

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 903**

51 Int. Cl.:

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2010 PCT/US2010/026073**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10102020**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2010 E 10713742 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2403520**

54 Título: **Formulaciones de insulina para una rápida captación**

30 Prioridad:

03.03.2009 US 397219

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

11.09.2018

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**STEINER, SOLOMON, S.;
POHL, RODERIKE;
LI, MING y
HAUSER, ROBERT**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 680 903 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de insulina para una rápida captación

5 La invención está en el campo general de las formulaciones de insulina de suministro de fármacos de actuación rápida inyectables.

Antecedentes de la invención

10 ***Visión de conjunto de la diabetes***

15 La glucosa es un azúcar simple usado por todas las células del cuerpo para producir energía y soportar vida. Los seres humanos necesitan un nivel mínimo de glucosa en la sangre en todo momento para mantenerse con vida. La manera principal en que el cuerpo produce la glucosa en sangre es a través de la digestión de los alimentos. Cuando una persona no obtiene esta glucosa de la digestión de los alimentos, la glucosa se produce de las reservas del tejido y se libera por el hígado. Los niveles de glucosa del cuerpo están regulados por la insulina. La insulina es una hormona peptídica secretada naturalmente por el páncreas. La insulina ayuda a la glucosa a ingresar a las células del cuerpo para proporcionar una fuente vital de energía.

20 Cuando una persona sana comienza una comida, el páncreas libera un pico natural de insulina llamado liberación de insulina en la primera fase. Además de proporcionar suficiente insulina para procesar la glucosa que llega a la sangre por la digestión de la comida, la liberación de insulina en la primera fase actúa como una señal para que el hígado deje de producir glucosa mientras tiene lugar la digestión de la comida. Debido a que el hígado no produce glucosa y hay suficiente insulina adicional para procesar la glucosa de la digestión, los niveles de glucosa en sangre de las personas sanas se mantienen relativamente constantes y sus niveles de glucosa en sangre no aumentan demasiado.

30 La diabetes es una enfermedad caracterizada por niveles anormalmente altos de glucosa en sangre y niveles inadecuados de insulina. Hay dos tipos principales de diabetes: tipo 1 y tipo 2. En la diabetes de tipo 1, el cuerpo no produce insulina. En las fases tempranas de la diabetes tipo 2, aunque el páncreas produce insulina, o el cuerpo no produce la insulina en el momento adecuado o las células del cuerpo ignoran la insulina, una condición conocida como resistencia a la insulina.

35 Incluso antes de que aparezcan cualquier otro síntoma, uno de los primeros efectos de la diabetes tipo 2 es la pérdida de la liberación de insulina en la primera fase inducida por la comida. En ausencia de la liberación de insulina de la primera fase, el hígado no recibirá la señal para dejar de producir glucosa. Como resultado, el hígado continuará produciendo glucosa en un momento en que el cuerpo comienza a producir glucosa nueva a través de la digestión de la comida. Como resultado, el nivel de glucosa en sangre de los pacientes con diabetes aumenta demasiado después de comer, una condición conocida como hiperglucemia. La hiperglucemia hace que la glucosa se una de forma no natural a determinadas proteínas en la sangre, lo que interfiere con la capacidad de las proteínas para realizar su función normal de mantener la integridad de los vasos sanguíneos pequeños. Con la hiperglucemia que se produce después de cada comida, los pequeños vasos sanguíneos con el tiempo se rompen y gotean. Los efectos adversos a largo plazo de la hiperglucemia incluyen ceguera, pérdida de la función renal, daño de nervios y pérdida de la sensibilidad y mala circulación en la periferia, requiriendo potencialmente la amputación de las extremidades.

50 Entre dos y tres horas después de una comida, la glucosa en sangre de un diabético no tratado se vuelve tan elevada que el páncreas recibe una señal para secretar una cantidad desmesuradamente grande de insulina. En un paciente con diabetes tipo 2 temprana, el páncreas aún puede responder y secreta esta gran cantidad de insulina. Sin embargo, esto se produce en el momento en que la digestión casi ha terminado y los niveles de glucosa en sangre deberían comenzar a disminuir. Esta cantidad desmesuradamente grande de insulina tiene dos efectos perjudiciales. En primer lugar, impone una demanda extrema indebida a un páncreas que ya está comprometido, lo que puede conducir a su deterioro más rápido y, con el tiempo, hacer que el páncreas no pueda producir insulina. En segundo lugar, demasiada insulina después de la digestión conduce al aumento de peso, lo que puede exacerbar aún más la patología.

Tratamientos actuales para la diabetes y sus limitaciones

60 Debido a que los pacientes con diabetes tipo 1 no producen insulina, el tratamiento principal para la diabetes tipo 1 es la terapia diaria intensiva con insulina. El tratamiento de la diabetes tipo 2 generalmente comienza con el control de la dieta y el ejercicio. Aunque es útil a corto plazo, el tratamiento a través de la dieta y el ejercicio solo no es una solución eficaz a largo plazo para la gran mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2. Cuando la dieta y el ejercicio ya no son suficientes, el tratamiento comienza con diversos medicamentos orales sin insulina. Estos medicamentos orales actúan aumentando la cantidad de insulina producida por el páncreas, aumentando la sensibilidad de las células sensibles a la insulina, reduciendo la producción de glucosa del hígado o mediante una combinación de estos mecanismos. Estos tratamientos tienen una capacidad limitada para controlar eficazmente la enfermedad y

generalmente tienen efectos secundarios significativos, como aumento de peso e hipertensión. Debido a las limitaciones de los tratamientos sin insulina, muchos pacientes con diabetes tipo 2 se deterioran con el tiempo y con el tiempo requieren terapia con insulina para respaldar su metabolismo.

5 La terapia con insulina se ha usado durante más de 80 años para tratar la diabetes. Esta terapia generalmente implica la administración de varias inyecciones de insulina cada día. Estas inyecciones consisten en administrar una inyección basal de actuación prolongada una o dos veces por día y una inyección de insulina de actuación rápida en la comida. Aunque este régimen de tratamiento se acepta como eficaz, tiene limitaciones. En primer lugar, a los
10 los pacientes generalmente no les gusta inyectarse insulina por las molestias y el dolor de las agujas. Como resultado, los pacientes tienden a no cumplir adecuadamente con los regímenes de tratamiento prescritos y a menudo están medicados inadecuadamente.

Más importante aún, incluso cuando se administran adecuadamente, las inyecciones de insulina no replican el perfil natural de actuación en el tiempo de la insulina. En particular, el pico natural de la liberación de insulina en la primera fase en una persona sin diabetes da como resultado niveles de insulina en la sangre que aumentan a los pocos minutos de la entrada en la sangre de la glucosa de una comida. Por el contrario, la insulina inyectada ingresa a la sangre lentamente, con niveles máximos de insulina que se producen entre 80 y 100 minutos después de la inyección de insulina humana regular.
15

20 Una posible solución es la inyección de insulina directamente en la vena de pacientes diabéticos inmediatamente antes de comer. En estudios de inyecciones intravenosas de insulina, los pacientes mostraron un mejor control de su glucosa en sangre durante 3 a 6 horas después de la comida. Sin embargo, por diversas razones médicas, la inyección intravenosa de insulina antes de cada comida no es una terapia práctica.

25 Una de las mejoras clave en los tratamientos con insulina fue la introducción en la década de 1990 de análogos de insulina de actuación rápida, como insulina lispro (IL), insulina aspart (IA) e insulina glulisina (IG). Sin embargo, incluso con los análogos de insulina de actuación rápida, los niveles máximos de insulina normalmente se producen entre 50 y 90 minutos después de la inyección. Debido a que los análogos de insulina de actuación rápida no imitan adecuadamente la liberación de insulina de la primera fase, los diabéticos que usan terapia con insulina continúan teniendo niveles inadecuados de insulina presente al inicio de una comida y demasiada insulina presente entre las comidas. Este retraso en el suministro de insulina puede dar como resultado hiperglucemia poco después del inicio de la comida. Además, el exceso de insulina entre las comidas puede dar como resultado un nivel anormalmente bajo de glucosa en sangre conocido como hipoglucemia. La hipoglucemia puede dar como resultado pérdida de la agudeza mental, confusión, aumento de la frecuencia cardíaca, hambre, sudoración y desmayo. A niveles muy bajos de glucosa, la hipoglucemia puede dar como resultado pérdida de conciencia, coma e incluso la muerte. De acuerdo con la Asociación Estadounidense de Diabetes o ADA, los pacientes diabéticos que usan insulina tienen un promedio de 1,2 eventos hipoglucémicos graves por año, muchos de los cuales requieren visitas a la sala de emergencia por los pacientes.
30
35

40 Debido a que el curso temporal del suministro de insulina a la sangre desempeña un papel tan importante en el control global de la glucosa, existe una necesidad significativa de insulina, insulina inyectable, que llegue a la sangre más rápidamente que los análogos de insulina de actuación rápida.

45 Por lo tanto, es un objetivo de la invención proporcionar composiciones de insulina inyectables de actuación rápida con una estabilidad mejorada y un inicio de acción rápido.

Sumario de la invención

50 Las formulaciones de insulina inyectables con una estabilidad mejorada y un inicio de actuación rápido se describen en el presente documento. Las formulaciones pueden ser para la administración subcutánea, intradérmica o intramuscular. En la realización preferente, las formulaciones se administran por inyección subcutánea. Las formulaciones contienen insulina en combinación con un quelante y un agente de disolución, y opcionalmente excipientes adicionales. En la realización preferente, la formulación contiene insulina humana, un quelante de cinc tal como EDTA y un agente de disolución tal como ácido cítrico o una sal del mismo tal como citrato de sodio. Estas
55 formulaciones se absorben rápidamente en el torrente sanguíneo cuando se administran por inyección subcutánea. Los ejemplos demuestran que uno puede aumentar el pH a pH fisiológico y aún obtener la disolución y la captación rápida de la insulina.

60 En una realización, la insulina se proporciona como un polvo seco en un vial estéril. Esto se mezcla con un diluyente que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua, y opcionalmente un quelante de cinc tal como EDTA y/o un agente de disolución tal como ácido cítrico poco antes o en el momento de la administración. En otra realización, la insulina, generalmente a un pH de aproximadamente 4, se almacena como una mezcla congelada, lista para usar al descongelarse. En la realización preferente, la insulina se proporciona como una solución acuosa a pH 7, que se almacena a 4 °C.
65

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema tridimensional de insulina que muestra cargas superficiales expuestas y superpuestas con moléculas ("agentes quelantes y de disolución") del tamaño adecuado para enmascarar la

5

carga. La Figura 2 es un diagrama esquemático del dispositivo 10 transwell usado para medir la absorción de insulina desde una cámara donadora 12 a través de 4-5 capas de células epiteliales orales inmortalizadas 14 en un filtro 16 de 0,1 micrómetros en una cámara receptora 18.

10

Las Figuras 3a y 3b son gráficos que comparan el transporte de insulina *in vitro* (insulina acumulada en microunidades) a través de células epiteliales orales en el sistema transwell de la Figura 2, con y sin 0,45 mg de EDTA/ml, en función del ácido seleccionado como agente de disolución. EDTA fue constante a 0,45 mg/ml mientras que las concentraciones de ácido se variaron de la siguiente manera: Figura 3a, ácido aspártico (0,47 mg/ml), ácido glutámico (0,74 mg/ml), ácido succínico (0,41 mg/ml), ácido adípico (0,73 mg/ml) y ácido cítrico (0,29 mg/ml y 0,56 mg/ml), intervalo de pH 3,2-3,8. Figura 3b, maleico (0,32 mg/ml), ácido fumárico (1,28 mg/ml) y ácido oxálico (0,32 mg/ml), intervalo de pH 2-3. Se seleccionaron dos períodos de tiempo (10 y 30 minutos) para el análisis comparativo. Los resultados son la media más o menos del error estándar medido, $n = 4$.

15

Las Figuras 4a y 4b son gráficos de transporte de insulina *in vitro* (insulina acumulada en microunidades) a través de células epiteliales orales en el sistema transwell que se muestra en la Figura 2, que comparan diferentes agentes de disolución, con y sin 0,56 mg EDTA/ml y ácidos en las siguientes concentraciones equimolares ($1,50 \times 10^{-3}$ mol): ácido aspártico (0,20 mg/ml), ácido glutámico (0,22 mg/ml) y ácido cítrico (0,29 mg/ml) (Figura 4a) y ácido cítrico a 1,80 mg/ml (Figura 4b). Se seleccionaron dos períodos de tiempo (10 y 30 minutos) para el análisis comparativo.

20

La Figura 5 es un gráfico del transporte de insulina *in vitro* a través de células epiteliales orales usando el sistema transwell de la Figura 2 para comparar la eficacia de diferentes quelantes. La Figura 5 es un gráfico del transporte de insulina (1 mg/ml) que se midió (insulina acumulada, micromoles) de una solución que contiene ácido glutámico, ácido cítrico o HCl a la que se añadieron diferentes quelantes a la misma concentración molar ($4,84 \times 10^{-3}$ mol) a través de células epiteliales orales. Los quelantes no eran quelantes (control), EDTA, EGTA, DMSA, CDTA y TSC.

25

La Figura 6 es un gráfico del efecto farmacodinámico *in vivo* de la insulina preparada con ácido cítrico y EDTA (12 U) en personas humanas, en comparación con IL (12 U) y RHI (12 U), medido como velocidad de infusión media de glucosa (GIR)/kg.

30

La Figura 7 es un gráfico del efecto farmacodinámico *in vivo* de la insulina preparada con ácido cítrico y EDTA en seres humanos, en comparación con RHI, concentración de insulina (microunidades/ml) a lo largo del tiempo (minutos). Valores medios (\pm ETM, $n = 10$). La dosis de insulina fue de 12 U/sujeto.

35

La Figura 8 es un gráfico de la farmacodinámica *in vivo* de la insulina preparada con ácido cítrico y EDTA en 16 pacientes diabéticos tipo 2; en comparación con RHI e IL, representando la glucosa en sangre (mg/dl) a lo largo del tiempo (minutos). La pauta usada en el ensayo del paciente fue específica del paciente, ajustada para cada paciente basándose en su terapia de insulina actual.

40

La Figura 9A es un gráfico de los coeficientes de sedimentación de RHI a concentraciones de 0,17, 0,51, 1,68 y 3,62 mg/ml.

40

La Figura 9B es un gráfico de los coeficientes de sedimentación de IL a concentraciones de 0,15, 0,56, 1,75 y 3,59 mg/ml.

45

La Figura 9C es un gráfico de los coeficientes de sedimentación de IA a concentraciones de 0,16, 0,56, 1,66 y 3,56 mg/ml.

45

La Figura 9D es un gráfico de los coeficientes de sedimentación de CE100-4 a concentraciones de 0,15, 0,55, 1,72 y 3,48 mg/ml.

50

La Figura 10A es un gráfico de las distribuciones $c(s)$ normalizadas a la concentración de carga para los coeficientes de sedimentación de RHI a concentraciones de 0,18, 0,55 y 1,72 mg/ml.

50

La Figura 10B es un gráfico de las distribuciones $c(s)$ normalizadas a la concentración de carga para los coeficientes de sedimentación de IL a concentraciones de 0,17, 0,57 y 1,82 mg/ml.

50

La Figura 10C es un gráfico de las distribuciones $c(s)$ normalizadas a la concentración de carga para los coeficientes de sedimentación de IA a concentraciones de 0,19, 0,54 y 1,84 mg/ml.

55

La Figura 10D es un gráfico de las distribuciones $c(s)$ normalizadas a la concentración de carga para los coeficientes de sedimentación de CE100-4 a concentraciones de 0,18, 0,40 y 0,84 mg/ml.

55

La Figura 11 es un gráfico de las distribuciones $c(s)$ normalizadas a la concentración de carga para los coeficientes de sedimentación de la insulina de control pH 7 a concentraciones de 0,18, 0,57, 1,74 y 3,52 mg/ml.

55

La Figura 12 es un gráfico del tamaño medio de partículas de insulina (nm) en función de la dilución para CE 100-4, CE 100-7 y CES 100-7.

60

La Figura 13 es un gráfico de la concentración de insulina (μ unidades/ml) por ELISA a lo largo del tiempo (minutos) en cerdos miniatura diabéticos.

60

Descripción detallada de la invención

Las formulaciones de insulina de insulina humana inyectable descritas en el presente documento se administran inmediatamente antes de una comida o al final de una comida. En la realización preferente, la formulación combina insulina humana recombinante con ingredientes específicos generalmente considerados seguros por la FDA. La

65

formulación está diseñada para ser absorbida en la sangre más rápido que los análogos de insulina de actuación rápida actualmente comercializados. Una de las características clave de la formulación de la insulina es que permite que la insulina se disocie, o se separe, de la forma de insulina de seis moléculas o hexámera a la forma monomérica o dimérica de la insulina y disuade la reasociación a la forma hexamérica. Se cree que al favorecer la forma

5 monomérica o dimérica, esta formulación permite un suministro más rápido de insulina en la sangre ya que el cuerpo humano requiere que la insulina esté en forma de una sola molécula antes de que pueda ser absorbida en el cuerpo para producir sus efectos biológicos deseados. La mayoría de la insulina humana que se comercializa para inyección tiene forma hexamérica. Esto hace que sea más difícil que el cuerpo absorba, ya que el hexámero de insulina primero debe disociarse para formar dímeros y luego monómeros.

10 I. Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, "insulina" se refiere a insulina o análogos de insulina humana o no humana, recombinante, purificada o sintética, a menos que se especifique otra cosa.

15 Tal como se usa en el presente documento, "insulina humana" es la hormona peptídica humana secretada por el páncreas, ya sea aislada de una fuente natural o producida por microorganismos genéticamente alterados. Tal como se usa en el presente documento, "insulina no humana" es lo mismo que la insulina humana pero de una fuente animal tal como cerdo o vaca.

20 Tal como se usa en el presente documento, un análogo de insulina es una insulina alterada, diferente de la insulina secretada por el páncreas, pero aún disponible para el cuerpo para realizar la misma acción que la insulina natural. Mediante la ingeniería genética del ADN subyacente, la secuencia de aminoácidos de la insulina puede modificarse para alterar sus características de ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción). Ejemplos incluyen

25 insulina lispro, insulina glargina, insulina aspart, insulina glulisina, insulina detemir. La insulina también se puede modificar químicamente, por ejemplo, mediante acetilación. Tal como se usa en el presente documento, los análogos de insulina humana son insulina humana alterada que puede realizar la misma actuación biológica que la insulina humana.

30 Tal como se usa en el presente documento, un "quelante" o "agente quelante", se refiere a un compuesto químico que tiene la capacidad de formar uno o más enlaces a iones de cinc. Los enlaces son normalmente enlaces iónicos o de coordinación. El quelante puede ser un compuesto inorgánico u orgánico. Un complejo de quelato es un complejo en el que el ion metálico está unido a dos o más átomos del agente quelante.

35 Tal como se usa en el presente documento, un "agente solubilizante", es un compuesto que aumenta la solubilidad de los materiales en un disolvente, por ejemplo, insulina en una solución acuosa. Ejemplos de agentes solubilizantes incluyen tensioactivos (TWEENS®); disolvente, tales como etanol; compuestos formadores de micelas, tales como monoestearato de oxietileno; y agentes modificadores del pH.

40 Tal como se usa en el presente documento, un "agente de disolución" es un ácido o una sal que, cuando se añade a insulina y EDTA, potencia el transporte y la absorción de insulina en relación con HCl y EDTA al mismo pH, medido usando el ensayo de placa transwell de células epiteliales descrito en los ejemplos a continuación. HCl no es un agente de disolución pero puede ser un agente solubilizante. El ácido cítrico y el citrato de sodio son agentes de disolución cuando se miden en este ensayo. Se cree que esto se logra al menos en parte mediante el

45 enmascaramiento de las cargas en la insulina, algunas de las cuales están expuestas durante la disociación del hexámero.

Tal como se usa en el presente documento, un "excipiente" es una sustancia inactiva distinta de un quelante o un agente de disolución, usado como un vehículo para la insulina o usado para ayudar al proceso mediante el cual se

50 fabrica un producto. En dichos casos, la sustancia activa se disuelve o se mezcla con un excipiente.

Tal como se usa en el presente documento, un "pH fisiológico" está entre 6,8 y 7,6, preferentemente entre 7 y 7,5, lo más preferentemente de aproximadamente 7,4.

55 Tal como se usa en el presente documento, VIAJECT™ es la marca comercial de una insulina humana recombinante formulada con un agente de disolución tal como ácido cítrico y un quelante tal como EDTA. *Viaject 25 U/ml* (CE 25-4) contiene 25 U/ml de insulina humana recombinante regular, 1,8 mg/ml de ácido cítrico, 1,8 mg/ml de EDTA disódico, NaCl al 0,82 % (isotonicidad) y 3 mg/ml de m-cresol. Se proporciona como una solución acuosa que se almacena congelada, o en un kit de dos partes que consiste en insulina en polvo seco y diluyente, al menos uno

60 de los cuales contiene ácido cítrico y EDTA. El pH de la mezcla reconstituida y la solución congelada es de aproximadamente pH 4. *Viaject 100U/ml* (CE100-4) contiene 100 U/ml de insulina humana recombinante regular, 1,8 mg/ml de ácido cítrico, 1,8 mg/ml de EDTA disódico, 22 mg/ml de glicerina, 3 mg/ml de m-cresol. Esto también se proporciona como una solución acuosa congelada o un kit de dos partes que consiste en insulina en polvo seco y diluyente. El pH de la mezcla reconstituida y la solución congelada es de aproximadamente 4. *Viaject 100 U/ml* (CE

65 100-7) contiene 100 U/ml de insulina humana recombinante regular, 1,8 mg/ml de ácido cítrico, 1,8 mg/ml de EDTA disódico, 22 mg/ml de glicerina, 3 mg/ml de m-cresol. Esto se proporciona como una solución acuosa que tiene un

pH de aproximadamente 7,4, que se puede almacenar a 4 °C. *VIAject con sales ácidas* (CSE 100-7) se prepara añadiendo 1,8 mg/ml de EDTA y citrato trisódico al agua, luego añadiendo 100 U/ml de insulina, reduciendo el pH a 6 y luego elevando el pH a 7,4.

5 Formulaciones

Las formulaciones incluyen insulina, un quelante y un(os) agente(s) de disolución y, opcionalmente, uno o más excipientes adicionales. En la realización preferente, las formulaciones son adecuadas para la administración subcutánea y se absorben rápidamente en el tejido graso subcutáneo. La elección del agente de disolución y el quelante, la concentración del agente de disolución y del quelante, y el pH al que se ajusta la formulación, tienen todos un efecto profundo sobre la eficacia del sistema. Aunque muchas combinaciones tienen eficacia, la realización preferente se elige por muchas razones, que incluyen seguridad, estabilidad, perfil regulador y rendimiento.

En la realización preferente, al menos uno de los ingredientes de la formulación se selecciona para enmascarar las cargas en el agente activo. Esto puede facilitar el transporte transmembrana de la insulina y así aumentar tanto el inicio de actuación como la biodisponibilidad de la insulina. Los ingredientes también se seleccionan para formar composiciones que se disuelven rápidamente en medio acuoso. Preferentemente, la insulina se absorbe y se transporta al plasma rápidamente, lo que da como resultado un inicio de actuación rápido (preferentemente que comienza dentro de aproximadamente 5 minutos después de la administración y que alcanza un máximo a aproximadamente 15-30 minutos después de la administración).

El quelante, tal como EDTA, quela el cinc en la insulina, lo que elimina el cinc de la solución de insulina. Esto hace que la insulina obtenga su forma dimérica y monomérica y retarda el reensamblaje en el estado hexámero. Los estudios descritos en los ejemplos indican que el tamaño global del hexámero disociador es mayor que el hexámero de insulina complejado con zinc, que luego forma unidades más pequeñas. Dado que los hexámeros, dímeros y monómeros existen en un equilibrio impulsado por la concentración, a medida que los monómeros se absorben, se crean más monómeros. Por tanto, a medida que los monómeros de insulina se absorben a través del tejido subcutáneo, los dímeros adicionales se disimulan para formar más monómeros. La forma monomérica completamente disociada tiene un peso molecular que es inferior a un sexto del peso molecular de la forma hexamérica, aumentando así notablemente tanto la velocidad como la cantidad de absorción de insulina. En la medida en que el quelante (tal como EDTA) y/o el agente de disolución (tal como ácido cítrico) se unen a la insulina, se cree que enmascara la carga en la insulina, lo que facilita su transporte transmembrana y aumenta así el inicio de actuación y biodisponibilidad para la insulina.

35 Insulina

La insulina puede ser recombinante o purificada a partir de una fuente natural. La insulina puede ser humana o no humana. Se prefiere humana. En la realización más preferente, la insulina es insulina humana recombinante. La insulina humana recombinante está disponible en varias fuentes. La insulina también puede ser un análogo de insulina que puede estar basado en la secuencia de aminoácidos de la insulina humana pero que tiene una o más diferencias de aminoácidos, o una insulina químicamente modificada o un análogo de insulina.

Las pautas de la insulina dependen de su biodisponibilidad y del paciente a tratar. La insulina generalmente se incluye en un intervalo de dosificación de 1,5-100 UI, preferentemente 3-50 UI por dosis humana. Normalmente, la insulina se proporciona en viales de 100 UI.

Agentes de disolución

Determinados ácidos, o sus sales, parecen enmascarar las cargas en la insulina, lo que potencia la captación y el transporte, como se muestra en la Figura 1. Aquellos ácidos que son eficaces como agentes de disolución incluyen ácido acético, ácido ascórbico, ácido cítrico, glutámico, aspártico, succínico, fumárico, maleico y adípico, en relación con el ácido clorhídrico, como se midió en el ensayo transwell descrito en los ejemplos a continuación. Por ejemplo, si el agente activo es insulina, un agente de disolución preferente es ácido cítrico. El ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio son agentes preferentes para el ajuste de pH. El HCl puede usarse en combinación con cualquiera de las formulaciones, pero no es un agente de disolución. Las sales de los ácidos incluyen acetato de sodio, ascorbato, citrato, glutamato, aspartato, succinato, fumarato, maleato y adipato. Las sales de ácidos orgánicos se pueden preparar usando diversas bases que incluyen, pero sin limitación, hidróxidos metálicos, óxidos metálicos, carbonatos y bicarbonatos metálicos, aminas metálicas, así como bases de amonio, tales como cloruro de amonio, carbonato de amonio, etc. Los metales adecuados incluyen iones metálicos monovalentes y polivalentes. Ejemplos de iones metálicos incluyen los metales del grupo I, tales como litio, sodio y potasio; metales del grupo II, tales como bario, magnesio, calcio y estroncio; y metaloides como el aluminio. Los iones metálicos polivalentes pueden ser deseables para ácidos orgánicos que contienen más de un grupo ácido carboxílico ya que estos iones pueden formar complejos simultáneamente con más de un grupo ácido carboxílico.

El intervalo del agente de disolución corresponde a una cantidad eficaz de ácido cítrico en combinación con insulina y EDTA de entre $9,37 \times 10^{-4}$ M a $9,37 \times 10^{-2}$ M de ácido cítrico.

Quelantes

- En la realización preferente, un quelante de cinc se mezcla con la insulina. El quelante puede ser iónico o no iónico. Los quelantes adecuados incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), EGTA, ácido algínico, ácido alfa lipoico, 5 ácido dimercaptosuccínico (DMSA), CDTA (ácido 1,2-diaminociclohexanotetraacético), citrato trisódico (TSC). El ácido clorhídrico se usa conjuntamente con el TSC para ajustar el pH, y en el proceso da lugar a la formación de ácido cítrico, que es un agente de disolución.
- En la realización preferente, el quelante es EDTA. El quelante captura el cinc de la insulina, favoreciendo así la forma dimérica de la insulina sobre la forma hexamérica y facilitando la absorción de la insulina por los tejidos que rodean el sitio de administración (p. ej., mucosa o tejido graso). Además, el quelante de hidrógeno se puede unir al agente activo, ayudando así a enmascarar la carga de los monómeros de insulina y facilitando el transporte transmembrana de los monómeros de insulina.
- 15 El intervalo del quelante corresponde a una cantidad eficaz de EDTA en combinación con insulina y ácido cítrico de entre $2,42 \times 10^{-4}$ M a $9,68 \times 10^{-2}$ M de EDTA.

Excipientes

- 20 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de un modo convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables, que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Las formulaciones de fármacos se tratan en, por ejemplo, Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1975), y Liberman, HA y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, N.Y. (1980).

- En la realización preferente, se incluyen uno o más agentes solubilizantes con el agente de insulina para promover la disolución rápida en medios acuosos. Los agentes solubilizantes adecuados incluyen agentes humectantes tales como polisorbatos, glicerina y poloxámeros, tensioactivos no iónicos e iónicos, ácidos y bases de alimentos (p. ej., bicarbonato de sodio) y alcoholes, y sales tampón para el control del pH.

- Los estabilizadores se usan para inhibir o retardar las reacciones de descomposición del fármaco que incluyen, a modo de ejemplo, reacciones oxidativas. Se pueden usar varios estabilizadores. Los estabilizadores adecuados incluyen polisacáridos, tales como celulosa y derivados de celulosa, y alcoholes simples, tales como glicerol; 35 agentes bacteriostáticos tales como fenol, m-cresol y metilparabeno; agentes isotónicos, tales como cloruro de sodio, glicerol y glucosa; lecitinas, tales como ejemplo lecitinas naturales (p. ej., lecitina de yema de huevo o lecitina de soja) y lecitinas sintéticas o semisintéticas (p. ej., dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina o diestearoilfosfatidilcolina; ácidos fosfatídicos; fosfatidiletanolaminas; fosfatidilserinas tales como diestearoil-fosfatidilserina, dipalmitoilfosfatidilserina y diaraquidoilfosfatidilserina; fosfatidilgliceroles; fosfatidilinositoles; cardiolipinas; 40 esfingomielinas. En un ejemplo, el estabilizador puede ser una combinación de glicerol, agentes bacteriostáticos y agentes isotónicos.

II. Métodos de preparación de las formulaciones

- 45 La formulación inyectable contiene insulina, un quelante y un agente de disolución. En una realización preferente, la formulación inyectable contiene insulina, EDTA, ácido cítrico, solución salina y/o glicerina.

- En una realización, la formulación inyectable subcutánea se produce mezclando solución salina y glicerina, ácido cítrico y EDTA para formar una solución y esterilizar la solución (denominada "diluyente"). La insulina se añade por separado al agua estéril para formar una solución, se filtra y se coloca una cantidad designada en cada una de varias botellas de inyección estériles separadas. La solución de insulina se liofiliza para formar un polvo y se debe almacenar por separado del diluyente para conservar su estabilidad. Antes de la administración, el diluyente se añade a la botella de inyección de insulina. Después de que la cantidad predeterminada de insulina se inyecta por vía subcutánea en el paciente, la solución de insulina restante puede almacenarse, preferentemente por 55 refrigeración.

En otra realización, la insulina se combina con el diluyente, pH 4, se filtra estérilmente en viales o cartuchos de inyección de múltiples usos y se congela antes de su uso.

- 60 En una realización preferente, la insulina se prepara como una solución acuosa, a pH 7,0, en viales y cartuchos y se mantiene a 4 °C.

III. Métodos de uso de las formulaciones

- 65 Las formulaciones pueden administrarse por inyección subcutánea o intramuscular. La formulación está diseñada para ser rápidamente absorbida y transportada al plasma para un suministro sistémico.

Las formulaciones que contienen insulina como agente activo pueden administrarse a un paciente diabético tipo 1 o tipo 2 antes o durante una comida. Debido a la rápida absorción, las composiciones pueden interrumpir la conversión de glucógeno a glucosa en el hígado, evitando así la hiperglucemia, la principal causa de complicaciones de la diabetes y el primer síntoma de la diabetes tipo 2. Las inyecciones subcutáneas convencionales actualmente

5 disponibles de insulina humana deben administrarse aproximadamente de media a una hora antes de comer para proporcionar un efecto menor al deseado, debido a que la insulina se absorbe demasiado lentamente para interrumpir la producción de glucosa en el hígado. Además, si se administra lo suficientemente temprano en la progresión de la enfermedad, las composiciones de insulina subcutánea pueden reducir o detener la progresión de la diabetes tipo 2.

10 La ventaja de la formulación de pH bajo es que se puede mezclar con BYETTA® (exenatida), SYMLIN® (acetato de pramlintida) y LANTUS® (análogo de insulina de actuación prolongada), ninguno de los cuales se puede mezclar con otros tipos de insulinas disponibles en el mercado debido a la inmiscibilidad y la precipitación.

15 La ventaja de la insulina de mayor pH es que es más estable durante el almacenamiento que las insulinas a pH más bajo.

La presente invención se entenderá mejor por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. Las siguientes insulinas se usaron en los ejemplos.

20 HUMULIN® (RHI) es insulina humana recombinante. Cada mililitro contiene 100 unidades de insulina humana recombinante regular, m-cresol al 0,22 %, glicerina al 1,4-1,8 %, pH 7. Esto está disponible en el mercado de varias fuentes.

25 HUMALOG® de Eli Lilly (IL), inyección de insulina lispro, es un análogo de insulina humana recombinante que es un análogo de insulina humana Lys (B28), Pro (B29), creado cuando los aminoácidos en las posiciones 28 y 29 en la cadena B de insulina están invertidos. Cada mililitro de inyección de IL contiene 100 unidades de insulina lispro, 16 mg de glicerina, 1,88 mg de fosfato de sodio dibásico, 3,15 mg de metacresol, contenido de óxido de cinc ajustado para proporcionar 0,0197 mg de iones de cinc, trazas de fenol y agua para inyección. La insulina lispro tiene un pH de 7,0 a 7,8. Puede añadirse ácido clorhídrico al 10 % y/o hidróxido de sodio al 10 % para ajustar el pH. Una unidad de IL tiene el mismo efecto hipoglucemiante que una unidad de insulina humana regular, pero su efecto es más rápido y de menor duración.

30 NOVOLOG® (IA) es un análogo de insulina recombinante disponible en Novo Nordisk A/S. El análogo contiene una única sustitución del aminoácido prolina por ácido aspártico en la posición B28, y se produce mediante levadura recombinante. Se proporciona en una solución acuosa estéril, que contiene 100 unidades de insulina aspart/ml, 16 mg/ml de glicerina, 1,50 mg de fenol/ml, 1,72 mg de metacresol/ml, 19,6 mg de cinc/ml, 1,25 mg de hidrogenofosfato disódico dihidrato/ml, 0,58 mg de cloruro de sodio/ml, que tiene un pH de 7,2 a 7,6, ajustado con HCl o NaOH al 10 %.

40 VIAJECT™ es una insulina humana recombinante formulada con ácido cítrico y EDTA. *Viaject 25 U/ml* (CE 25-4) contiene 25 U/ml de insulina humana recombinante regular, 1,8 mg/ml de ácido cítrico, 1,8 mg/ml de EDTA disódico, NaCl al 0,82 % (isotonicidad) y 3 mg/ml de m-cresol. Se proporciona como una solución acuosa que se almacena congelada, o en un kit de dos partes que consiste en insulina en polvo seco y diluyente, al menos uno de los cuales contiene ácido cítrico y EDTA. El pH de la mezcla reconstituida y la solución congelada es de aproximadamente pH 4. El polvo reconstituido es el que se usó en los ejemplos. *Viaject 100U/ml* (CE100-4) contiene 100 U/ml de insulina humana recombinante regular, 1,8 mg/ml de ácido cítrico, 1,8 mg/ml de EDTA disódico, 22 mg/ml de glicerina, 3 mg/ml de m-cresol. Esto también se proporciona como una solución acuosa congelada o un kit de dos partes que consiste en insulina en polvo seco y diluyente. El pH de la mezcla reconstituida y la solución congelada es de aproximadamente 4. Solamente se usó la solución acuosa congelada en los datos de la centrifuga analítica y malvern. *Viaject 100 U/ml* (CE 100-7) contiene 100 U/ml de insulina humana recombinante regular, 1,8 mg/ml de ácido cítrico, 1,8 mg/ml de EDTA disódico, 22 mg/ml de glicerina, 3 mg/ml de m-cresol. Esto se proporciona como una solución acuosa que tiene un pH de aproximadamente 7,4, que se puede almacenar a 4 °C. Esto se usó en el estudio porcino. *Viaject con sales ácidas* (CSE 100-7) se prepara con 1,8 mg/ml de EDTA y citrato trisódico en agua, con 100 U/ml de insulina y glicerina (22 mg/ml). El pH final se ajusta a 7,4 con hidróxido de sodio. Esto se usó en el ejemplo final para la información de Malvern.

Ejemplo 1: Comparación *in vitro* de la captación y el transporte de insulina usando el ensayo Transwell de células epiteliales en función del agente de disolución.

60 **Materiales y métodos**

Las células epiteliales orales se cultivaron en insertos transwell durante dos semanas hasta que se formaron múltiples capas de células (4-5 capas), como se muestra en la Figura 2. Los estudios de transporte se llevaron a cabo añadiendo las soluciones adecuadas al pocillo donador y extrayendo muestras del pocillo receptor después de 10 minutos. Las soluciones consistieron en agua, +/- EDTA (0,45 mg/ml), NaCl (0,85 % p/v), 1 mg/ml de insulina y

una cantidad suficiente de ácido para mantener el pH a 3,8. Las cantidades de insulina en los pocillos receptores se analizaron usando ELISA.

Resultados

5 Los resultados mostrados en las Figuras 3a y 3b demuestran que algunos ácidos son más eficaces para potenciar la captación y el transporte de insulina a través de las células epiteliales. Estos pueden analizarse fácilmente y compararse con los resultados obtenidos usando HCl, proporcionando así un patrón contra el que cualquier ácido puede analizarse y determinarse como un agente de disolución (es decir, potenciar la captación y el transporte en relación con el HCl) o no.

Los resultados obtenidos con ácidos con un intervalo de pH de 3,2-3,8 se agrupan en la Figura 3a. Los ácidos más fuertes (pH <3) se agrupan en la Figura 3b.

15 Los resultados establecen que la elección del ácido con la misma concentración de quelante tiene un efecto sustancial sobre el transporte de insulina a través del cultivo celular. El ácido preferente es ácido cítrico.

Ejemplo 2: Comparación *in vitro* de la captación y el transporte de insulina usando el ensayo Transwell de células epiteliales en función de la concentración del agente de disolución.

Materiales y métodos

Los materiales y métodos del Ejemplo 1 se usaron con diferentes concentraciones de reactivos. En el estudio, se añadieron concentraciones equimolares de ácido y quelante. Las soluciones consistieron en agua, +/- EDTA (0,56 mg/ml), NaCl (0,85 % p/v), 1 mg/ml de insulina y un ácido: ácido aspártico (0,20 mg/ml), ácido glutámico (0,22 mg/ml) o ácido cítrico (0,20 mg/ml). El ácido cítrico se analizó a una concentración mayor de 1,8 mg/ml con y sin quelante. Estos datos se muestran en dos períodos de tiempo, 10 y 30 minutos, después de la dosificación de las cámaras donadoras de células.

Resultados

Los resultados obtenidos con ácido aspártico (0,20 mg/ml), ácido glutámico (0,22 mg/ml) o ácido cítrico (0,29 mg/ml) se muestran en la Figura 4a. En este caso, no se observó ninguna diferencia significativa con la adición del quelante.

35 Por el contrario, el estudio que usa una mayor concentración de ácido cítrico, a 1,80 mg/ml, muestra un aumento significativo (comparación de la prueba t, de un lado) al añadir el quelante a la solución. Véase la Figuras 4b. Esto demuestra que la concentración de ambos componentes es importante para optimizar la captación y el transporte.

Ejemplo 3: Comparación *in vitro* de la captación y el transporte de insulina usando el ensayo Transwell de células epiteliales en función del quelante

Materiales y métodos

45 Las células epiteliales orales se cultivaron en insertos transwell durante dos semanas hasta que se formaron múltiples capas de células (4-5 capas). Los estudios de transporte se llevaron a cabo añadiendo las soluciones adecuadas al pocillo donador y extrayendo muestras del pocillo receptor después de 10, 20 y 30 minutos.

Las soluciones se prepararon inmediatamente antes de los experimentos transwell de la siguiente manera: Se disolvió ácido cítrico a 1,8 mg/ml en solución salina al 0,85 % p/v y luego se añadió uno de los siguientes quelantes a esta solución a la concentración mostrada: EDTA a 1,80 mg/ml, EGTA a 1,84 mg/ml, DMSA a 0,88 mg/ml y TSC a 1,42 mg/ml. Debido a que se usó CDTA en su forma líquida, se añadió ácido cítrico directamente al CDTA. En cada uno de estos casos, la concentración de quelante fue constante a $4,84 \times 10^{-3}$ moles.

55 A continuación se añadió insulina a 1 mg/ml y el pH se reajustó a 3,8 si fuera necesario. Un conjunto de control de muestras que usan solo HCl para el ajuste del pH se incluye para la comparación. Los experimentos de Transwell se realizaron añadiendo 0,2 ml de cada solución a los pocillos donadores.

Las cantidades de insulina en los pocillos receptores se determinaron usando ELISA.

Resultados

65 Un gráfico de datos de insulina de 30 minutos se muestra en la Figura 5. Hubo significativamente más insulina suministrada a través de las células cuando se usó ácido cítrico o glutámico, excepto en comparación con los resultados obtenidos con TSC (citrato trisódico). En el caso del TSC, se usó HCl para el ajuste del pH. El ajuste del pH generó ácido cítrico, lo que explica estos resultados.

Como lo demuestran estos resultados, la potenciación de la captación y el transporte depende de la elección del quelante.

5 Ejemplo 4: Evaluación preclínica de quelantes en una formulación de insulina a base de ácido cítrico en cerdos.

Materiales y métodos

10 En conjunto con un estudio publicado, A. Plum, H. Agero y L. Andersen. Farmacocinética del análogo de insulina de actuación rápida, insulina aspart, en ratas, perros y cerdos, y farmacodinámica de insulina aspart en cerdos. Drug Metab. Dispos., 28 (2): 155-60 (2000), se determinó que la semivida de eliminación era un buen determinante de la absorción de insulina, ya que un retraso en la eliminación implica una absorción más lenta desde el sitio de inyección. Por lo tanto, se realizó un análisis no compartimental de un estudio de cerdos en miniatura para examinar los parámetros de PK y PD, en particular la semivida de eliminación.

15 Los cerdos diabéticos fueron inyectados por vía subcutánea con una de las cuatro formulaciones de insulina. Tres formulaciones contenían un quelante (EDTA, EGTA o TSC) y el cuarto control contenía solo insulina humana regular RHI, sin quelante. Se usó ácido cítrico (1,8 mg/ml) como ácido en todas las formulaciones de quelantes, y se añadieron NaCl y m-cresol para la isotonicidad y la esterilidad de la formulación en todos los casos. Los quelantes
20 estaban todos a la misma concentración molar de $4,84 \times 10^{-3}$ moles.

Se dejó a los cerdos en ayunas durante una noche, y se les administró por vía subcutánea una dosis de 0,125 U/kg de insulina humana que contenía EDTA (n = 3) o 0,08 U/kg de insulina humana que contenía EGTA o TSC (n = 2). Las dosis se redujeron debido a la disminución extrema de la glucosa en sangre con la dosis más alta. Los niveles
25 de glucosa en sangre e insulina se determinaron en todos los momentos, hasta 8 horas después de la dosis.

El modelado farmacocinético se realizó con Win Nonlin, usando un modelo no compartimental con ponderación uniforme. Las semividas de eliminación se compararon en la Tabla 1:

30 **Tabla 1: Comparación de la glucosa en sangre en cerdos en función del quelante**

Insulina	Semivida "lamda z" (min. +/- est) semivida terminal
RHI/sin quelante	120
Insulina/EDTA	39,1 +/-15,8
Insulina/EGTA	37,5 +/- 8,0
Insulina/TSC	30,1 +/- 9,0

35 La semivida de eliminación de la insulina humana regular (120 min) en este estudio piloto en cerdos fue uniforme con la observada en la bibliografía y se usó como punto de prueba para validar los datos. Como esto es considerablemente más largo que después de la administración intravenosa, esto confirma que hay una absorción lenta continua desde el sitio de la inyección después de la inyección. Los quelantes en la formulación de ácido cítrico muestran claramente una reducción en este parámetro, lo que demuestra que estos tres quelantes son eficaces para potenciar la absorción de la insulina humana regular, aunque en diferentes grados.

40 Ejemplo 5: Comparación de la formulación de insulina de EDTA y ácido cítrico con insulina humana regular en un ensayo clínico humano.

Materiales y métodos

45 El objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades farmacodinámicas (FD) de una formulación de prueba que contiene insulina en combinación con ácido cítrico y EDTA, "CE 25-4". Se realizaron cinco abrazaderas de glucosa euglicémica (Biostator; glucosa en sangre objetivo 90 mg/dl) en 10 voluntarios sanos en ayunas (edad media 40 (intervalo 20-62 años); IMC 22,5 (19,2-24,9) kg/m²). Usando un diseño de cruce con una orden de tratamiento fija, se inyectaron 12 UI de insulina regular y 12 UI de formulación de insulina CE por vía subcutánea en la región
50 abdominal.

Resultados

55 Los resultados se muestran en las Figuras 6 y 7. La inyección SC de CE 25-4 dio como resultado un perfil de acción en el tiempo que produjo un aumento significativamente más rápido en el consumo de glucosa de insulina humana

regular (Figura 6). Los datos farmacocinéticos medios confirman los resultados de la FD (Figura 7).

Este estudio muestra que la adición de ácido cítrico y EDTA a la insulina humana regular mejora la velocidad de absorción de la insulina, como lo demuestra un tiempo más rápido hasta la concentración máxima (Figura 7) y un inicio de actuación más rápido (Figura 6) en comparación con la insulina humana normal sola.

Ejemplo 6: Farmacocinética y farmacodinámica de la insulina CE, insulina Lispro e insulina humana regular cuando se inyectan por vía subcutánea inmediatamente antes de una comida en pacientes con diabetes tipo 1.

Antecedentes y objetivos:

El objetivo de este estudio fue determinar la actuación de CE 25-4, HI e IL en excursiones posprandiales de glucosa en sangre (GS) después de una comida convencional en pacientes con diabetes tipo 1.

Materiales y métodos

La GS de 9 pacientes (5 hombres y 4 mujeres; edad 40±10 años, IMC 24,0±2,0 kg/m²) se estabilizó mediante una abrazadera de glucosa (GS objetivo 120 mg/dl) antes de la ingestión de la comida. La infusión de glucosa se desconectó antes de la comida convencional y la dosificación de insulina. Usando un diseño de estudio en cruce con orden de tratamiento fijo, se inyectó la misma dosis específica para el paciente de VIAject™ (CE25-4) IL o RHI inmediatamente antes de la comida. Posteriormente, las excursiones de glucosa posprandiales se controlaron continuamente durante 8 horas y la infusión de glucosa se reinició si la GS era menor de 60 mg/dl. Los niveles de insulina en plasma se determinaron a lo largo del estudio.

Resultados

Los resultados mostrados en la Tabla 2 como la media más o menos la desviación estándar comparan la T_{máx} de insulina después de la inyección subcutánea a pacientes diabéticos tipo 2 después de una comida, de insulina humana regular, insulina más ácido cítrico y EDTA (CE) y lispro. Los resultados en la Tabla 3 comparan la glucosa en sangre para las mismas personas de prueba.

Tabla 2: Comparación de T_{máx} de insulina (min)

Farmacocinética	RHI	IL	(CE25-4)
T _{máx} de ins (min)	143±29*	62±37	43±36*
*p<001, prueba t para datos apareados			

Tabla 3: Comparación de la farmacocinética de insulina de la glucosa en sangre

Farmacodinámica (0-180 min)	RHI	IL	CE 25-4
T _{máx} de GS (min.)	93±56*	47±28	41±26*
Máx GS (mg/dl)	185±44	158±33	157±27
Min GS (mg/dl)	103±21	73±31	87±24
Máx GS-Min GS (mg/dl)	82±30	84±11*	70±18*
*p<0,05, prueba t para datos apareados			

El número total de eventos hipoglucémicos (horas que requiere la infusión de glucosa) 3 a 8 horas después de la inyección fueron 13 con RHI, 11 con IL y 4 con la formulación CE 25-4. La cantidad total media de glucosa infundida para evitar la hipoglucemia durante este tiempo fue seis veces mayor para RHI y el doble para IL que con CE 25-4. Las áreas por encima y por debajo de la zona objetivo glucémica normal (AUC GS por encima de 140 y por debajo de 80 mg/dl) sumadas para todos los pacientes por grupo fueron 81.895 para RHI, 57.423 para IL y 38.740 mg/dl * min para CE 25-4. Los niveles medios de glucosa en sangre se muestran en la Figura 8.

CE 25-4 fue la más rápida en revertir el aumento de la glucosa en sangre después de la comida convencional. Los pacientes tratados con CE 25-4 experimentaron reducciones de la glucosa posprandial. Por el contrario, RHI tuvo la excursión de glucosa más alta, lo que es uniforme con su velocidad de absorción más lenta. La variabilidad de los

niveles de glucosa (diferencia de medias entre valores máximos y mínimos) fue significativamente menor para CE 25-4 que para IL, lo que demuestra un mejor control glucémico de CE 25-4 en estos pacientes con diabetes tipo 1.

Ejemplo 7: Caracterización del tamaño de insulinas mediante dispersión de la luz:

5 CE 100-4 tiene un inicio de actuación muy rápido en pacientes. Para comprender la base del perfil de absorción rápida, se realizaron experimentos *in vitro* con CE 100-4 en comparación con otras insulinas humanas recombinantes disponibles en el mercado y análogos de insulina de actuación rápida. Se aplicaron técnicas de dispersión de la luz a los productos originales, así como una serie de diluciones en tampón de fluido extracelular sintético. Los resultados muestran que a diferencia de la insulina recombinante regular y los análogos de actuación rápida, la CE 100-4 se reduce en tamaño aproximadamente hasta la de un dímero después de una dilución 1:3, lo que es uniforme con su perfil de absorción rápida.

Materiales y métodos

15 Con el fin de dilucidar el mecanismo de este rápido inicio de actuación, los experimentos *in vitro* se diseñaron para estudiar el efecto de la dilución de la formulación tradicional en un tampón de fluido extracelular sintético como un medio para simular lo que se produce naturalmente después de la inyección subcutánea. Se usó una técnica de dispersión de la luz para evaluar la distribución del tamaño medio (nm). Las formulaciones comerciales de insulina de actuación rápida o prandial que se usaron para la comparación en estos experimentos *in vitro* fueron: IL, IA, RHI y CE 100-4. Para la comparación del tamaño, se usaron preparaciones convencionales de insulinas de cinc monoméricas (pH 2,0) y hexaméricas (pH 7).

25 Las insulinas comerciales se caracterizaron por su tamaño con el Zetasizer nano (Malvern Inst, Reino Unido). Se colocaron muestras de un ml en una cubeta de vidrio y se analizaron para determinar una distribución de tamaño volumétrico media (nm) de la insulina en solución. La media de 3 muestras (cada muestra tuvo varias ejecuciones) se usó como base de comparación. Después del análisis de la resistencia completa inicial, se realizó una serie de diluciones a partir de 1:2 a 1:16 en tampón que tiene capacidad de pH y de tamponamiento similar de fluido extracelular (ECF, MgCl₂ 0,7 mM, CaCl₂ 1,2 mM, KCl, 0,2 mM, Na₂SO₄ 0,5 mM, NaCl 104 mM, NaHCO₃ 28,3 mM). El tamaño medio se determinó para todas las diluciones con cada una de las insulinas disponibles en el mercado y CE 100-4, para comprender la distribución del tamaño de monómero/dímero/hexamero para cada formulación.

Insulinas

35 RHI, IL, IA y CE 100-4.

Diluyentes

40 ECF, MgCl₂ 0,7mM, CaCl₂ 1,2 mM, KH₂PO₄ 2mM, KCl 2mM, Na₂SO₄ 0,5 mM, NaCl 104 mM, NaHCO₃, 28,3 mM en agua estéril.

Resultados

45 En los estudios de medición de tamaño, CE 100-4 sin diluir es más grande que IL, IA y RHI. Sin embargo, con una dilución de 1:3, el tamaño medio de CE 100-4 se redujo en 2 nm al tamaño monomérico/dimérico, mientras que las otras insulinas estudiadas permanecieron en el tamaño hexamérico de aproximadamente 5 nm. CE 100-4 pero no IL, IA y RHI se redujo aún más con una mayor dilución. RHI no diluido parece ser más pequeño, pero crece en tamaño a más de 5 nm una vez diluido 1:1 y permanece en este intervalo de tamaño a una dilución de 1:16.

50 CE 100-4 sin diluir inicialmente parece más grande que las otras insulinas estudiadas, posiblemente debido a que el ácido cítrico y el EDTA se atraen débilmente a la superficie, lo que puede servir para aumentar aún más la velocidad de absorción de los sitios subcutáneos enmascarando la carga superficial. La carga puede ser un impedimento para la absorción. Poco después de la administración subcutánea, dado que el material inyectado se diluye por ECF, CE 100-4 tiene un tamaño medio más pequeño que los análogos de insulina de actuación rápida y RHI a diluciones idénticas.

Ejemplo 8: Ultracentrifugación analítica de insulina

Materiales y métodos

60 Se desarrolló un conjunto de experimentos usando ultracentrifugación analítica, que determina una estimación del coeficiente de sedimentación promedio ponderado (Svedbergs 20 °C, agua S (20, w)), que es proporcional al peso molar efectivo flotante. El procedimiento para este análisis fue algo diferente de la determinación del tamaño por dispersión de la luz. En primer lugar, cada muestra se diluye con un diluyente que es idéntico en composición al del producto comercial. Para obtener esto, se usó una unidad de filtro de membrana Centriprep® Ultracel-3 (Millipore Inc, MA, EE. UU.) con un límite MW de 3 kDa para separar la insulina del diluyente. El diluyente original se recuperó

y se analizó para determinar la presencia de cualquier contenido de insulina. Se usaron diluyentes libres de insulina confirmados para diluir el producto comercial.

Estos primeros conjuntos de datos se usaron para caracterizar a la insulina como una sola especie estable, o una que cambia de hexámero, dímero, monómero en su propio diluyente. Se obtuvieron dos conjuntos de datos usando ultracentrifugación analítica. El primer conjunto de datos se obtuvo por dilución con exactamente el diluyente de la formulación. En los casos de las preparaciones comerciales, esto se obtuvo mediante tubos centiprep que separan la insulina o el análogo del diluyente. El filtrado se verificó por el contenido de proteína y se usó la confirmación posterior para el diluyente en la primera ronda de experimentos.

El segundo conjunto de muestras se preparó sustituyendo el tampón de ECF en lugar de diluyente. Para que esto funcione, la muestra más concentrada se diluyó primero con ECF 1:2. A continuación se realizaron diluciones adicionales con ECF. En el caso de CE 100-4, la dilución inicial con ECF fue de 1:4 para asegurar que el punto isoeléctrico se cruzó para eliminar cualquier materia precipitada. Estos experimentos estaban destinados a imitar el entorno de inyección subcutánea posterior.

Los valores obtenidos para el coeficiente de sedimentación promedio ponderado para cada concentración de carga, corregidos en condiciones convencionales, se proporcionan en la tabla a continuación. El análisis de velocidad se realizó a 20 °C y 55.000 RPM usando óptica de interferencia con una ultracentrífuga analítica Beckman-Coulter XL. Se usaron celdas de límite sintéticas de doble sector equipadas con ventanas de zafiro para hacer coincidir la muestra y los meniscos de referencia. El rotor se equilibró al vacío a 20 °C y después de un período de aproximadamente 1 hora a 20 °C, el rotor se aceleró a 55.000 RPM. Los escaneos de interferencias se adquirieron a intervalos de 60 segundos durante 5 horas.

Varios programas analíticos se ejecutaron sobre los datos (DcDt + versión 2.1.02, y Sedfit, vers 11.3b3) para extraer información específica para cada muestra. Los datos del programa Sedfit se muestran en los resultados a continuación. DcDt es un modelo independiente, la distribución del coeficiente de sedimentación $g(s^*)$ que usa la derivada en el tiempo del perfil de concentración. Si no hay cambio a valores más altos de S con un aumento en la concentración, es una fuerte prueba de que no se producen reacciones reversibles (es decir, monómero, hexámero de dímero). Si el tamaño y la forma cambian con la dilución (cambio de hexámero a dímero a monómero), no es posible determinar una estimación del peso molecular, pero se puede obtener información útil del programa Sedfit sobre el coeficiente de sedimentación $S(w)$. Además, este programa produce un modelo directo de límites para los conjuntos de datos individuales usando una solución numérica basada en modelos para la ecuación de Lamm³. Representa el coeficiente de sedimentación continuo $c(s)$ frente al coeficiente de sedimentación (s) para producir curvas que describen los tamaños relativos de las especies sedimentadas.

Dilución de cada insulina con diluyente específico de insulina:

A. RHI

RHI se presentó para su análisis por ultracentrifugación de la velocidad de sedimentación. La concentración de reserva estimada fue de 3,745 mg/ml. El diluyente fue como se describió anteriormente.

Las siguientes constantes físicas se calcularon a partir de las composiciones de aminoácidos para la proteína usando el programa Sednterp.⁵

$$\text{RHI: } MW_{\text{sec}} = 5792 \text{ Da. } N_{20^\circ} = 0,726 \text{ ml/g}$$

La densidad y la viscosidad del diluyente se calcularon para que fueran de 1,00231 g/ml y de 0,01041 poises a 20 °C, respectivamente, usando Sednterp.

Resultados

La Figura 9A muestra un diagrama de las distribuciones $c(s)$ normalizadas a la concentración de carga de RHITM. Los datos mostrados para el diagrama de $c(s)$ normalizado son uniformes con los datos $g(s^*)$ del DcDt+. Hay un cambio notable hacia valores más bajos de S en la sedimentación con un aumento en la concentración.

Los valores obtenidos para el coeficiente de sedimentación promedio ponderado para cada concentración de carga, corregidos en condiciones convencionales, se proporcionan en la tabla a continuación.

N.º de celda	S(20,w) (Svedbergs)	Conc. (mg/ml)
1	3,05	0,168
2	3,00	0,561
3	3,00	1,678
4	2,84	3,624

Conclusión:

5 Estos análisis indican que RHI en las condiciones del experimento existe principalmente como un hexámero. Hay una pequeña cantidad de material de sedimentación más lento presente en las muestras de menor concentración, así como lo que parecen ser dímeros de los hexámeros.

B. IL

10

Los materiales y métodos fueron como se describió anteriormente.

Resultados

15 La Figura 9B es un diagrama de los coeficientes de sedimentación promedio ponderados para cada concentración. La proteína se disocia tras la dilución. Además, parece haber una pequeña cantidad (<5 %) de especies de sedimentación más rápidas que probablemente sea un dímero del hexámero.

20 Los valores obtenidos para el coeficiente de sedimentación promedio ponderado para cada concentración de carga, corregidos en condiciones convencionales, se proporcionan en la tabla a continuación.

N.º de celda	S(20,w) (Svedbergs)	Conc. (mg/ml)
1	2,78	0,151
2	3,02	0,558
3	3,09	1,755
4	3,10	3,595

Conclusiones:

25 Estos análisis indican que la muestra de proteína, IL, en las condiciones de este experimento, existe principalmente como un hexámero. Hay pruebas de la disociación de IL tras la dilución, y hay una pequeña cantidad de lo que parecen ser dímeros de los hexámeros presentes. Las concentraciones estudiadas fueron de aproximadamente 30 µm, 100µm, 300 µm y 600 µm (unidades monoméricas).

C. IA

Los materiales y métodos fueron como se describió anteriormente.

Resultados

35

La Figura 9C muestra un diagrama de las distribuciones c(s) normalizadas a la concentración de carga. Los datos mostrados para el diagrama de c(s) normalizado son uniformes con los datos g(s*) del DcDt+. Las curvas c(s) a bajas concentraciones muestran una contribución de una especie más pequeña (monómero) que disminuye a medida que aumenta la concentración. También hay un ligero cambio a valores más bajos de S en la sedimentación con un aumento en la concentración...

40

Parece haber una pequeña cantidad (<5 %) de especies de sedimentación más rápidas que probablemente sea un dímero del hexámero.

Los valores obtenidos para el coeficiente de sedimentación promedio ponderado para cada concentración de carga, corregidos en condiciones convencionales, se proporcionan en la tabla a continuación.

N.º de celda	S(20,w) (Svedbergs)	Conc. (mg/ml)
1	2,72	0,158
2	3,05	0,561
3	3,19	1,655
4	3,14	3,563

5 **Conclusiones:**

Estos análisis indican que IA, en las condiciones de este experimento, existe principalmente como un hexámero. Hay pruebas de la disociación de IA tras la dilución, y hay una pequeña cantidad de lo que parecen ser dímeros de los hexámeros presentes. Las concentraciones estudiadas fueron de aproximadamente 30 µm, 100µm, 300 µm y 600 µm (unidades monoméricas).

D. CE-100 4

Los materiales y métodos fueron como se describió anteriormente.

15 **Resultados**

Las bases de datos para CE-100 4 se analizaron usando Sedfit y el modelo c(s). Estrictamente hablando, este modelo solo es aplicable a las mezclas que no interactúan, pero en el caso de las especies que interactúan puede dar una idea de qué especies están presentes en la solución. La Figura 9D muestra un diagrama de la distribución c(s) normalizada en la concentración de carga. El diagrama c(s) es uniforme con los datos g(s*) de DcDt + en que hay un cambio notable hacia valores S más bajos tras la dilución. Los diagramas c(s) de las concentraciones más altas muestran claramente que CE 100-4 puede ser más grande que un hexámero.

25 El valor obtenido para el coeficiente de sedimentación promedio ponderado para cada concentración de carga, corregido en condiciones convencionales, se proporcionan en la tabla a continuación.

N.º de celda	S(20,w) (Svedbergs)	Conc. (mg/ml)
1	1,85	0,153
2	2,41	0,548
3	3,05	1,722
4	3,56	3,484

30 **Conclusiones:**

Estos análisis indican que la muestra de proteína, CE 100-4, en las condiciones de este experimento, existe en un equilibrio entre monómeros, dímeros, hexámeros, y posiblemente oligómeros más grandes. Las concentraciones estudiadas fueron de aproximadamente 30 µm, 100µm, 300 µm y 600 µm (unidades monoméricas).

35 **Dilución con tampón ECF:**

Las preparaciones comerciales primero se diluyeron 1:2 con ECF, con la excepción de CE 100-4, que se diluyó 1:4. Esto tuvo que tratarse de manera diferente para evitar la precipitación a través del punto isoeléctrico, ya que comienza a pH 4. Las otras insulinas comerciales ya estaban a pH 7, de manera que la dilución inicial fue de 1:2.

40 A. RHI

RHI se presentó para su análisis por ultracentrifugación de la velocidad de sedimentación. La concentración estimada de la población fue de 1,87 mg/ml después de la dilución con un volumen igual de la FEC suministrada.

Las siguientes constantes físicas se calcularon a partir de la composición de aminoácidos para la proteína usando el programa Sednterp.⁵

RHI: $MW_{sec} = 5792 \text{ Da}$, $N_{20^\circ} = 0,726 \text{ ml/g}$

La densidad y la viscosidad del diluyente se calcularon para que fueran de 1,00273 g/ml y de 0,01043 poises a 20 °C, respectivamente, usando Sednterp.

El esquema de dilución, usando la solución madre, para las tres celdas usadas en el análisis se muestra en la siguiente tabla:

N.º de celda	Vol. reserva (µl)	Vol. tampón (µl)	Conc. estim. (mg/ml)
1	45	405	0,19
2	150	300	0,62
3	450	--	1,87

Se usó Sedfit, versión 11.71, con el programa de modelado directo de límites para conjuntos de datos individuales que usan soluciones numéricas basadas en modelos para la ecuación de Lamm³.

Se calculó el modelo de distribución del coeficiente de sedimentación continua, c(s). Los diagramas de distribución de c(s) se afinan, en relación con otros métodos de análisis, porque los efectos de ampliación de la difusión se eliminan mediante el uso de un valor medio para el coeficiente de fricción.

Resultados

La Figura 10A muestra un diagrama de las distribuciones c(s) normalizadas a la concentración de carga. Los datos mostrados para el diagrama de c(s) normalizado son uniformes con los datos g(s*) del DcDt+. Los diagramas c(s) son casi coincidentes, pero hay un pequeño cambio hacia valores más bajos de S en la sedimentación con un aumento en la concentración.

Parece haber una pequeña cantidad (<1 %) de material de sedimentación más lento en las dos muestras de concentración más baja, y una pequeña cantidad (<3 %) de especies de sedimentación más rápida que es probablemente un dímero del hexámero. La disminución en las especies más lentas y un aumento en las especies más rápidas con una concentración creciente implican que solo hay un ligero cambio en la autoasociación de RHI sobre los estudios de intervalos de concentración.

Los valores obtenidos para el coeficiente de sedimentación promedio ponderado para cada concentración de carga, corregidos en condiciones convencionales, se proporcionan en la tabla a continuación:

N.º de celda	S(20,w) (Svedbergs)	Conc. (mg/ml)
1	3,25	0,176
2	3,24	0,552
3	3,35	1,721

Conclusiones:

Estos análisis indican que la RHI, en las condiciones de este experimento, existe principalmente como un hexámero. Hay una pequeña cantidad de material de sedimentación más lento presente en las muestras de menor concentración, así como lo que parecen ser dímeros de los hexámeros. Los estudios de concentración fueron de aproximadamente 30 µm, 100 µm y 300 µm (unidades monoméricas).

II

Los métodos descritos anteriormente.

Resultados

La Figura 10B muestra un diagrama de las distribuciones $c(s)$ normalizadas a la concentración de carga. Los datos mostrados para el diagrama de $c(s)$ normalizado son uniformes con los datos $g(s^*)$ del DcDt+. Las curvas $c(s)$ a bajas concentraciones muestran una contribución significativa de una especie más pequeña (quizás un dímero) que disminuye a medida que aumenta la concentración. También hay un ligero cambio a valores más bajos de S en la sedimentación con un aumento en la concentración.

Parece haber una pequeña cantidad (<2 %) de especies de sedimentación más rápidas, especialmente evidente en las dos muestras de mayor concentración.

Los valores obtenidos para el coeficiente de sedimentación promedio ponderado para cada concentración de carga, corregidos en condiciones convencionales, se proporcionan en la tabla a continuación:

N.º de celda	S(20,w) (Svedbergs)	Conc. (mg/ml)
1	3,17	0,167
2	3,12	0,568
3	3,17	1,820

Conclusiones:

Estos análisis indican que IL, en las condiciones de este experimento, existe principalmente como un hexámero. Hay pruebas de la disociación de IL tras la dilución, y hay una pequeña cantidad de lo que parecen ser dímeros de los hexámeros presentes. Los estudios de concentración fueron de aproximadamente 30 μm , 100 μm y 300 μm (unidades monoméricas).

Insulina aspart (IA)

Los métodos descritos anteriormente.

Resultados

La Figura 10C muestra un diagrama de las distribuciones $c(s)$ normalizadas a la concentración de carga. Los datos mostrados para el diagrama de $c(s)$ normalizado son uniformes con los datos $g(s^*)$ del DcDt+. Las curvas $c(s)$ a bajas concentraciones muestran una pequeña cantidad de una especie más pequeña (monómero/dímero) que disminuye a medida que aumenta la concentración. También hay un ligero cambio a valores más bajos de S en la sedimentación con un aumento en la concentración. El gráfico muestra claramente que la proteína se disocia ligeramente tras la dilución. Además, parece haber una pequeña cantidad (aproximadamente 3 % en la muestra de mayor concentración) de una especie de sedimentación más rápida que puede ser un dímero del hexámero.

Los valores obtenidos para el coeficiente de sedimentación promedio ponderado para cada concentración de carga, corregidos en condiciones convencionales, se proporcionan en la tabla a continuación:

N.º de celda	S(20,w) (Svedbergs)	Conc. (mg/ml)
1	3,10	0,186
2	3,23	0,544
3	3,24	1,848

Conclusión:

Estos análisis indican que la IA, en las condiciones de este experimento, existe principalmente como un hexámero. Hay pruebas de la disociación de IA tras la dilución, y hay una pequeña cantidad de lo que parece ser dímeros de los hexámeros presentes. Los estudios de concentración fueron de aproximadamente 30 μm , 100 μm y 300 μm (unidades monoméricas).

D. CE100-4

Materiales

- 5 La concentración de reserva estimada fue de 0,936 mg/ml después de diluir un volumen de la solución con tres volúmenes de la ECF suministrada.

Método

- 10 El esquema de dilución, usando la solución madre, para las cuatro celdas usadas en el análisis se muestra en la siguiente tabla:

N.º de celda	Vol. reserva (µl)	Vol. tampón (µl)	Conc. estim. (mg/ml)
1	90	360	0,19
2	200	250	0,42
3	450	--	0,94

Resultados

- 15 Los conjuntos de datos para CE 100-4 se analizaron usando Sedfit y el modelo c(s). Estrictamente hablando, este modelo solo es aplicable a las mezclas que no interactúan, pero en el caso de las especies que interactúan aún puede dar una idea de qué especies están presentes en la solución. La Figura 10D muestra un diagrama de las distribuciones c(s) normalizadas a la concentración de carga. El diagrama c(s) es uniforme con los datos g(s*) de DcDt + en que hay un cambio notable hacia valores S más bajos tras la dilución. El diagrama c(s) de las concentraciones más altas muestran claramente que CE 100-4 puede ser más grande que un hexámero.

Los valores obtenidos para el coeficiente de sedimentación promedio ponderado para cada concentración de carga, corregidos en condiciones convencionales, se proporcionan en la tabla a continuación:

25

N.º de celda	S(20,w) (Svedbergs)	Conc. (mg/ml)
1	1,61	0,178
2	1,95	0,40
3	3,14	0,84

Estos análisis indican que la CE 100-4, en las condiciones de este experimento, existe en equilibrio entre monómeros, dímeros, hexámeros y posiblemente oligómeros más grandes en la concentración más alta. Las concentraciones estudiadas fueron de aproximadamente 30 µM, 70 µM y 145 µM (unidades monoméricas).

30

Controles en agua ajustados con HCl pH 2 o NaOH pH 7

Las siguientes constantes físicas se calcularon para la composición de aminoácidos para la proteína usando el programa Sednterp.⁵

35

IC-pH7: $MW_{sec} = 5792 \text{ Da}$, $N_{20^\circ} = 0,726 \text{ ml/g}$

La densidad y la viscosidad del diluyente se calcularon para que fueran de 0,99823 g/ml y de 0,01002 poises a 20 °C, respectivamente, usando Sednterp.

40

Control interno IC pH7

Método

- 45 El esquema de dilución, usando agua con NaOH, pH 7 como diluyente para las cuatro células usadas en el análisis se muestra en la siguiente tabla:

N.º de celda	Vol. reserva (µl)	Vol. tampón (µl)	Conc. estim. (mg/ml)
1	25	475	0,19
2	75	375	0,62
3	250	250	1,87
3	450	—	3,745

Distribución del coeficiente de sedimentación continuo $c(s)$.

- 5 Los diagramas de distribución de $c(s)$ se afinan, en relación con otros métodos de análisis, porque los efectos de ampliación de la difusión se eliminan mediante el uso de un valor medio para el coeficiente de fricción.

Resultados

- 10 Los conjuntos de datos para IC pH7 se analizaron usando Sedfit y el modelo $c(s)$. Estrictamente hablando, este modelo solo es aplicable a las mezclas que no interactúan, pero en el caso de las especies que interactúan aún puede dar una idea de qué especies están presentes en la solución. La Figura 11 muestra un diagrama de las distribuciones $c(s)$ normalizadas a la concentración de carga. El diagrama $c(s)$ es uniforme con los datos $g(s^*)$ de $DcDt +$ en que hay un cambio notable hacia valores S más bajos tras la dilución.

- 15 Los valores obtenidos para el coeficiente de sedimentación promedio ponderado para cada concentración de carga, corregidos en condiciones convencionales, se proporcionan en la tabla a continuación.

N.º de celda	$S(20,w)$ (Svedbergs)	Conc. (mg/ml)
1	2,43	0,18
2	2,90	0,57
3	3,04	1,74
4	3,10	3,52

- 20 Los análisis indican que la muestra, IC-pH7, en las condiciones de este experimento, existe en un equilibrio dímero-hexamero en la dilución más baja, lo que favorece fuertemente el estado hexamérico a las tres concentraciones más altas usadas en el presente documento. Los estudios de concentración fueron de aproximadamente 30 µM, 100µM, 305 µM y 620 µM (unidades monoméricas).

- 25 Control interno IC pH2

Método:

La insulina se diluyó con HCl 0,01 N como se describió anteriormente.

30

Resultados:

- 35 Los conjuntos de datos para IC-pH2 se analizaron usando Sedfit y el modelo $c(s)$ principalmente para obtener una buena estimación de las concentraciones de carga. Los valores obtenidos para el coeficiente de sedimentación promedio ponderada para cada concentración de carga coincidieron bastante bien con los valores determinados usando $DcDt+$. A continuación, se proporciona una tabla de los valores $S_{20,w}$ tal como se determinó usando Sedfit.

N.º de celda	$S(20,w)$ (Svedbergs)	Conc. (mg/ml)
1	1,26	0,17
2	1,28	0,56

3	1,28	1,77
4	1,28	3,61

Estos análisis indican que IC-pH2, en las condiciones de este experimento, existe principalmente como una sola especie (presumiblemente el monómero de insulina) que no muestra tendencia a una autoasociación adicional. Las condiciones del disolvente eran altamente no ideales debido a la falta de electrolito de soporte. Las concentraciones estudiadas fueron 30 μM , 97 μM , 305 μM y 620 μM (unidades monoméricas).

Conclusiones globales, análisis de sedimentación

La estimación del peso molecular de RHI, usando el software DcDt, estableció que su peso molecular es uniforme con un hexámero ($35,6 \pm 1,6$ kDa) en todo el intervalo de dilución. Los valores de control para insulina a pH 2, que es el patrón para la insulina monomérica (2,29 nm), tiene un valor de coeficiente de sedimentación de 1,28 S (20, w) que permanece esencialmente sin cambios sobre la serie de dilución, lo que confirma su estado monomérico. La insulina de control no estabilizada, pH 7 a concentración completa es hexamérica, pero está en equilibrio dinámico con formas de dímero más pequeñas, como se demuestra por la reducción en el tamaño en la dilución en diluyente pH 7. IA e IL comienzan en el intervalo de tamaño de hexámero y tienen una pequeña población de formas de monómero/dímero después de la dilución a 1:16 en ECF. Una mayor proporción de partículas monoméricas/diméricas con CE 100-4 es uniforme con su perfil de absorción más rápido.

Ejemplo 10: Determinación del efecto sobre el tamaño de la insulina mediante la adición de citrato de sodio y EDTA a la insulina, pH 7,4

Dado que la elevación del pH a 7 de la CES 100-4 mostró una absorción rápida en el modelo porcino y una reducción en el tamaño por Malvern, se diseñó un método alternativo para ver si una sustitución del ácido cítrico por citrato trisódico también funcionaría a pH 7.4.

Materiales y métodos

Se disolvieron EDTA disódico (1,8 mg/ml) y citrato trisódico (1,8 mg/ml) en agua con glicerina (22 mg/ml). Se añadió insulina a la solución a una concentración de 3,8 mg/ml. Se añadió hidróxido de sodio gota a gota para elevar el pH a 7,4. El material no diluido se analizó luego en Malvern para determinar el tamaño medio de partícula, y luego se diluyó con tampón de fluido extracelular (ECF) y se dimensionó en cada punto a lo largo de la serie de dilución.

Resultados

Se comparó CSE 100-7, insulina de citrato de sodio, pH 7,4, diluida con tampón ECF con una formulación de ácido cítrico en un entorno ácido y neutro. Los resultados se muestran en la Figura 12. La Figura 12 es un gráfico del tamaño medio de partículas de insulina (nm) en función de la dilución para CE 100-7 pH 7,5, y CSE 100-7 que contiene citrato de sodio en lugar de ácido cítrico, pH 7,4.

Los resultados demuestran que se puede crear una insulina de disociación rápida mezclando citrato de sodio, EDTA e insulina en solución a pH neutro. El tamaño medio de partícula inicialmente es mayor que un hexámero típico, lo que presumiblemente indica que el hexámero se está disociando y está en forma de un multímero débilmente asociado de moléculas de insulina. En la dilución 1:2 en un entorno posterior a la inyección (dilución en ECF), la insulina se disocia rápidamente en unidades más pequeñas, muy probablemente dímeros de insulina. La nueva formulación se comporta exactamente como una formulación de ácido cítrico/insulina EDTA inicialmente preparada a pH 4 y luego llevada a pH 7.

Ejemplo 11: Insulina pH 7 de ácido cítrico y EDTA en cerdos miniatura diabéticos

Materiales y métodos

La insulina se preparó mezclando insulina (3,8 mg/ml), EDTA disódico (1,8 m/ml), ácido cítrico (1,8 mg/ml), glicerina y m-cresol (3 mg/ml) y ajustando el pH a 4 con HCl. El pH de la solución se elevó luego a pH 7 mediante la adición de NaOH. Esto llevó brevemente la formulación a través del punto isoeléctrico de la insulina creando una mezcla turbia que se aclaró cuando se alcanzó el pH final de 7,4. CE 100-7 se administró como insulina prandial a los cerdos antes de una comida.

A seis cerdos miniatura diabéticos (30-50 kg) se les administró primero 0,25 U/kg de la insulina de prueba, luego se alimentaron de forma inmediata con 500 g de alimento convencional para cerdos. Se obtuvieron muestras de sangre antes de la alimentación a -30, -20, -10,0 minutos, luego a 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420, 480 min. después de la dosis. Dos ml de muestras de sangre se obtuvieron a través de un catéter en la

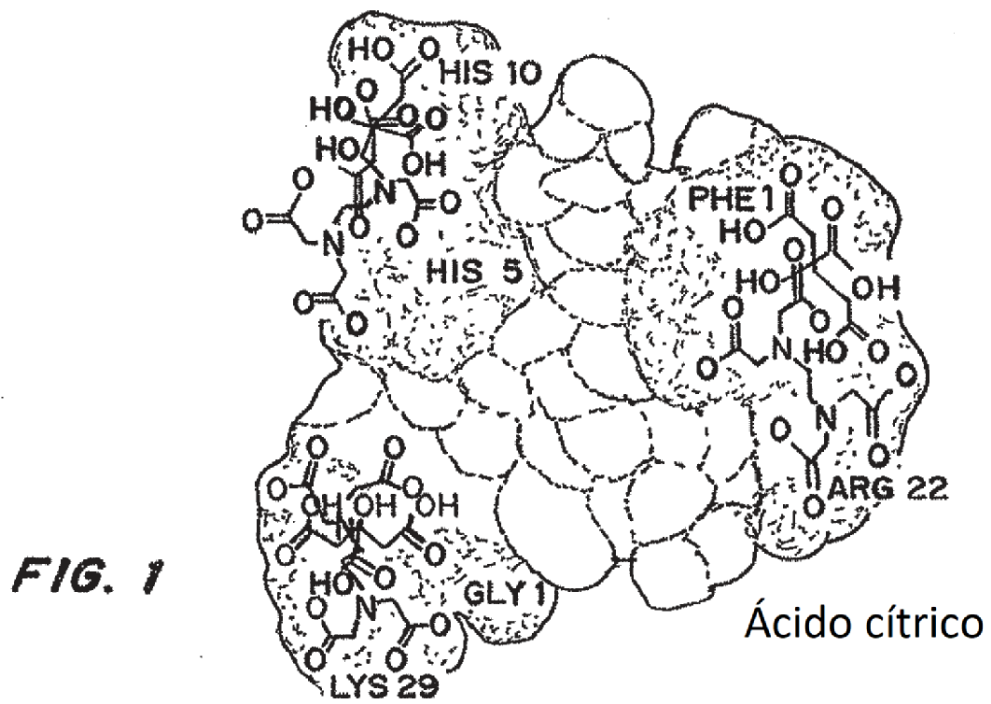
vena yugular de los cuales se usó una gota para verificar la medición de glucosa usando un método de tira de glucosa convencional y la muestra restante se trató con K_2EDTA , y la muestra de plasma se congeló para futuros análisis.

5 **Resultados**

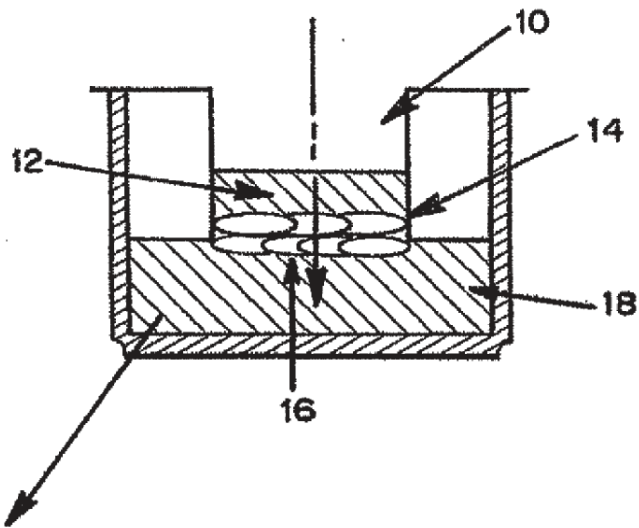
10 El perfil farmacocinético de la formulación de pH 7 se muestra en la Figura 13. Este perfil muy rápido es uniforme con los datos mostrados en pacientes con diabetes en el Ejemplo 6. La elevación del pH a 7 de la formulación ácida que contiene ácido cítrico y EDTA se realizó muy bien en cerdos en miniatura diabéticos. Este cambio de pH dio como resultado que el ácido cítrico se convirtiera en citrato de sodio. Por lo tanto, la forma de sal de las funciones ácidas debería funcionar tan bien como el ácido.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación de insulina que comprende insulina, agente de disolución y quelante de cinc, en donde la formulación tiene un pH entre un pH superior a 7,0 y 7,6 y es una solución acuosa transparente y en la que la insulina tiene un transporte y una adsorción potenciados en relación con la insulina en combinación con HCl y dicho quelante de cinc, en donde la formulación no comprende enzima degradante de hialuronano.
- 10 2. La formulación de la reivindicación 1, en donde la formulación consiste en insulina, agente de disolución, quelante de cinc y uno o más excipientes.
3. La formulación de la reivindicación 1 o 2, en donde la formulación tiene un pH de 7,2 a 7,6.
4. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación tiene un pH de 7,4 o 7,5.
- 15 5. La formulación de la reivindicación 1, en la que el quelante de cinc se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), EGTA, citrato trisódico (TSC), ácido algínico, ácido alfa lipoico, ácido dimercaptosuccínico (DMSA) y CDTA (ácido 1,2-diaminociclohexanotetraacético).
- 20 6. La formulación de la reivindicación 5, en la que el quelante de cinc es etilendiaminotetraacético (EDTA).
- 25 7. La formulación de la reivindicación 1, en la que el agente de disolución es un ácido seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido acético, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácidos glutámico, succínico, aspártico, maleico, fumárico y adípico o una sal de los mismos, preferentemente ácido cítrico o citrato de sodio o una sal seleccionada de entre el grupo que consiste en acetato, ascorbato, citrato, glutamato, aspartato, fumarato de succinato, maleato y adipato y un metal del grupo I o un metal del grupo II, preferentemente ascorbato de sodio o de potasio, citrato, glutamato, aspartato, succinato, fumarato, maleato y adipato.
- 30 8. La formulación de la reivindicación 7, en la que el agente de disolución es una sal de magnesio.
9. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación se prepara elevando el pH de una solución de insulina desde aproximadamente pH 4 a un pH entre un pH superior a 7,0 y 7,6.
- 35 10. La formulación de la reivindicación 1, en la que la insulina se selecciona de entre el grupo que consiste en insulina humana, análogos de insulina y combinaciones de los mismos.
11. La formulación de la reivindicación 10, en la que la insulina es insulina humana recombinante.
- 40 12. La formulación de la reivindicación 1, en la que la insulina se proporciona en un polvo seco en un primer recipiente y al menos uno de los quelantes de cinc y el agente de disolución se proporcionan en un segundo recipiente que contiene un diluyente.
13. La formulación de la reivindicación 1, proporcionada como una formulación congelada farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de un diabético.
- 45 14. La formulación de la reivindicación 1, proporcionada como una solución acuosa transparente a 4 °C.
- 50 15. Una formulación de insulina inyectable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende insulina y una cantidad eficaz de un agente de disolución y un quelante de cinc para su uso en potenciar la captación y el transporte de insulina a través de células epiteliales, en comparación con insulina en combinación con dicho quelante de cinc y HCl, para el tratamiento de un individuo diabético.



Formulación
de insulina añadida



Muestra retirada para ELISA

FIG. 2

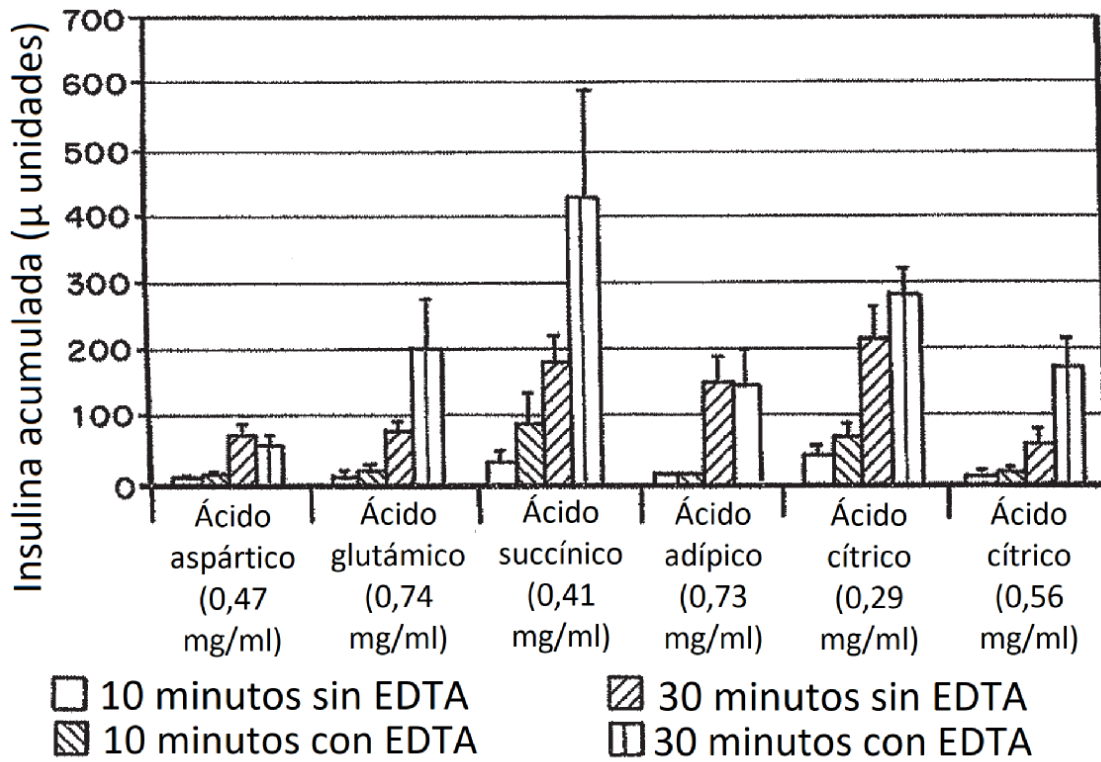


FIG. 3A

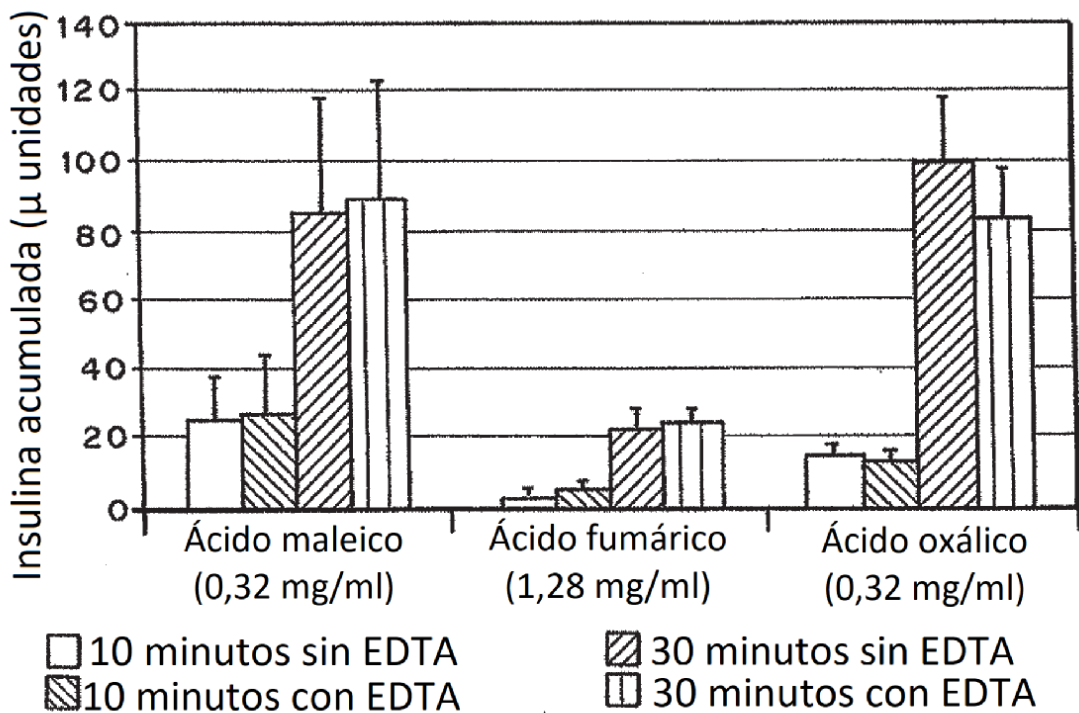


FIG. 3B

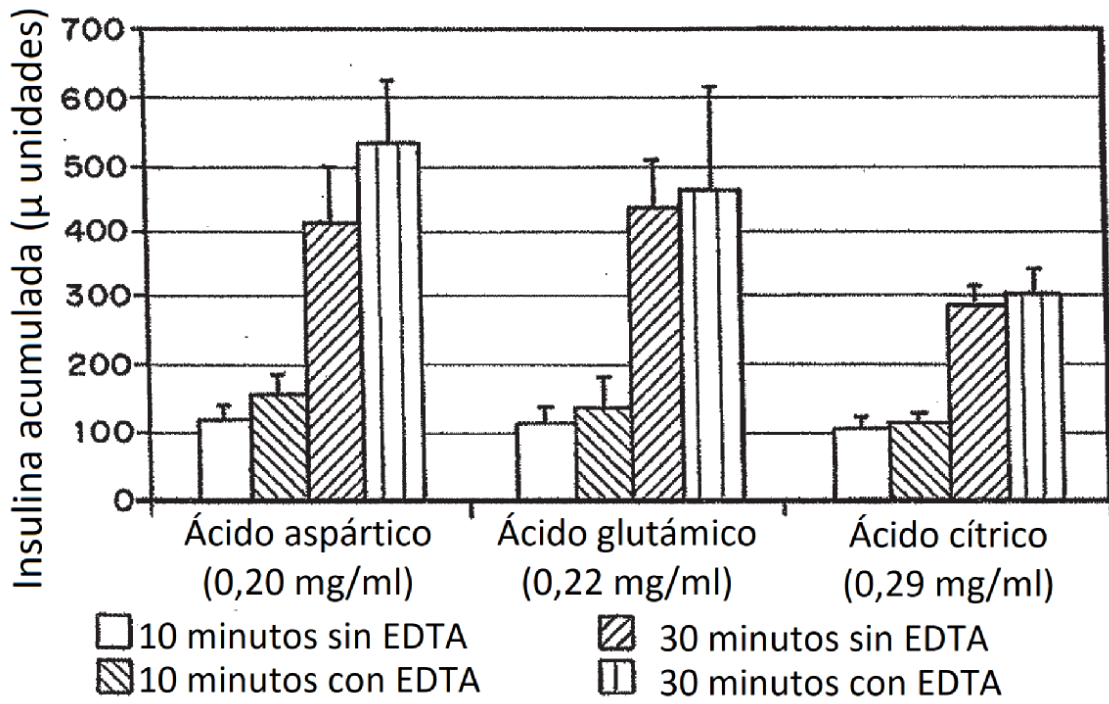


FIG. 4A

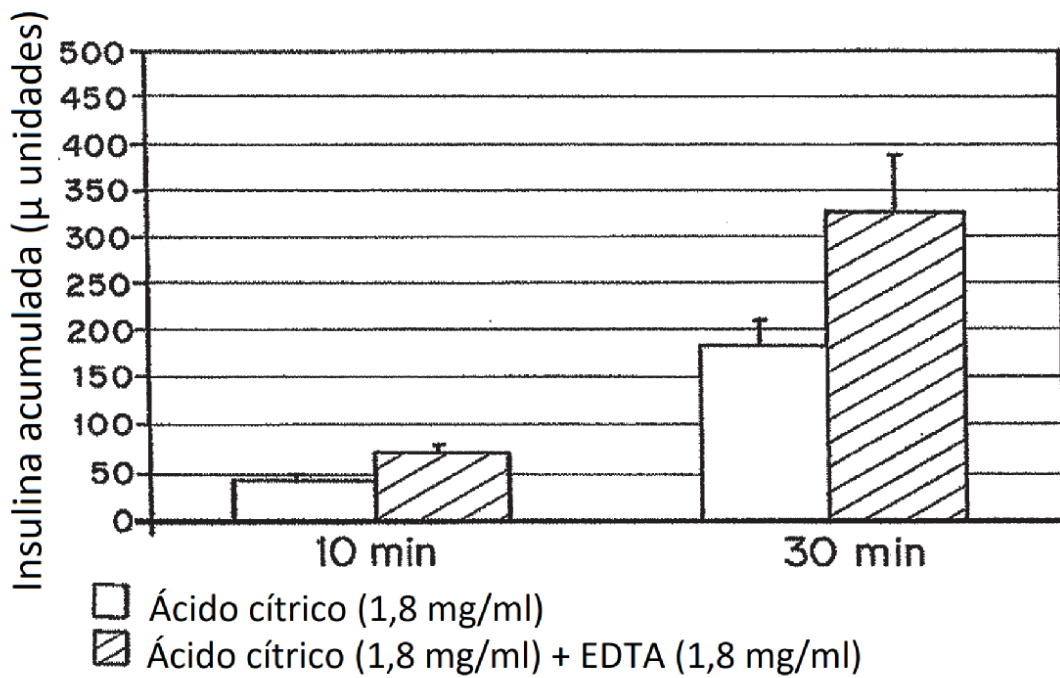


FIG. 4B

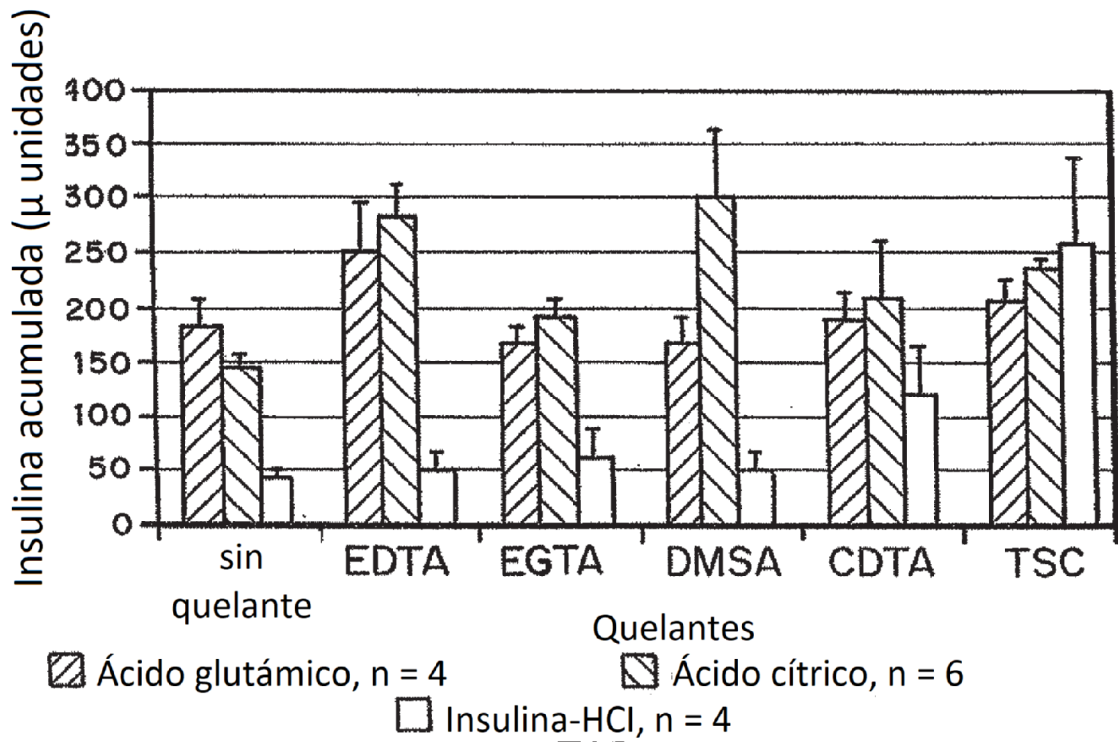


FIG. 5

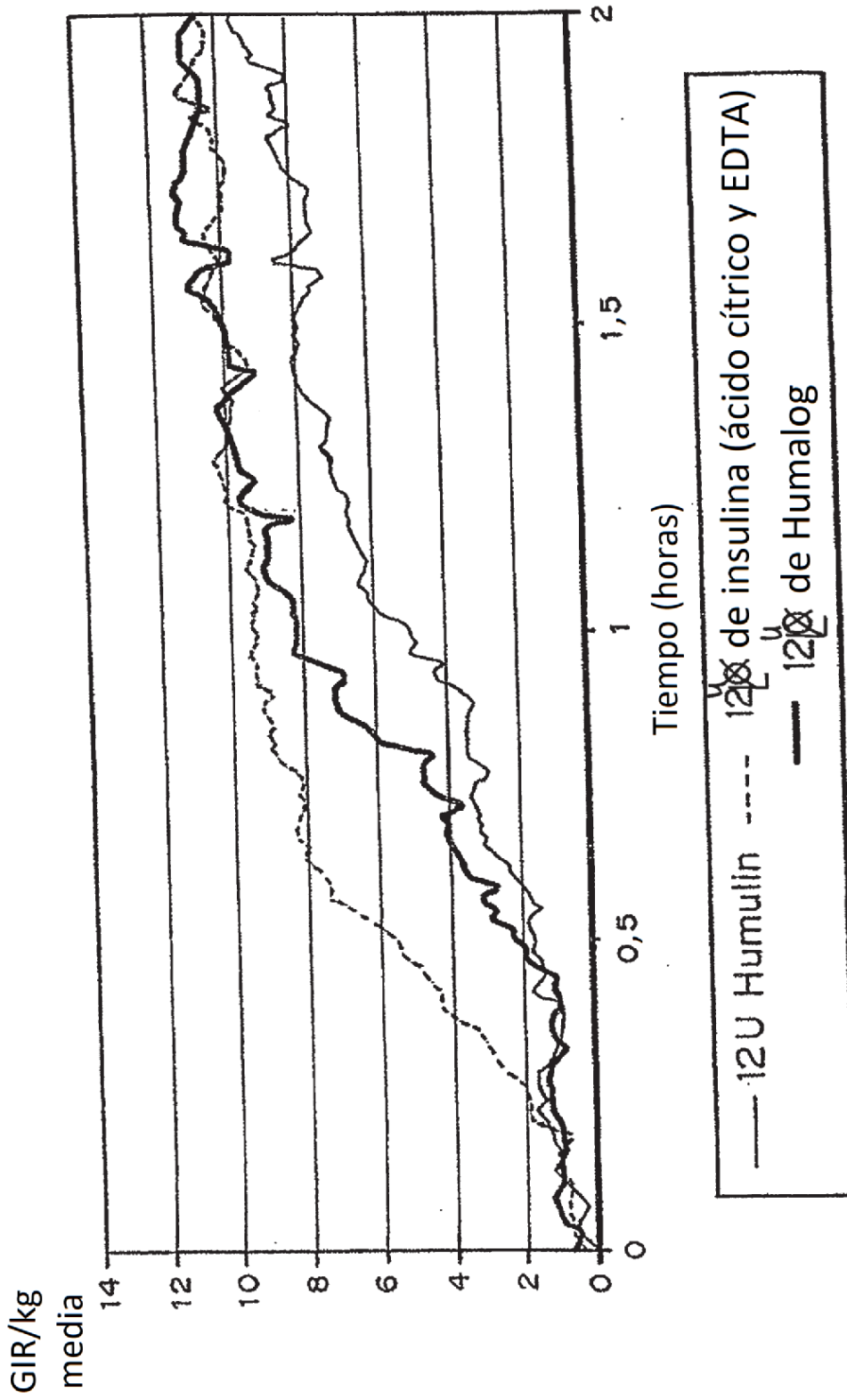


FIGURA 6

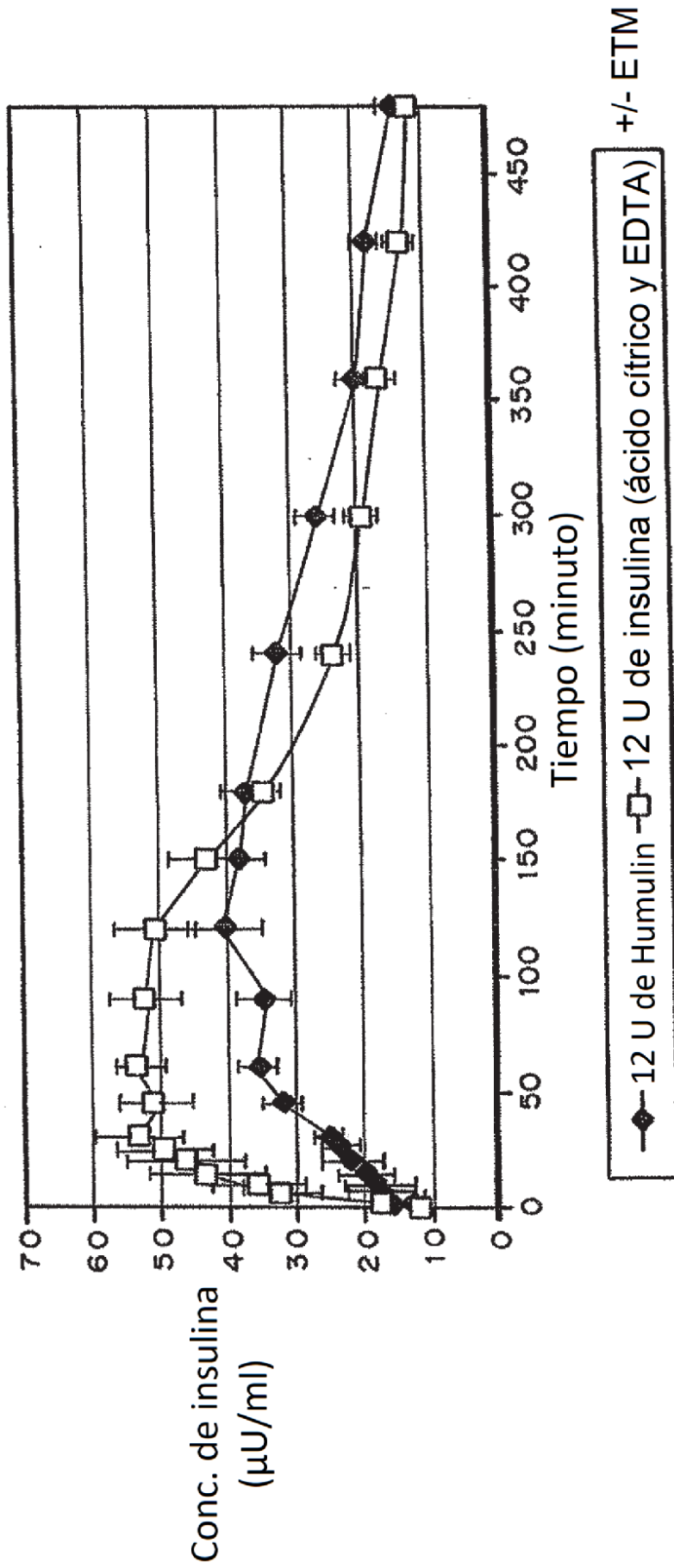


FIGURA 7

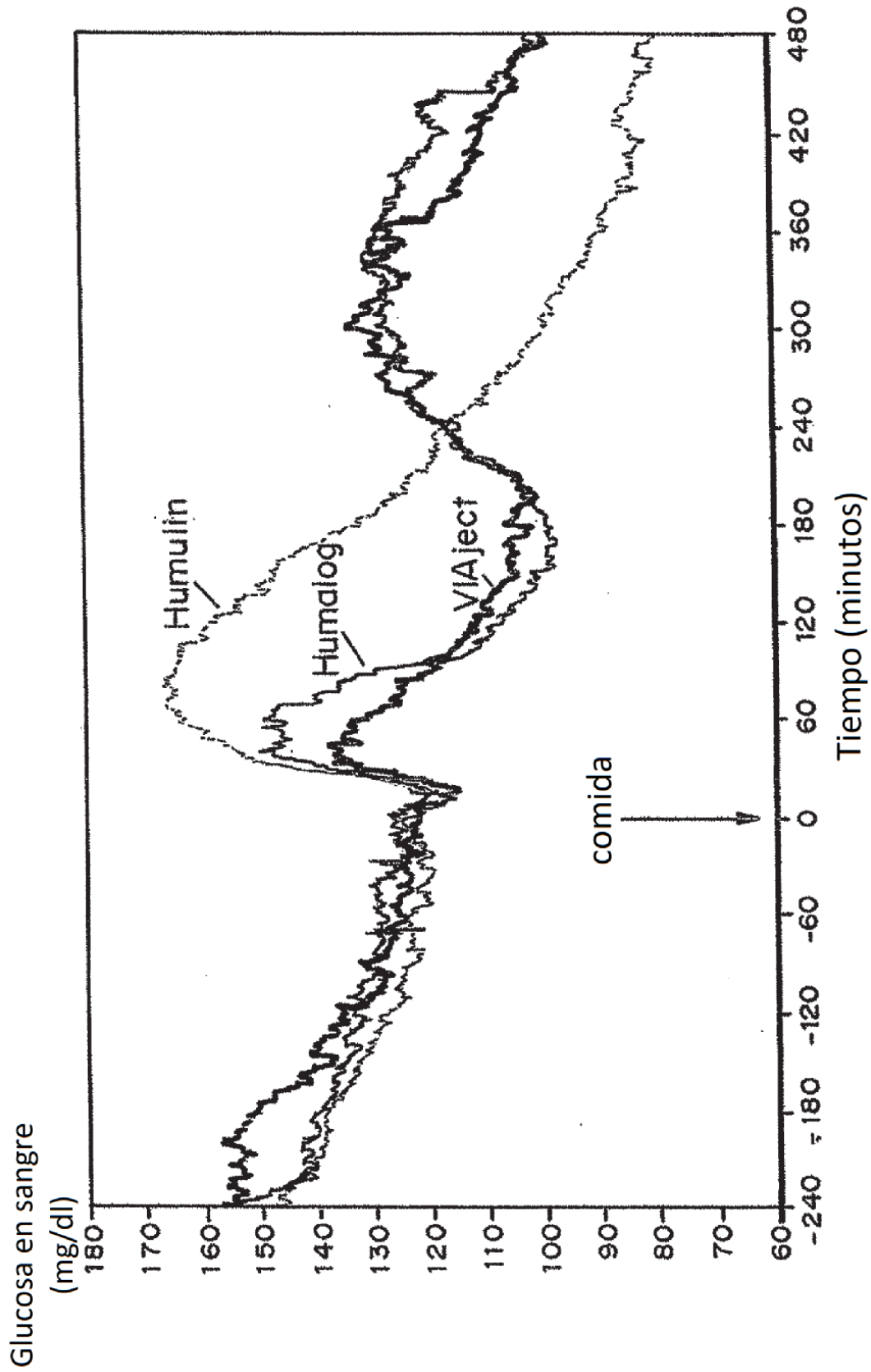


FIGURA 8

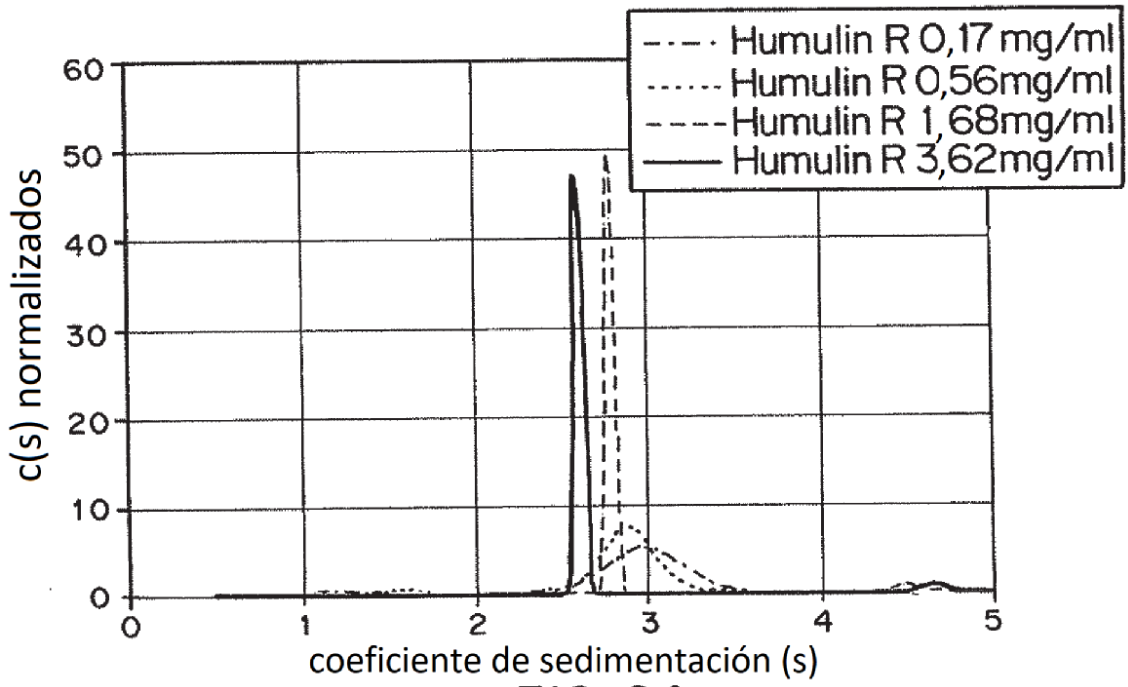


FIG. 9A

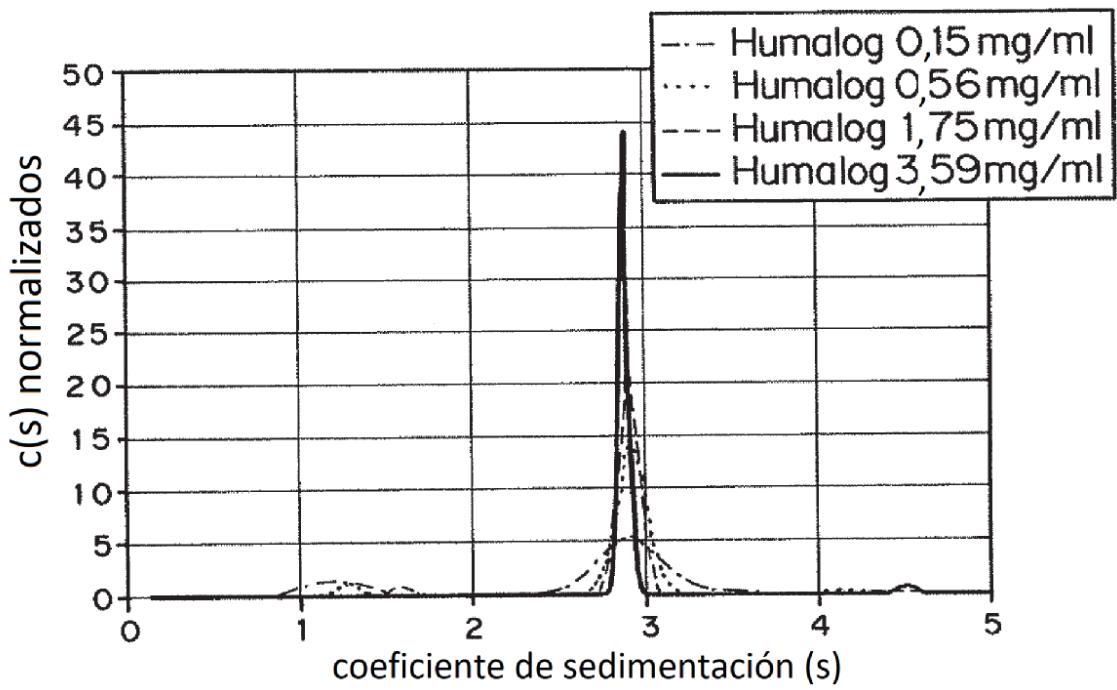


FIG. 9B

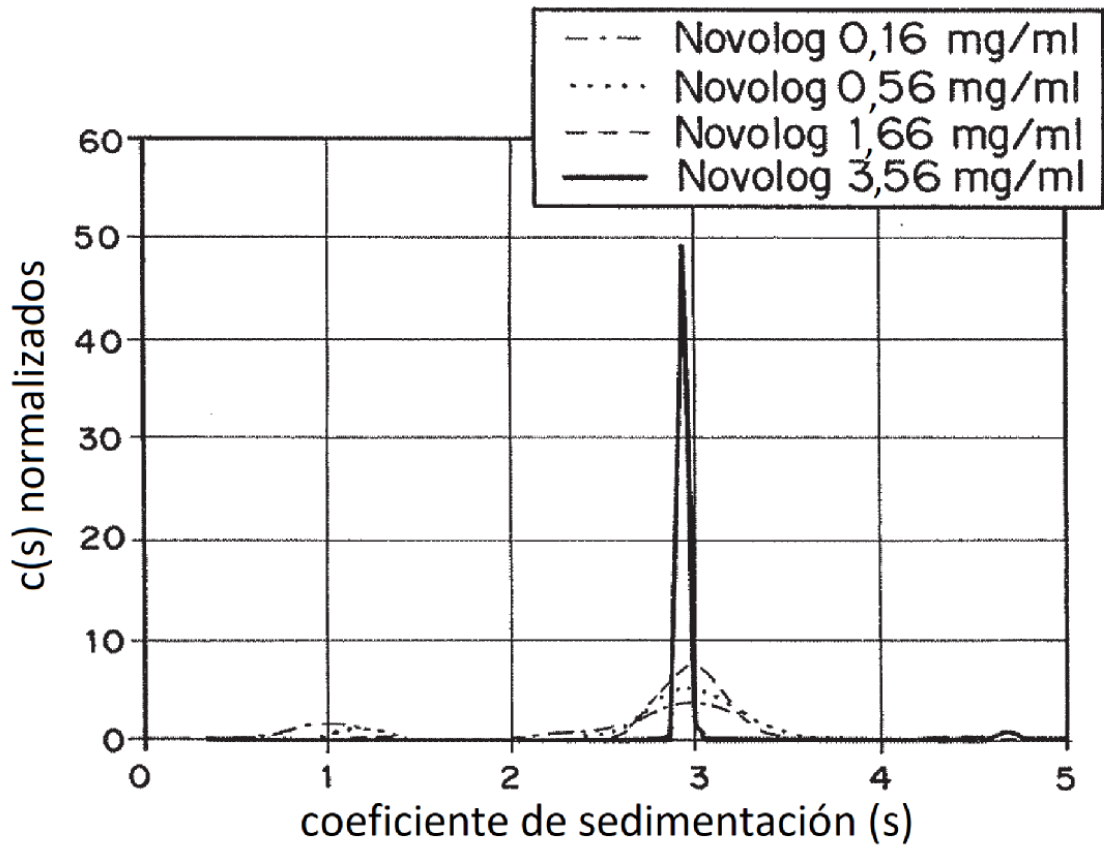


FIG. 9C

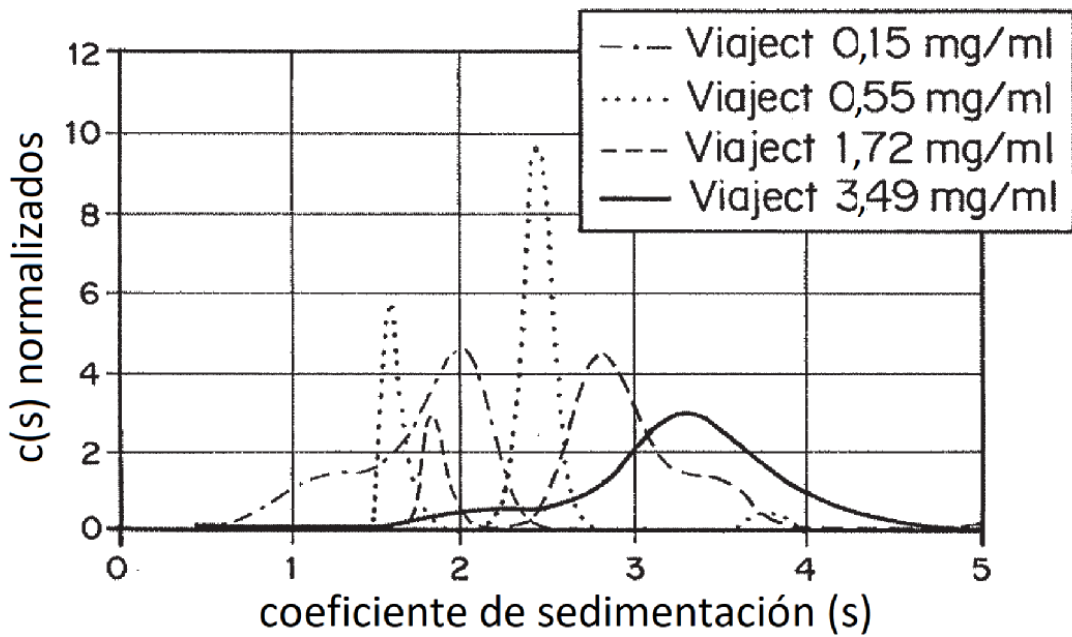


FIG. 9D

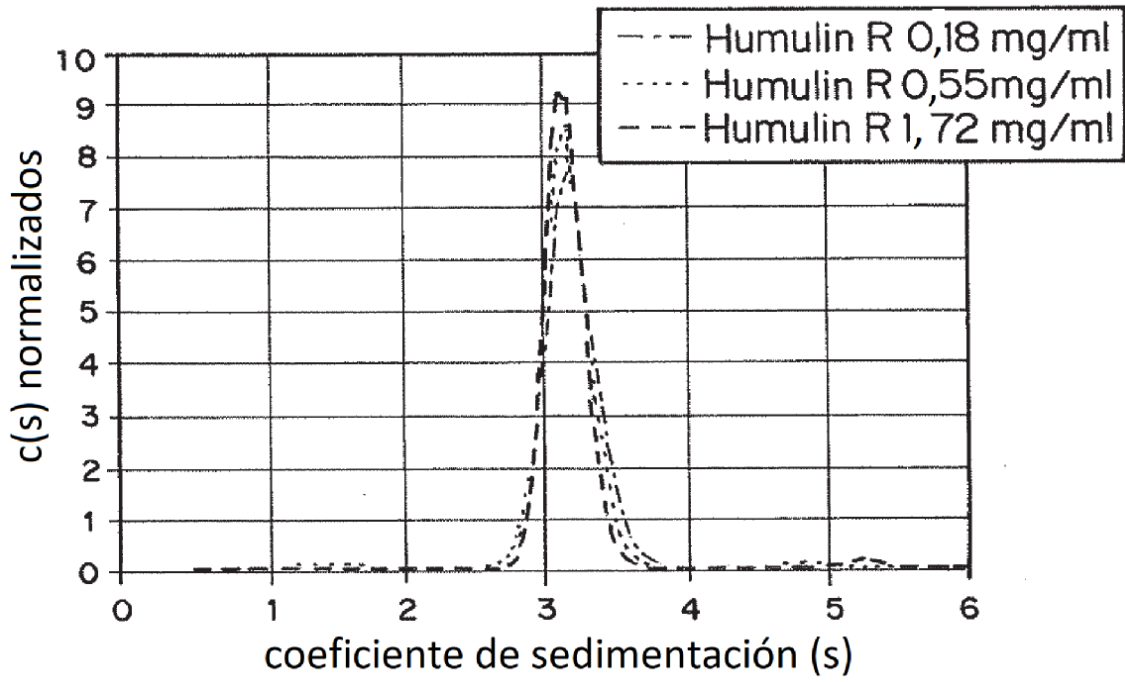


FIG. 10A

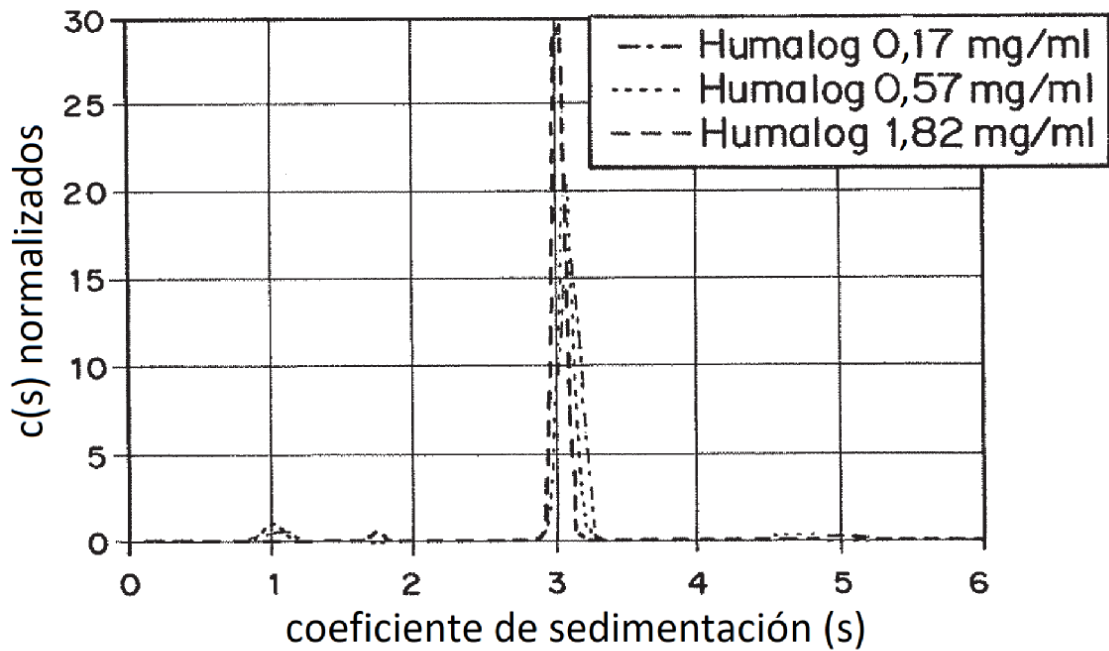
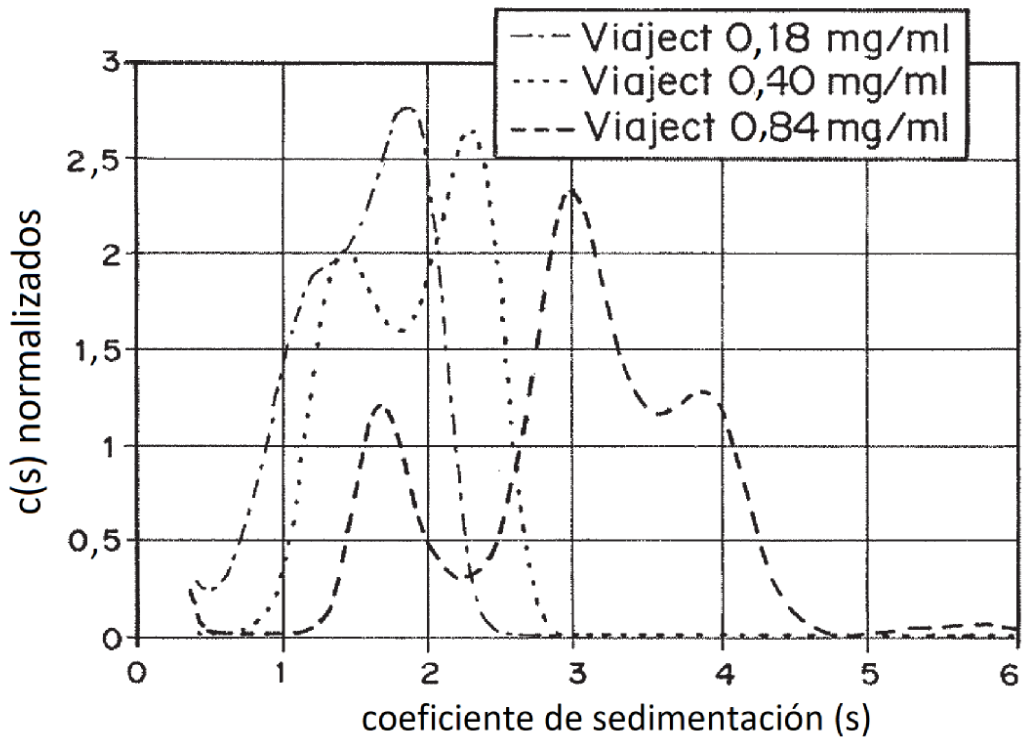
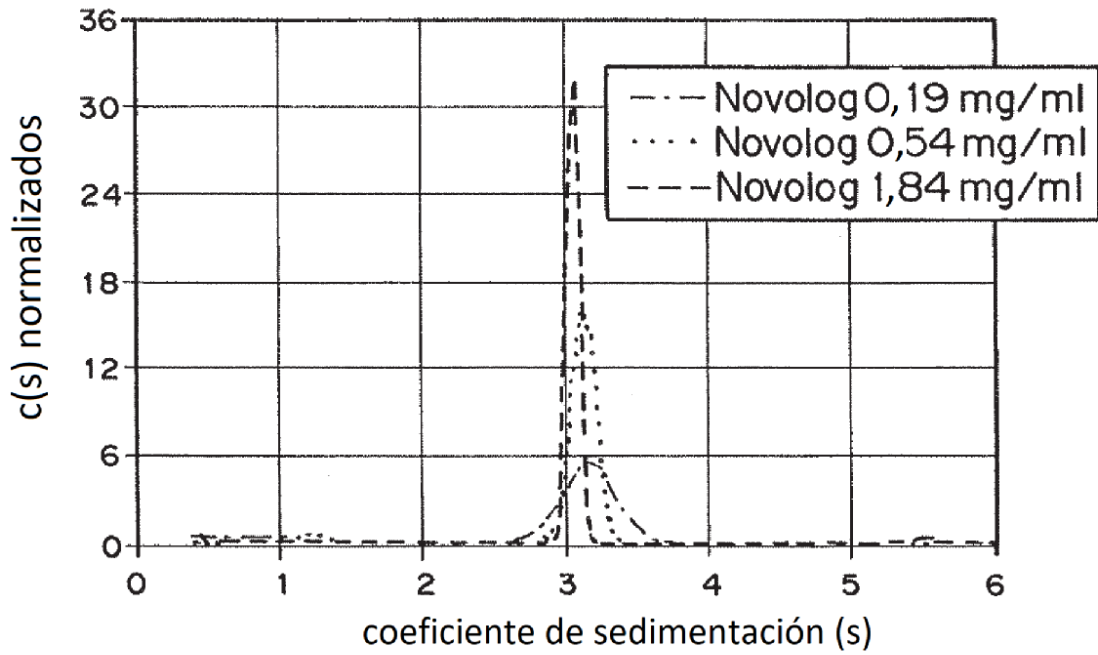


FIG. 10B



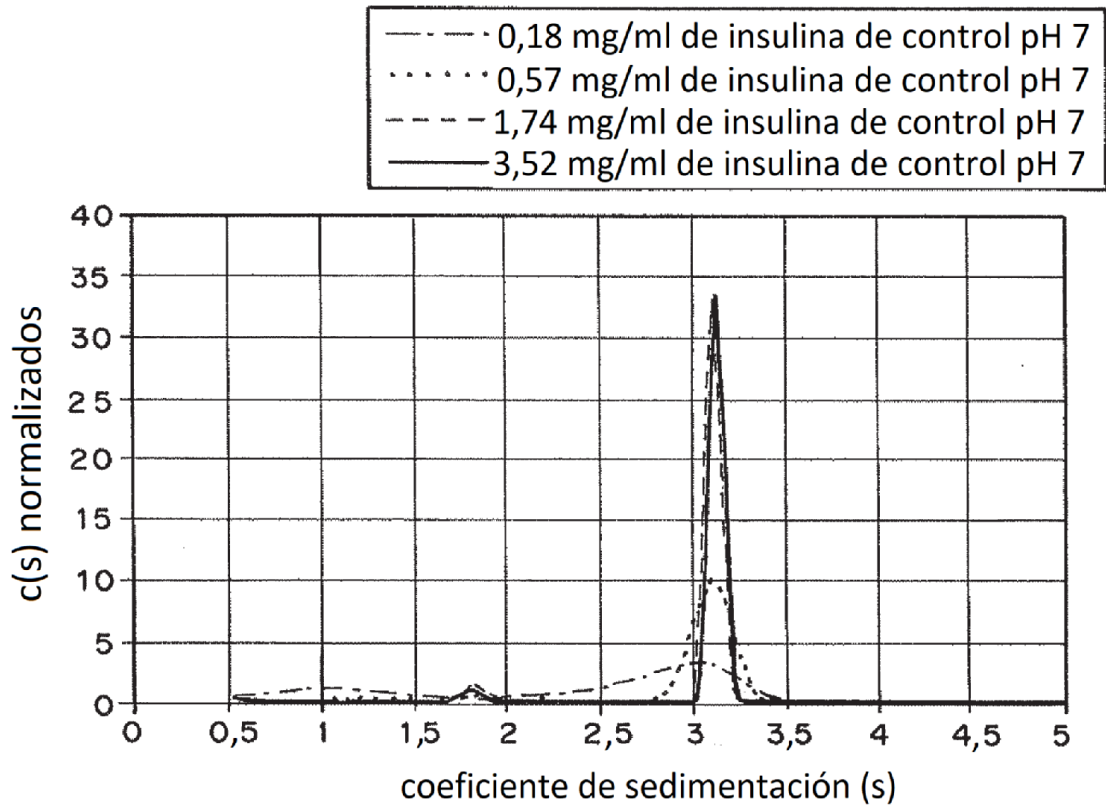


FIG. 11

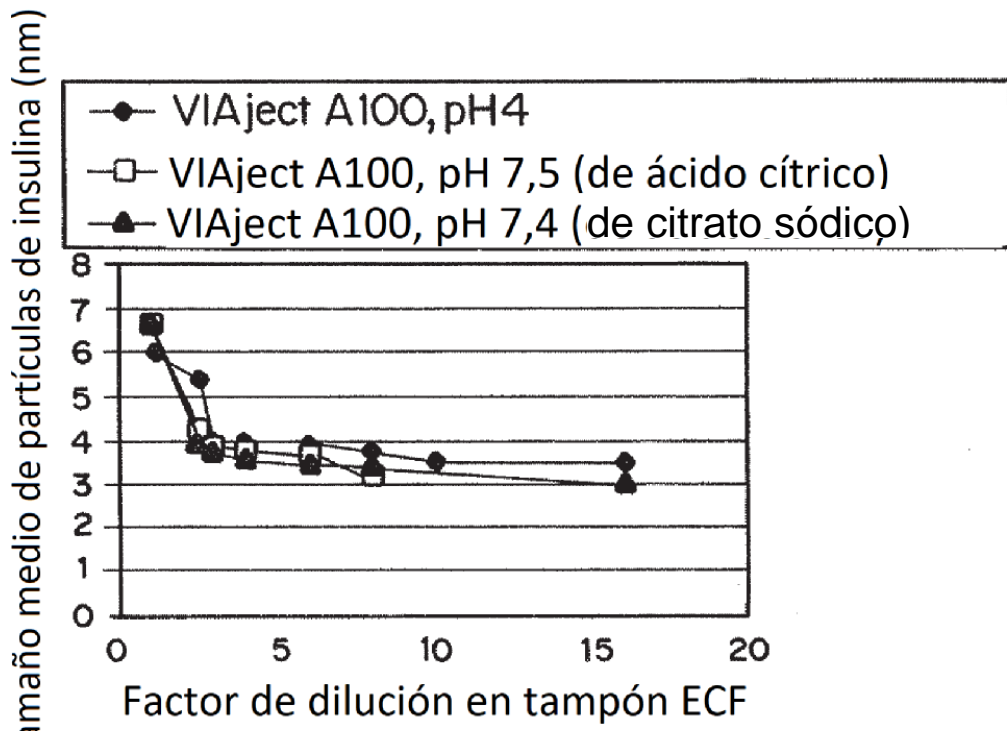


FIG. 12

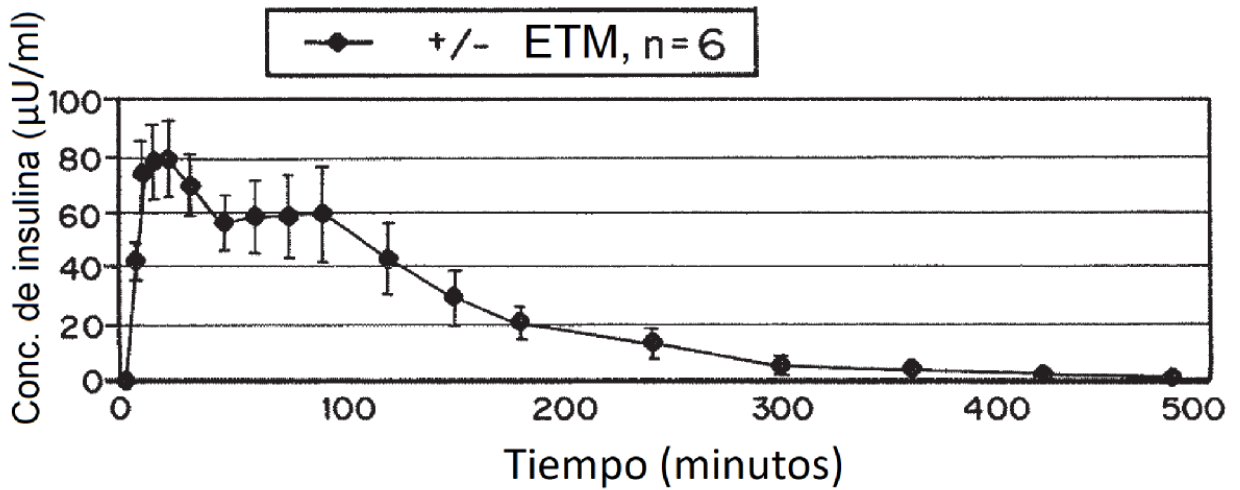


FIG. 13