$
• siendo $-R'_1$ una cadena de carbono de C2 a C15, eventualmente sustituida y/o que comprende al menos un heteroátomo (tales como O, N y S) y que lleva al menos un grupo funcional ácido en forma de sal de cationes alcalinos estando dicha cadena fijada sobre la cadena principal sacarídica por un grupo funcional F' que resulta de una reacción entre un grupo funcional hidroxilo llevado por la cadena principal y un grupo funcional llevado por el precursor de $-R'_1$,
• F' es un grupo funcional éter, éster o carbamato,
• el grado de sustitución i, en $-R'_1$ estando comprendido entre 0 y 6-j, $0 \leq i \leq 6-j$, y,
• $-R'_1-$ idéntico o diferente a $-R_1$,
• F y F' idénticos o diferentes,
• F' y G idénticos o diferentes
• Los grupos funcionales ácidos salificables libres se encuentran en forma de sales de cationes alcalinos,

b) siendo dichos enlaces glucosídicos idénticos o diferentes elegidos entre el grupo constituido por los enlaces glucosídicos de tipo (1,1), (1,2), (1,3), (1,4) ó (1,6), en una geometría alfa o beta,
c) $i + j \leq 6$.

15. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 13 a 14, **caracterizada porque** el compuesto polianiónico es elegido entre el grupo constituido por unos poliácidos carboxílicos o entre el grupo constituido por unos poliácidos fosfóricos o entre el grupo de los compuestos constituidos por una cadena principal sacarídicos formada por un número discreto de unidades sacarídicas obtenidas a partir de un compuesto disacárido elegido entre el grupo constituido por la trehalosa, la maltosa, la lactosa, la sacarosa, la celobiosa, la isomaltosa, el maltitol y el isomaltitol o entre el grupo de los compuestos polianiónicos constituidos por una cadena principal de sacárido formada por un número discreto de unidades sacarídicas elegidos entre el grupo constituido por el carboximetilmaltotriosa, el carboximetilmaltotetraosa, el carboximetilmaltopentaosa, el carboximetilmaltohexaosa, el carboximetilmaltoheptaosa, el carboximetilmaltooactosa y el carboximetilisomaltotriosa y sus sales de Na^+, K^+, Ca^{2+} o Mg^{2+}.

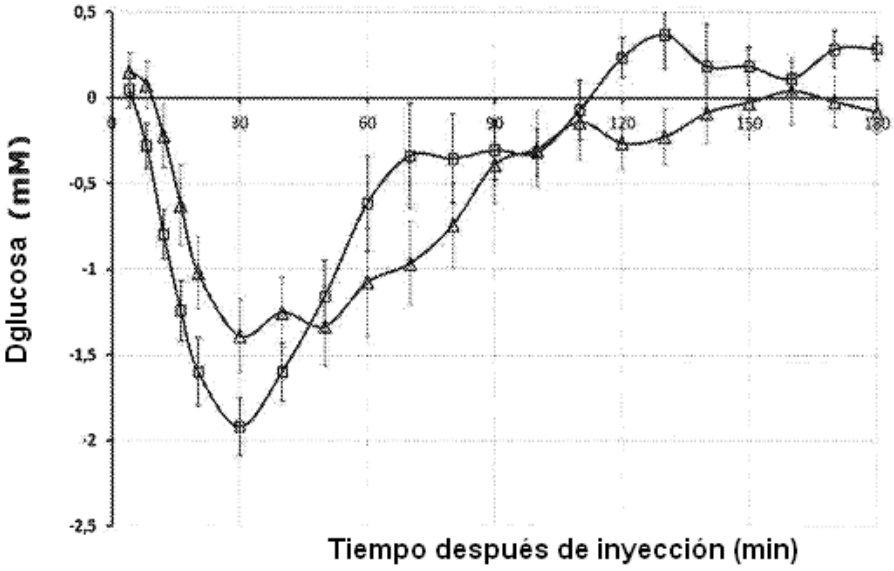


Figura 1

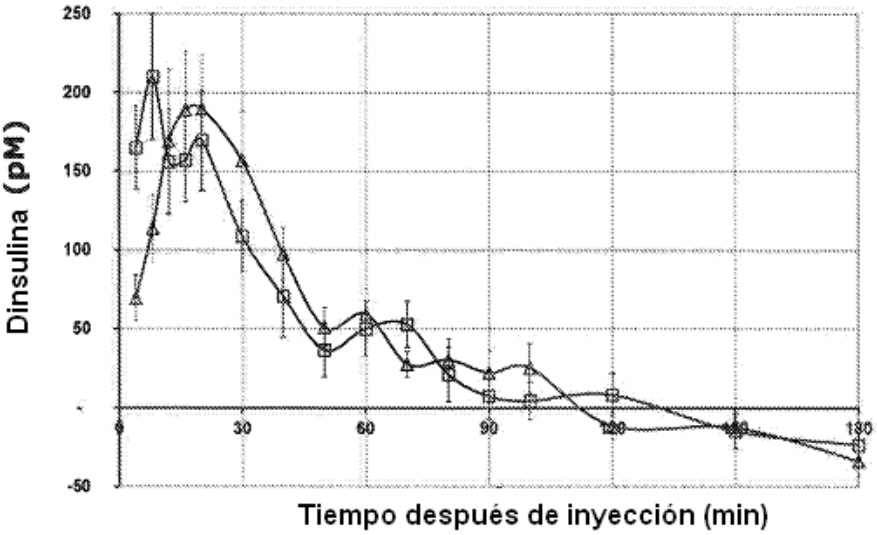


Figura 2

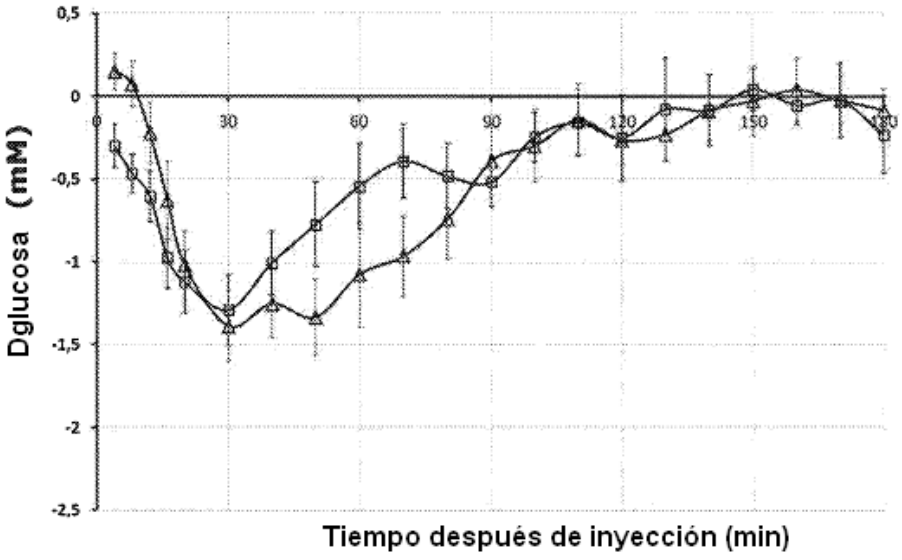


Figura 3

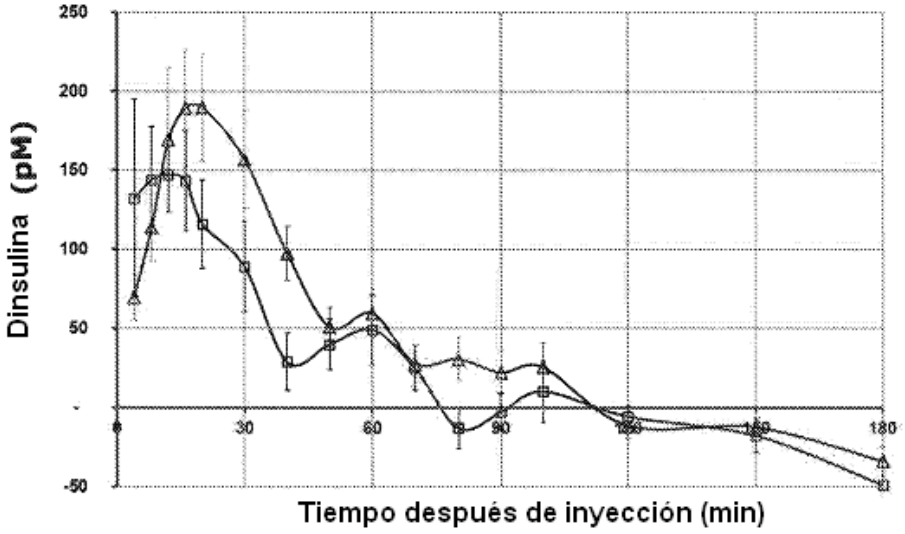


Figura 4

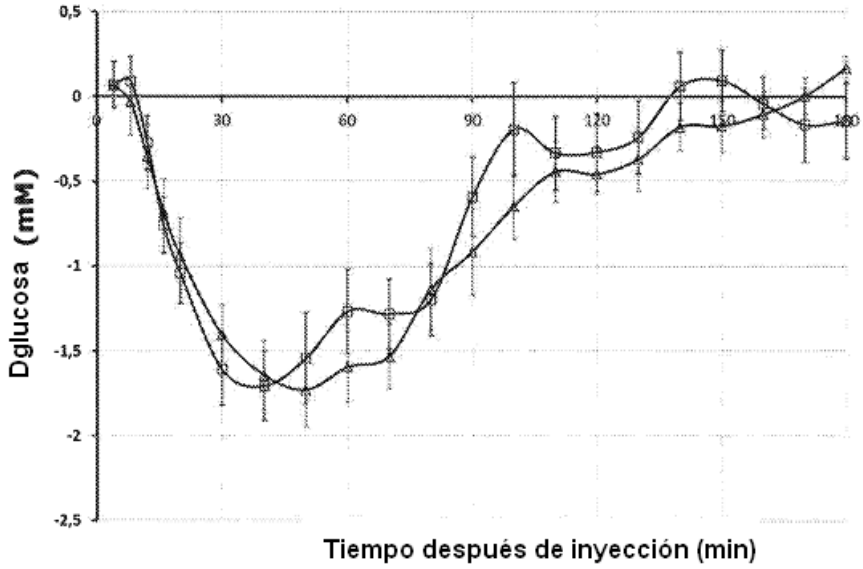


Figura 5

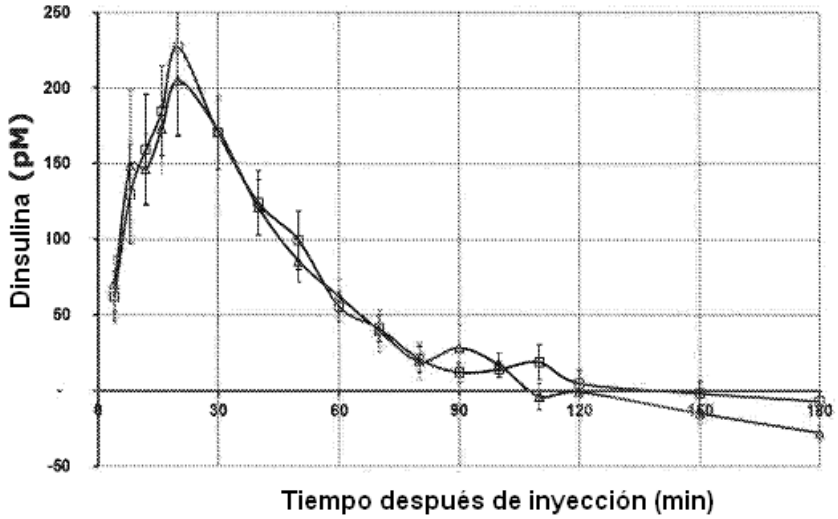


Figura 6

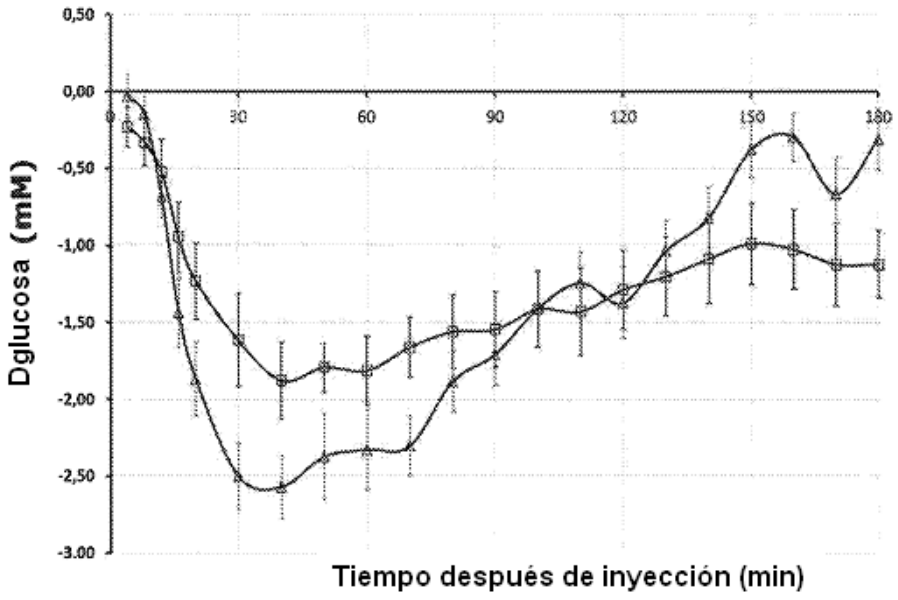


Figura 7

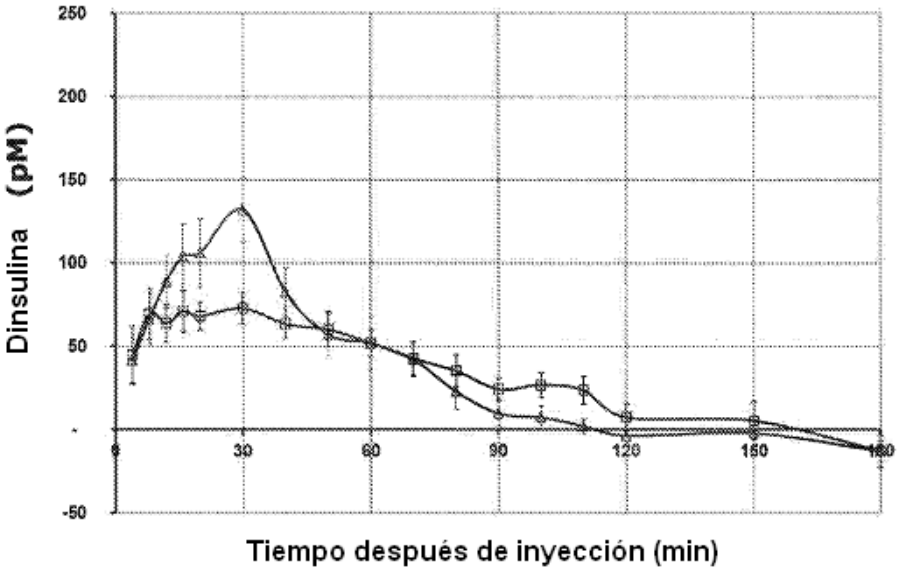


Figura 8

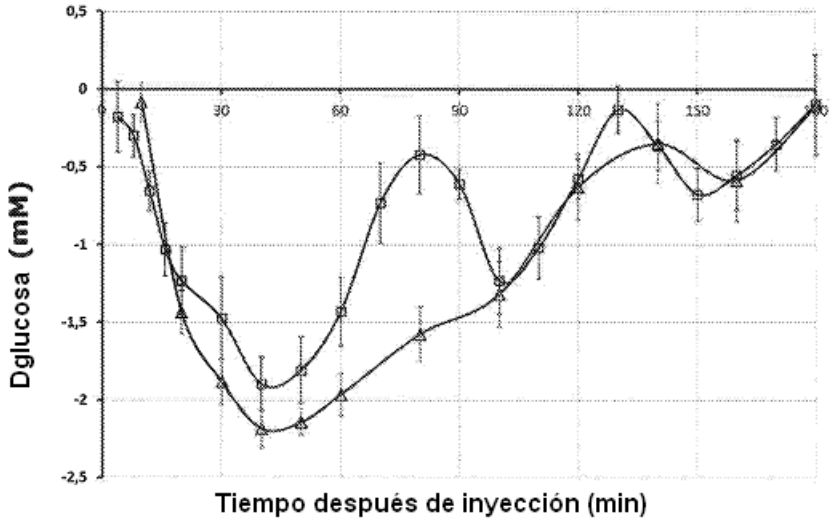


Figura 9

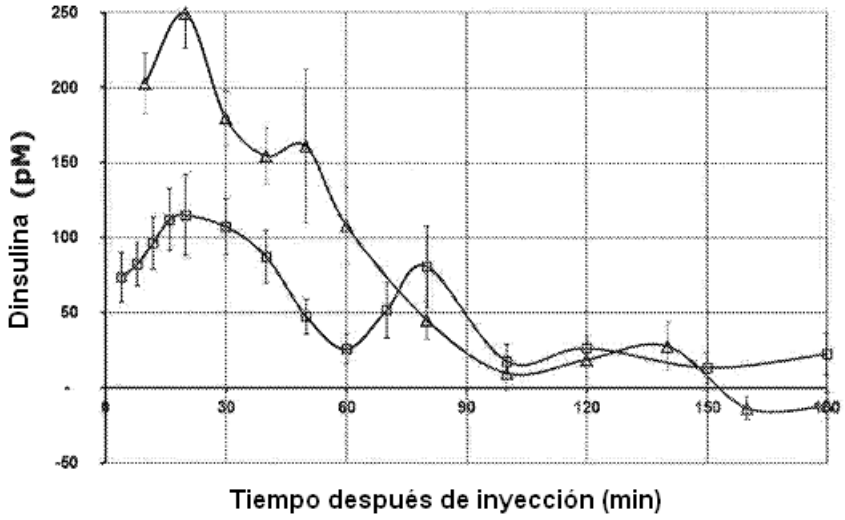


Figura 10

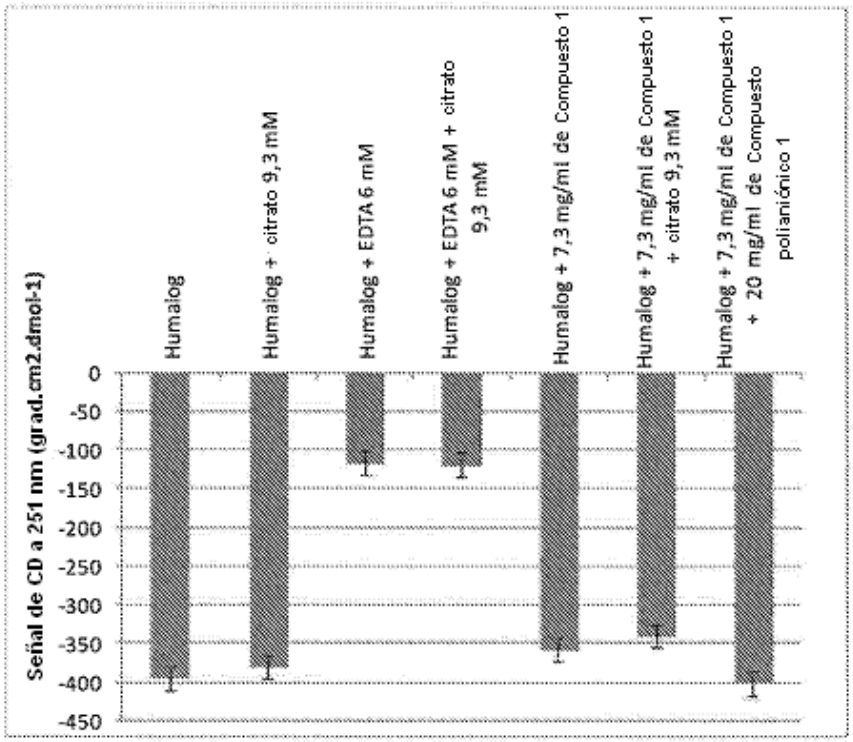


Figura 11

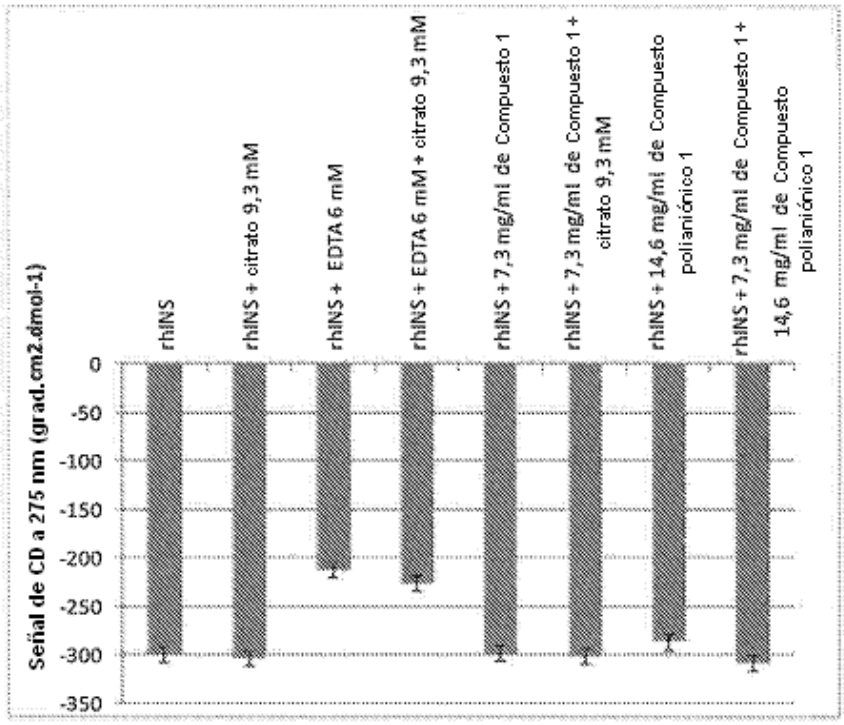


Figura 12

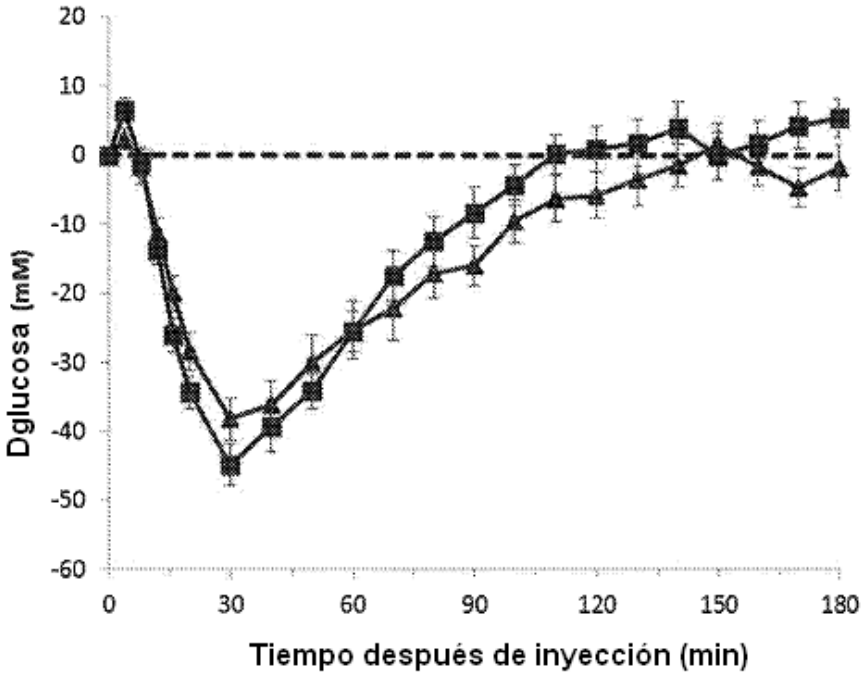


Figura 13

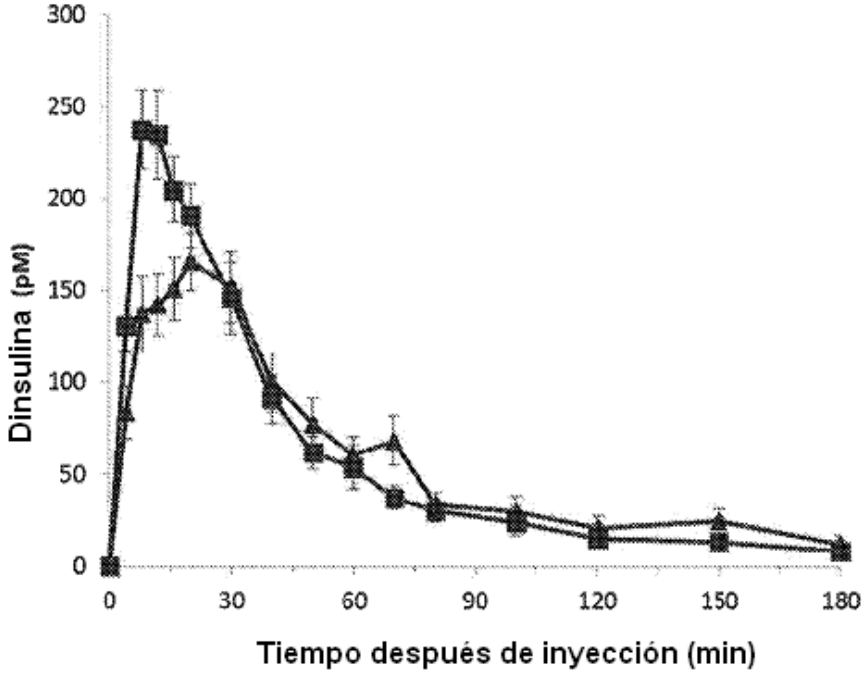


Figura 14

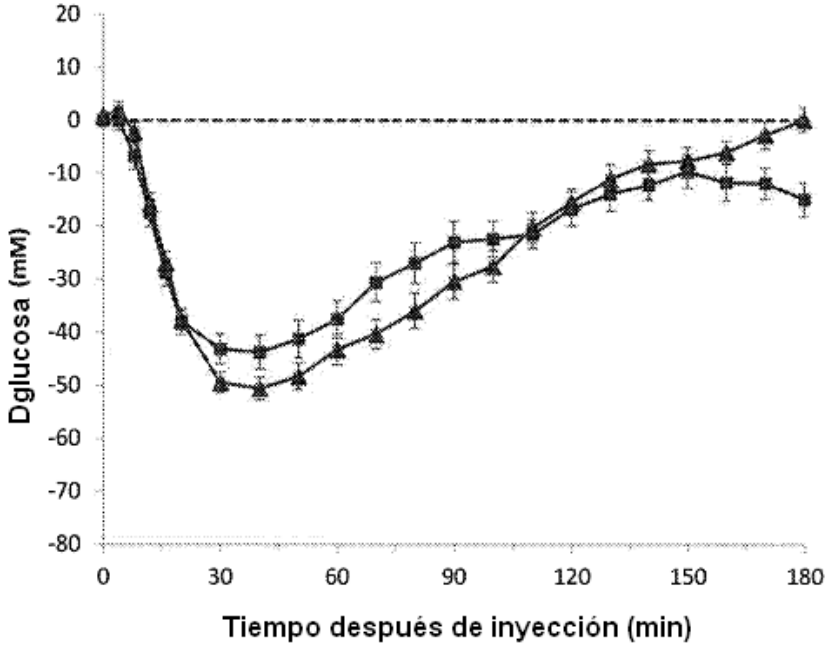


Figura 15

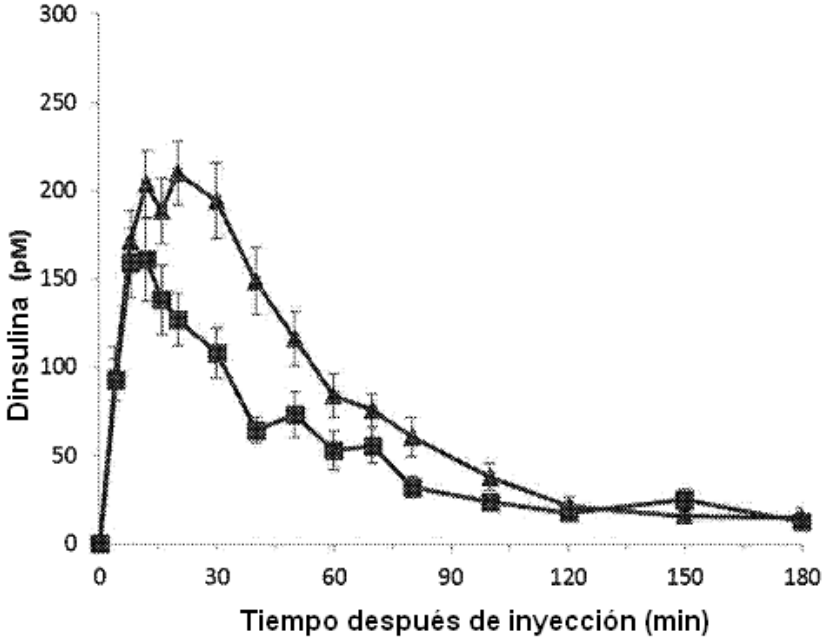


Figura 16

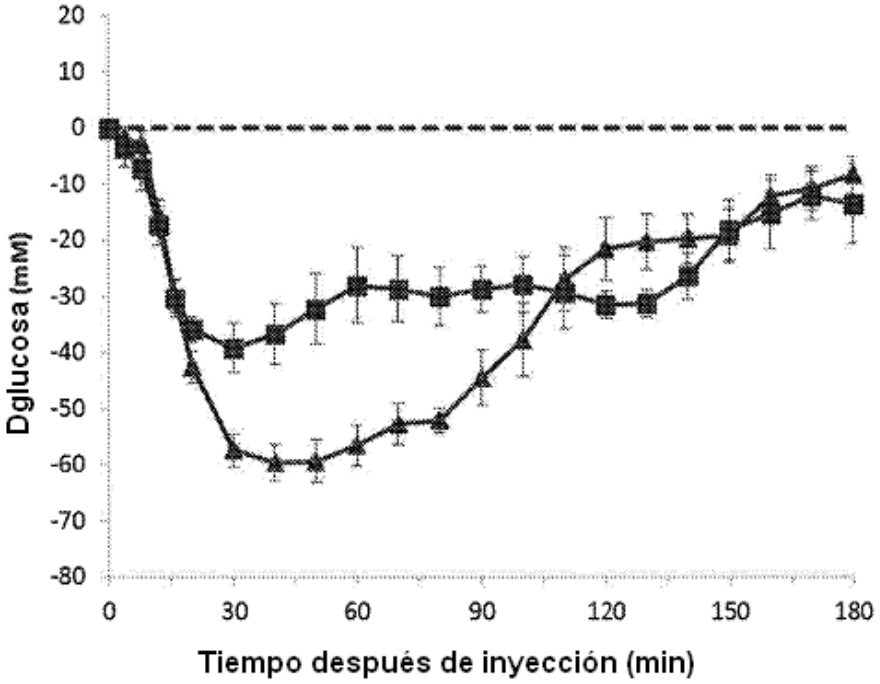


Figura 17

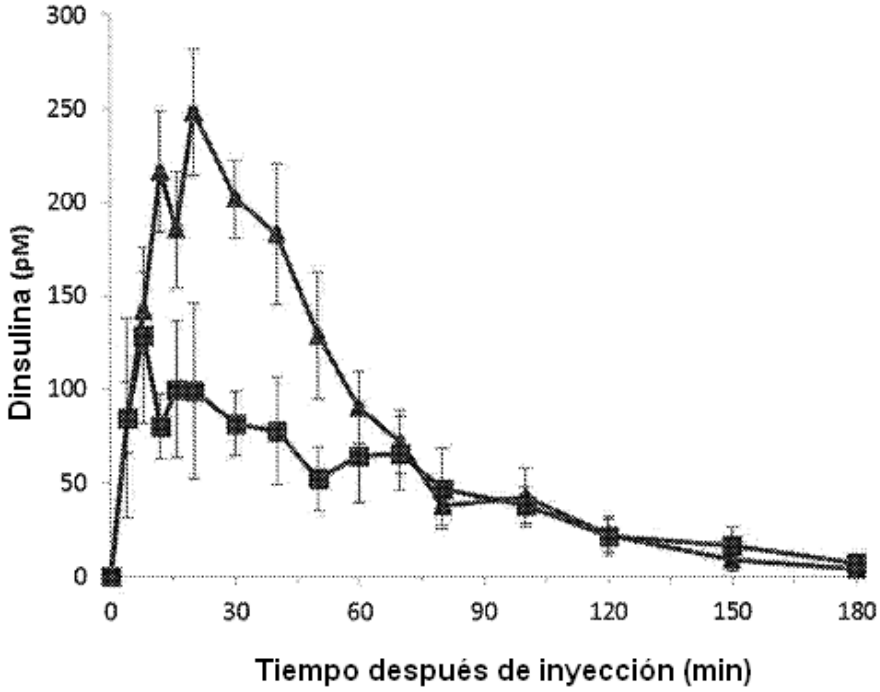


Figura 18

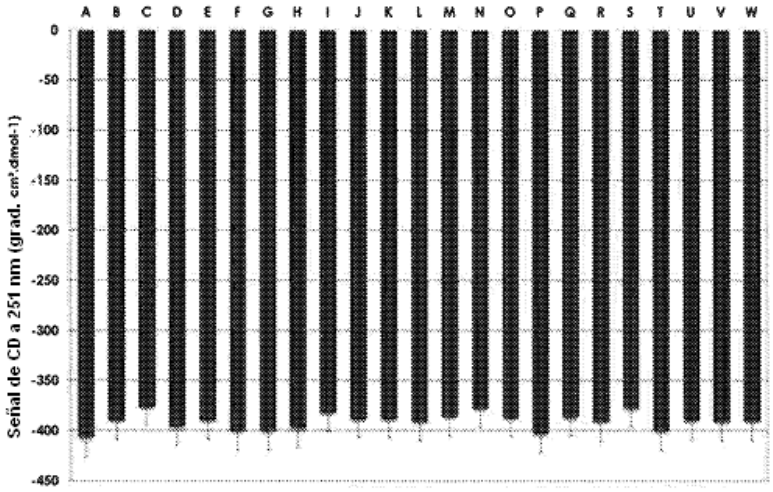


Figura 19

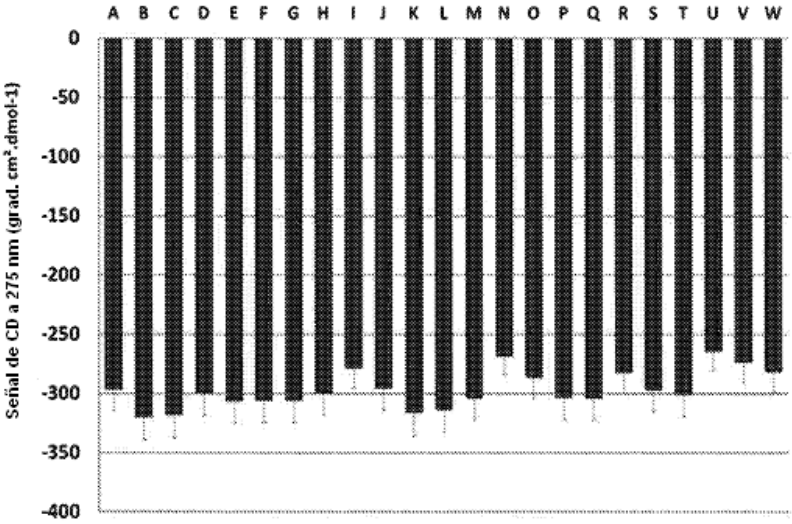


Figura 20

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 200839365 B **[0010]**
- WO 2010122385 A **[0012]**
- WO 2010122385 A1 **[0014]**
- US 2012094902 A1 **[0014]**
- FR 0702316 **[0401] [0404] [0406] [0408] [0410]**
- FR 2914305 **[0401] [0404] [0406] [0408] [0410]**
- FR 0901478 **[0403]**

Bibliografía no especificada en la descripción de la patente

- **BRANGE J. et al.** *Advanced Drug Delivery Review,* 1999, vol. 35, 307-335 **[0008]**
- **WUTS, PGM et al.** *Greene's Protective Groups in Organic Synthesls,* 2007 **[0362]**
- **SMOOT, JT et al.** *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry,* 2009, vol. 62, 162-250 **[0364]**
- **LINDHORST, TK.** *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry,* 2007, 157-208 **[0364]**