

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 384**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61K 47/10** (2007.01)  
**A61K 47/12** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2007.01)  
**A61K 31/315** (2006.01)  
**A61K 33/30** (2006.01)  
**A61K 38/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2008 PCT/EP2008/057413**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2008 WO08152106**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2008 E 08774077 (5)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2167032**

54 Título: **Formulación farmacéutica que comprende un derivado de insulina**

30 Prioridad:

**13.06.2007 EP 07110176**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.02.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**POULSEN, CHRISTIAN;  
 HUUS, KASPER;  
 HUBALEK, FRANTISEK;  
 STEENSGAARD, DORTE BJERRE y  
 HAVELUND, SVEND**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 744 384 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 farmacéutica que comprende un derivado de insulina

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas solubles de insulina acilada con un perfil de acción prolongado y alto contenido de zinc y ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina. Además la invención se refiere a un método para producir una composición con un perfil de acción prolongado y alto contenido de zinc y un método para fabricar la composición para el tratamiento de la diabetes.

## Antecedentes de la invención

15 Actualmente, el tratamiento de la diabetes, tanto de la diabetes tipo 1 como la diabetes tipo 2, depende en una medida creciente del llamado tratamiento intensivo con insulina. De acuerdo con este régimen, los pacientes se tratan con múltiples inyecciones de insulina al día que comprenden una o dos inyecciones al día de una insulina de acción prolongada, para cubrir el requerimiento de insulina basal suplementada por inyecciones en bolo de una insulina de acción rápida para cubrir el requerimiento de insulina relacionado con las comidas.

20 La insulina es una hormona peptídica de 51 aminoácidos producida en los islotes de Langerhans en el páncreas. Su función primaria, que actúa como un monómero, es facilitar el transporte de las moléculas de glucosa a través de las membranas celulares del tejido adiposo y muscular al unirse a y activar un receptor transmembrana.

25 Una propiedad distintiva de la insulina es su capacidad para asociarse en hexámeros, en los que la hormona está protegida de la degradación química y física durante la biosíntesis y el almacenamiento. Los estudios cristalográficos de rayos X sobre la insulina muestran que el hexámero consiste en tres dímeros relacionados por un eje de rotación de 3 veces. Estos dímeros se asocian estrechamente a través de la interacción de dos iones de zinc en su núcleo posicionado en el eje de 3 veces. Dos hexámeros de insulina pueden asociarse en complejos de insulina dodecámeros, que pueden asociarse a complejos incluso más grandes, por ejemplo dos, tres o cuatro dodecámeros que forman complejos juntos.

30 La presencia de zinc en las formulaciones de insulina aumenta la tendencia de la autoasociación de la insulina. Cuanto más zinc haya en la formulación, habrá mayor tendencia a que la insulina se autoasocie en hexámeros o incluso en complejos más grandes de insulina en dependencia de las condiciones. Dado que la absorción del lugar de la inyección a través de la pared capilar se correlaciona negativamente con el tamaño del ensamble, (los monómeros se absorben más rápido que los dímeros, que a su vez se absorben más rápido que los hexámeros etc.), la formación de complejos de insulina más grandes aumentará las propiedades clínicas de la insulina hacia un perfil basal.

35 Cuando la insulina humana se inyecta en la hipodermis en la forma de una formulación farmacéutica de alta concentración, esta se autoasocia principalmente a hexámeros, y aquí la disociación en monómeros es relativamente lenta. Los hexámeros y los dímeros de insulina son más lentos para penetrar la pared capilar que los monómeros. Por lo tanto, cuando se inyecta insulina basal se desea tener tantos monómeros presentes como sea posible.

40 La solicitud de patente internacional núm. WO 99/24071 describe un método para prevenir la autoasociación de la insulina en dímeros, tetrámeros y hexámeros. La autoasociación se evita por la presencia de histidina.

45 La solicitud de patente internacional publicada bajo el número WO 2007/041481 se refiere a la formulación que comprende insulina seleccionada del grupo que consiste en insulina de acción intermedia y de acción prolongada con una cantidad efectiva de un quelante y un agente acidificante para mejorar la velocidad o cantidad de captación por un paciente. El quelante puede seleccionarse entre un número de compuestos, por ejemplo, EDTA o ácido cítrico. Se cree que el quelante afeja el zinc de la insulina, lo que favorece de esta manera la forma monomérica de la insulina sobre la forma hexamérica.

El documento núm. WO 2007/074133 describe la composición farmacéutica que comprende una insulina acilada y zinc.

55 Jonassen y otros (Biochemical and Physiological Properties of a Novel Series of Long-Acting Insulin Anogs Obtained by Acylation with cholic Acid Derivatives, PHARMACEUTICAL RESEARCH; vol. 23, núm. 1, 2006, páginas 49-55, XP002449105) describe un estudio que se realizó para evaluar la idoneidad de los análogos de insulina acilados por diversos derivados de ácido cólico para su uso como insulina basal, y para probar el más prometedor de estos, insulina humana LysB29(Népsilon-litocolil-gamma-Glu) des(B30) (NN344) en cerdos.

60 El documento núm. EP 0 925 792 describe composiciones insolubles para controlar la glucosa en sangre.

Sería conveniente tener una formulación soluble de insulina donde la insulina esté presente en la forma de dodecámero.

65

Breve descripción de la invención

La invención se refiere a una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina en donde la formulación comprende además

- 5 a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,  
 b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

10 La invención se refiere a una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina en donde la formulación comprende además

- a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,  
 15 b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad de 0,1 mM a 2 mM suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

En un aspecto la invención describe una formulación farmacéutica soluble estable en almacenamiento que comprende un derivado de insulina en donde la formulación comprende además

- 20 a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina  
 b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

25 En un aspecto la invención describe una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina para su uso como un medicamento, en donde la formulación comprende además

- a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,  
 30 b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

35 En un aspecto la invención se refiere a una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina, en donde la formulación comprende además

- a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,  
 b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros, y  
 c) el derivado de insulina tiene un sustituyente  $-W-X-Y-Z$  unido al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, donde el sustituyente es de la fórmula general:



en donde W es:

- 50 • un residuo de  $\alpha$ -aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral cuyo residuo forma, con uno de sus grupos de ácido carboxílico, un grupo amida junto con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;
- 55 • una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de  $\alpha$ -aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces carbonil amida, cuya cadena – mediante un enlace amida - se une al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos que tienen un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de manera que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; o
- 60 • un enlace covalente de X a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

X es:

- 65 •  $-\underline{CO}-$ ;

- $-\text{CH}(\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;
- 5 •  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;
- 10 •  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;
- $-\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\underline{\text{N}}\text{H}\underline{\text{C}}\text{O}-$  ;
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ; o
- 15 •  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ .

que

20 a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, *mediante* un enlace del carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o

b) cuando W es un enlace covalente, *mediante* un enlace del carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

25 Y es:

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

Z es:

- 35 •  $-\text{COOH}$ ;
- $-\text{CO}-\text{Asp}$ ;
- $-\text{CO}-\text{Glu}$ ;
- 40 •  $-\text{CO}-\text{Gly}$ ;
- $-\text{CO}-\text{Sar}$ ;
- 45 •  $-\text{CH}(\text{COOH})_2$ ;
- $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ ;
- $-\text{SO}_3\text{H}$ ; o
- 50 •  $-\text{PO}_3\text{H}$

siempre que cuando W es un enlace covalente y X es  $-\text{CO}-$ , entonces Z es diferente de  $-\text{COOH}$ .

55 En un aspecto la invención se refiere al uso de ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina en una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina e iones de zinc, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina se usa en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia de dicho derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

60 En un aspecto la invención se refiere a un proceso para preparar una formulación farmacéutica soluble que comprende

- a) proporcionar una fase acuosa que comprende un derivado de insulina,
- b) proporcionar más de aproximadamente 4 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,

c) proporcionar ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse a la forma de dodecámero, mezclar la fase acuosa, los iones de zinc y el ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina para formar una formulación farmacéutica soluble.

5 En un aspecto la invención describe un proceso para preparar una formulación farmacéutica soluble en estable en almacenamiento que comprende

a) proporcionar una fase acuosa que comprende un derivado de insulina

10 b) proporcionar más de aproximadamente 4 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,

c) proporcionar ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse a la forma de dodecámero, mezclar la fase acuosa, los iones de zinc y el ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina para formar una formulación farmacéutica soluble.

#### Descripción de los dibujos

20 Todas las figuras se generan en base a los resultados de cromatografía de exclusión por tamaño de las formulaciones de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30.

Figura 1: Fracción de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 como HMWA contra concentración de zinc y tiempo de almacenamiento a 5 y 37 °C.

25 Figura 2: Fracción de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 como dodecámeros contra concentración de zinc y tiempo de almacenamiento a 5 y 37 °C.

Figura 3: Fracción de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 como monómeros contra concentración de zinc y tiempo de almacenamiento a 37 °C.

30 Figura 4: Fracción de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 como HMWA contra concentración de histidina y tiempo de almacenamiento a 5 y 37 °C.

Figura 5: Fracción de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 como dodecámeros contra concentración de histidina y tiempo de almacenamiento a 5 y 37 °C.

Figura 6: Fracción de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 como monómeros contra concentración de histidina y tiempo de almacenamiento a 37 °C.

40 Figura 7: Fracción de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 como HMWA contra concentración de histidina y tiempo de almacenamiento a 5 y 37 °C.

Figura 8: Fracción de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 como dodecámeros contra concentración de histidina y tiempo de almacenamiento a 5 y 37 °C.

45 Figura 9: Fracción de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 como monómeros contra concentración de histidina y tiempo de almacenamiento a 37 °C.

Figura 10: Fracción de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 como HMWA contra concentración de citrato y tiempo de almacenamiento a 5 y 37 °C.

Figura 11: Fracción de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 como dodecámeros contra concentración de citrato y tiempo de almacenamiento a 5 y 37 °C.

55 Figura 12: Fracción de insulina humana Lysb29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 como monómeros contra concentración de citrato y tiempo de almacenamiento a 37 °C.

#### Definiciones

60 El término "dímero" se refiere a dos moléculas de insulina que se asocian de manera no covalente.

Mediante el uso del término "hexámero" se refiere a seis moléculas de insulina o tres dímeros de insulina asociados de manera no covalente en un complejo de insulina. El complejo puede comprender y se estabilizará por iones tales como iones de zinc o iones de calcio.

65

Mediante el uso del término “dodecámero” se refiere a 12 moléculas de insulina asociadas de manera no covalente en un complejo.

5 El término “asociados de alto peso molecular” o “hmwa” se refiere a un complejo que es más grande que el complejo dodecámero de insulina, es decir, que es más de 12 moléculas de insulina asociadas de manera no covalente en un complejo.

10 El término “compuesto de histidina” como se usa en la presente descripción se refiere al aminoácido L-histidina y D-histidina, así como también a los análogos de los aminoácidos L-histidina y D-histidina. Tales análogos incluyen, sin limitación, dipéptidos y tripéptidos que contienen Histidina, tales como, pero sin limitarse a, His-Gly, Gly-His, Ala-His, 3 metil-His, 1 metil-His, carnosina, His-Ser y His-Ala.

15 El término “compuesto de citrato” como se usa en la presente descripción se refiere al ácido cítrico de ácido carboxílico así como también a sus sales. Tales sales incluyen, sin limitaciones, sales de sodio, sales de potasio, sales de zinc, sales de calcio, sales de magnesio y sales de amonio.

La expresión “compuesto formador de complejos de zinc” se refiere a compuestos de citrato o compuestos de histidina.

20 Mediante el uso de “estable en almacenamiento” en la presente descripción se refiere a que la mayoría de las moléculas de insulina de la formulación farmacéutica están presentes como dodecámeros de insulina y una parte menor de las moléculas de insulina está presente como monómeros de insulina. Por ejemplo la formulación farmacéutica almacenada a 37 °C durante 4 semanas comprende al menos aproximadamente 76 %, al menos aproximadamente 77 %, al menos aproximadamente 78 %, al menos aproximadamente 79 %, al menos aproximadamente 80 % o al  
25 menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o al menos aproximadamente 99,8 %, de las moléculas de insulina en la formulación farmacéutica presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol, y la formulación farmacéutica almacenada a 37 °C durante 4 semanas comprende hasta aproximadamente 5 %, hasta aproximadamente 4,5 %, hasta aproximadamente 4 %, hasta aproximadamente 3,5 %, hasta aproximadamente 3,0 %, hasta  
30 aproximadamente 2,5 %, hasta aproximadamente 2,0 % o hasta aproximadamente 1,5 % de las moléculas de insulina presentes como monómeros de insulina cuando medido por SEC sin fenol.

35 La expresión “SEC con fenol” o “cromatografía de exclusión por tamaño con fenol” se refiere a que una columna TSK-GEL Super SW2000 se usa con elución isocrática con un eluyente que consiste en trishidroximetilaminometano 10 mM, NaCl 140 mM y fenol 2 mM, pH 7,4 a temperatura ambiente y 0,3 ml/min. Los resultados se expresan en % de dodecámero y % de HMWA en base al área relativa del pico de las especies individuales.

40 La expresión “SEC sin fenol” o “cromatografía de exclusión por tamaño sin fenol” se refiere a que una columna Superdex 200 (10/300 GL) se usa con elución isocrática con un eluyente que consiste en trishidroximetilaminometano 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 a temperatura ambiente y 0,5 ml/min. Los resultados se expresan en % de monómero en base al área relativa del pico del pico del monómero.

45 Con “insulina de acción rápida” se refiere a una insulina que tendrá un inicio de acción inmediato cuando se inyecta en la hipodermis.

50 Por “análogo de insulina” como se usa en la presente descripción se refiere a un polipéptido que tiene una estructura molecular que puede derivarse formalmente de la estructura de una insulina de origen natural, por ejemplo, la de la insulina humana, mediante la deleción y/o el intercambio de al menos un residuo de aminoácido que aparece en la insulina de origen natural y/o la adición de al menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos adicionados y/o intercambiados pueden ser residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de origen natural o residuos de aminoácidos puramente sintéticos.

55 En aspectos de la invención se han modificado un máximo de 17 aminoácidos. En aspectos de la invención se han modificado un máximo de 15 aminoácidos. En aspectos de la invención se han modificado un máximo de 10 aminoácidos. En aspectos de la invención se han modificado un máximo de 8 aminoácidos. En aspectos de la invención se han modificado un máximo de 7 aminoácidos. En aspectos de la invención se han modificado un máximo de 6 aminoácidos. En aspectos de la invención se han modificado un máximo de 5 aminoácidos. En aspectos de la invención se han modificado un máximo de 4 aminoácidos. En aspectos de la invención se han modificado un máximo de 3 aminoácidos. En aspectos de la invención se han modificado un máximo de 2 aminoácidos. En aspectos de la invención se ha modificado 1 aminoácido.  
60

65 Con “insulina desB30”, “insulina humana desB30” se refiere a una insulina natural o un análogo de la misma que carece del residuo de aminoácido B30. De manera similar, “insulina desB29desB30” o “insulina humana desB29desB30” se refiere a una insulina natural o un análogo de la misma que carece de los residuos de aminoácidos B29 y B30.

Con "B1", "A1" etc. se refiere al residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena B de insulina (contado desde el extremo N terminal) y el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena A de insulina (contado desde el extremo N terminal), respectivamente. El residuo de aminoácido en una posición específica puede denotarse además como por ejemplo PheB1 lo que significa que el residuo de aminoácido en la posición B1 es un residuo de fenilalanina.

5 Con "insulina" como se usa en la presente descripción se refiere a insulina humana, insulina porcina o insulina bovina con puentes disulfuro entre CysA7 y CysB7 y entre CysA20 y CysB19 y un puente disulfuro interno entre CysA6 y CysA11.

10 Por "insulina parental" se refiere a una insulina de origen natural tal como insulina humana o insulina porcina. Alternativamente, la insulina parental puede ser un análogo de insulina.

15 El término "sin reducción" como se usa en la presente significa que cuando se formula en una formulación tanto la insulina de acción rápida como la insulina acilada tiene un perfil de acción que es idéntico o sustancialmente idéntico al perfil de acción, cuando se administra la insulina de acción rápida y la insulina acilada en formulaciones separadas.

Las siguientes abreviaturas se han usado en la descripción y los ejemplos:

20	HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
	SEC	cromatografía de exclusión por tamaño
	Tris	tris(hidroximetil)aminometano
25	Zn <sup>2+</sup> /6ins	iones de zinc por 6 moléculas de derivados de insulina

#### Descripción de la invención

30 La invención se basa en el reconocimiento de que la presencia de ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina en una formulación farmacéutica soluble que comprende una cantidad relativamente alta de iones de zinc aumenta la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros. La mayoría del derivado de insulina en la formulación farmacéutica soluble de la invención está presente por lo tanto en la forma de dodecámero lo que resulta en una formulación con una distribución uniforme de derivados de insulina autoasociados.

35 La invención se refiere a una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina en donde la formulación comprende además

- a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,
- 40 b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

En un aspecto la invención describe una formulación farmacéutica soluble estable en almacenamiento que comprende un derivado de insulina en donde la formulación comprende además

- 45 a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina
- b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

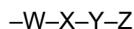
50 En un aspecto la invención describe una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina para su uso como un medicamento, en donde la formulación comprende además

- 55 a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,
- b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

60 En un aspecto la invención se refiere a una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina, en donde la formulación comprende además

- a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,
- 65 b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros, y

c) el derivado de insulina tiene un sustituyente  $-W-X-Y-Z$  unido al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, donde el sustituyente es de la fórmula general:



5

en donde W es:

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

15 • una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de  $\alpha$ -aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces carbonil amida, cuya cadena – mediante un enlace amida - se une al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos que tienen un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de manera que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; o

20 • un enlace covalente de X a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

• X es:

25 •  $-\underline{\text{CO}}-$ ;

•  $-\text{CH}(\text{COOH})\underline{\text{CO}}-$ ;

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

30 •  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{CO}}-$ ;

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

35 •  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}-$ ;

•  $-\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\underline{\text{NHCO}}-$  ;

•  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{CO}}-$ ; o

40 •  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}-$ .

que

45 a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, *mediante* un enlace del carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o

b) cuando W es un enlace covalente, *mediante* un enlace del carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

50 Y es:

•  $-(\text{CH}_2)_m-$  donde m es un número entero en el intervalo de 6 a 32;

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

• Z es:

60 •  $-\text{COOH}$ ;

•  $-\text{CO}-\text{Asp}$ ;

•  $-\text{CO}-\text{Glu}$ ;

65 •  $-\text{CO}-\text{Gly}$ ;

- $-\text{CO}-\text{Sar}$ ;
- $-\text{CH}(\text{COOH})_2$ ;
- 5 •  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ ;
- $-\text{SO}_3\text{H}$ ; o
- $-\text{PO}_3\text{H}$

10 siempre que cuando W es un enlace covalente y X es  $-\text{CO}-$ , entonces Z es diferente de  $-\text{COOH}$ .

15 En un aspecto la invención se refiere al uso de ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina en una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina e iones de zinc, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina se usa en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia de dicho derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

20 En un aspecto la invención se refiere a un proceso para preparar una formulación farmacéutica soluble que comprende

- a) proporcionar una fase acuosa que comprende un derivado de insulina,
- b) proporcionar más de aproximadamente 4 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,
- 25 c) proporcionar ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse a la forma de dodecámero, mezclar la fase acuosa, los iones de zinc y el ácido cítrico monohidrato o el compuesto de histidina para formar una formulación farmacéutica soluble.

30 En un aspecto la invención describe un proceso para preparar una formulación farmacéutica soluble en estable en almacenamiento que comprende

- a) proporcionar una fase acuosa que comprende un derivado de insulina
- 35 b) proporcionar más de aproximadamente 4 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,
- c) proporcionar un ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse a la forma de dodecámero, mezclar la fase acuosa, los iones de zinc y el ácido cítrico monohidrato o el compuesto de histidina para formar una formulación farmacéutica soluble.

40 La invención se resume en los siguientes párrafos:

45 1. Una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina en donde la formulación comprende además

- a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,
- 50 b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

2. Una formulación farmacéutica soluble estable en almacenamiento que comprende un derivado de insulina en donde la formulación comprende además

- 55 a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina
- b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

60 3. Una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina para su uso como un medicamento, en donde la formulación comprende además

- a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,

b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

5 4. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1, 2 o 3, en donde la formulación comprende más de 4,3 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 4,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 4,7 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 4,9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 5,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 6,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 7,0 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o más de 7,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

10 5. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-4, en donde la formulación comprende hasta 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

15 6. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-5, en donde la formulación farmacéutica comprende entre 4,3 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 4,5 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 4,7 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 4,9 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 5 y 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 5,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 6 y 10,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 6,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o entre 7 y 9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

20 7. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-6, en donde la relación molar entre el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina e iones de zinc es de 0,05 a 10.

25 8. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-7, en donde la relación molar entre el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina e iones de zinc es de 0,1 a 2, de 0,1 a 1 o de 0,2 a 1.

30 9. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-8, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad hasta 4 mM.

35 10. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-9, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina se encuentra presente en una cantidad de 0,05 mM a 4 mM, de 0,1 mM a 2 mM o de 0,1 a 1,8 mM.

11. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-10, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad hasta 1 mM.

40 12. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-11, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad de 0,05 mM a 0,95 mM.

45 13. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-12, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad de 0,1 mM a 0,9 mM, de 0,1 mM a 0,8 mM, de 0,1 mM a 0,7 mM, de 0,1 mM a 0,6 mM, de 0,2 mM a 0,9 mM o de 0,2 mM a 0,8 mM.

14. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-13, en donde al menos 76 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.

50 15. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-14, en donde al menos 77 %, al menos 78 %, al menos 79 %, al menos 80 % o al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 99,8 % de las moléculas de insulina en la formulación farmacéutica están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.

55 16. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-17, en donde hasta 5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.

60 17. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-16, en donde hasta 4,5 %, hasta 4 %, hasta 3,5 %, hasta 3,0 %, hasta 2,5 %, hasta 2,0 % o hasta 1,5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.

65 18. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-17, en donde el compuesto de histidina es dipéptidos que contienen histidina o tripéptidos que contienen histidina,

19. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 18, en donde el compuesto de histidina es L-histidina.

20. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-19, en donde el derivado de insulina se selecciona del grupo que consiste en derivados de insulina de insulina humana, derivados de insulina de insulina humana desB30, derivados de insulina de análogos de insulina, insulina humana acilada, insulina humana desB30 acilada, análogos de insulina acilada, insulina bovina acilada e insulina porcina acilada.

21. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 1-20, en donde el derivado de insulina tiene un sustituyente  $-W-X-Y-Z$  unido al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, donde el sustituyente es de la fórmula general:  $-W-X-Y-Z$

en donde W es:

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

- una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de  $\alpha$ -aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces carbonilo amida, cuya cadena – mediante un enlace amida - se une al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos que tienen un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de manera que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; o

- un enlace covalente de X a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

- X es:

- $-\underline{\text{CO}}-$ ;

- $-\text{CH}(\text{COOH})\underline{\text{CO}}-$ ;

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

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

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

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

- $-\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\underline{\text{NHCO}}-$ ;

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

- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}-$ .

que

a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, *mediante* un enlace del carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o

b) cuando W es un enlace covalente, *mediante* un enlace del carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

Y es:

- $-(\text{CH}_2)_m-$  donde m es un número entero en el intervalo de 6 a 32;

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

Z es:

- $-\text{COOH}$ ;

- $-\text{CO}-\text{Asp}$ ;

- -CO-Glu;
  - -CO-Gly;
  - 5 • -CO-Sar;
  - -CH(COOH)<sub>2</sub>;
  - 10 • -N(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub>;
  - -SO<sub>3</sub>H; o
  - -PO<sub>3</sub>H
- 15 siempre que cuando W es un enlace covalente y X es -CO-, entonces Z es diferente de -COOH.

22. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 21, en donde la formulación comprende un derivado de insulina seleccionado del grupo que consiste en

- 20 insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 25 insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 30 insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu-N-( $\gamma$ -Glu)) des(B30);
- insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 35 insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO-) des(B30);
- insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO-) des(B30);
- 40 insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\alpha$ -Glu-N-( $\beta$ -Asp)) des(B30);
- insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Gly-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 45 insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Sar-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)-  $\beta$ -Asp) des(B30);
- 50 insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)-  $\beta$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -D-Glu) des(B30) ;
- insulina humana N<sup>εB29</sup>-hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30; y
- 55 insulina humana N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-  $\beta$ -D-Asp) des(B30)

23. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-20, en donde el derivado de insulina es insulina humana N<sup>εB29</sup>- $\omega$ -carboxi-pentadecanoil- $\gamma$ -L-glutamilamida desB30 o insulina humana N<sup>εB29</sup>- $\omega$ -carboxi-pentadecanoil- $\gamma$ -amino-butanil desB30.

24. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-23, en donde la formulación farmacéutica comprende además una insulina de acción rápida.

25. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 24, en donde la insulina de acción rápida es insulina humana AspB28, insulina humana LysB3GluB29 y/o insulina humana LysB28ProB29.

5 26. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-25, en donde la formulación farmacéutica comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en conservantes, tampones, estabilizadores, agentes espesantes, portadores, agente isotónico y tensioactivos.

10 27. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-26, en donde el pH de la formulación está en el intervalo de 6,5 a 8,5.

28. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-27, en donde el pH de la formulación está en el intervalo de 7,0 a 8,0 o de 7,4 a 7,6.

15 29. Una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina, en donde la formulación comprende además

a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,

20 b) un ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros, y

c) el derivado de insulina tiene un sustituyente  $-W-X-Y-Z$  unido al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, donde el sustituyente es de la fórmula general:  $-W-X-Y-Z$

25 en donde W es:

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

30 • una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de  $\alpha$ -aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces carbonil amida, cuya cadena – mediante un enlace amida - se une al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos que tienen un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de manera que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; o

• un enlace covalente de X a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

40 X es:

$-\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

45  $-\text{CH}(\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

$-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

50  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

$-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

55  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

$-\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\underline{\text{N}}\text{H}\text{CO}-$  ;

$-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ; o

60  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ .

que

a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, *mediante* un enlace del carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o

65

b) cuando W es un enlace covalente, *mediante* un enlace del carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con el grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

Y es:

- 5
- $-(CH_2)_m-$  donde m es un número entero en el intervalo de 6 a 32;
  - una cadena hidrocarbonada divalente que comprende 1, 2 o 3 grupos  $-CH=CH-$  y un número de grupos  $-CH_2-$  suficiente para proporcionar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32; y

10

Z es:

- $-COOH$ ;
- 15 •  $-CO-Asp$ ;
- $-CO-Glu$ ;
- $-CO-Gly$ ;
- 20 •  $-CO-Sar$ ;
- $-CH(COOH)_2$ ;
- 25 •  $-N(CH_2COOH)_2$ ;
- $-SO_3H$ ; o
- $-PO_3H$

30

siempre que cuando W es un enlace covalente y X es  $-CO-$ , entonces Z es diferente de  $-COOH$ .

30. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 29, en donde la formulación comprende más de 4,3 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 4,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 4,7 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 4,9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 5,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 6,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 7,0 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o más de 7,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

40

31. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-30, en donde la formulación comprende hasta 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

45 32. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-31, en donde la formulación farmacéutica comprende entre 4,3 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 4,5 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 4,7 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 4,9 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 5 y 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 5,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 6 y 10,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 6,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o entre 7 y 9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

50

33. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-32, en donde la relación molar entre el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina e iones de zinc es de 0,05 a 10.

55 34. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-33, en donde la relación molar entre el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina e iones de zinc es de 0,1 a 2, de 0,1 a 1 o de 0,2 a 1.

35. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-34, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad hasta 4 mM.

60

36. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 39-35, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina se encuentra presente en una cantidad de 0,05 mM a 4 mM, de 0,1 mM a 2 mM o de 0,1 a 1,8 mM.

65

37. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-36, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad hasta 1mM.
- 5 38. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-37, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad de 0,05 mM a 0,95 mM.
39. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-38, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina está presente en una cantidad de 0,1 mM a 0,9 mM, de 0,1 mM a 0,8 mM o de 0,1 mM a 0,7 mM, o de 0,1 mM a 0,6 mM o de 0,2 mM a 0,9 mM o de 0,2 mM a 0,8 mM.
- 10 40. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-39, en donde al menos 76 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 15 41. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-40, en donde al menos 77 %, al menos 78 %, al menos 79 %, al menos 80 % o al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 99,8 % de las moléculas de insulina en la formulación farmacéutica están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 20 42. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-41, en donde hasta 5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 25 43. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-42, en donde hasta 4,5 %, hasta 4 %, hasta 3,5 %, hasta 3,0 %, hasta 2,5 %, hasta 2,0 % o hasta 1,5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 30 44. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-43, en donde el compuesto de histidina es dipéptidos que contienen histidina o tripéptidos que contienen histidina,
45. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 29-44, en donde el compuesto de histidina es L-histidina.
- 35 46. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-45, en donde la formulación comprende un derivado de insulina seleccionado del grupo que consiste en
- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 40 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 45 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu-N-( $\gamma$ -Glu)) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 50 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO-) des(B30);
- 55 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO-) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\alpha$ -Glu-N-( $\beta$ -Asp)) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Gly-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 60 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Sar-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 65 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\beta$ -Asp) des(B30);

insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)-β-Glu) des(B30);

insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)-γ-D-Glu) des(B30) ;

insulina humana N<sup>ε</sup>B29-hexadecandioil-γ-Glu desB30; y

insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-β-D-Asp) des(B30)

10 47. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-46, en donde la formulación farmacéutica comprende además una insulina de acción rápida.

15 48. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 47, en donde la insulina de acción rápida es insulina humana AspB28, insulina humana LysB3GluB29 y/o insulina humana LysB28ProB29.

49. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-48, en donde la formulación farmacéutica comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en conservantes, tampones, estabilizadores, agentes espesantes, portadores, agente isotónico y tensioactivos.

20 50. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-49, en donde el pH de la formulación está en el intervalo de 6,5 a 8,5.

25 51. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 29-50, en donde el pH de la formulación está en el intervalo de 7,0 a 8,0 o de 7,4 a 7,6.

30 52. El uso de un ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina en una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina e iones de zinc, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina se usa en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia de dicho derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

53. El uso de acuerdo con el párrafo 52, en donde la formulación farmacéutica comprende más de 4 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

35 54. El uso de acuerdo con los párrafos 52-53, en donde la formulación comprende más de 4,3 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 4,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 4,7 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 4,9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 5,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 6,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 7,0 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o más de 7,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

40 55. El uso de acuerdo con los párrafos 52-54, en donde la formulación comprende hasta 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

45 56. El uso de acuerdo con los párrafos 52-55, en donde la formulación farmacéutica comprende entre 4,3 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 4,5 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 4,7 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 4,9 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 5 y 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 5,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 6 y 10,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 6,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o entre 7 y 9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

50 57. El uso de acuerdo con los párrafos 52-56, en donde la relación molar entre el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina e iones de zinc es de 0,05 a 10.

55 58. El uso de acuerdo con los párrafos 52-57, en donde la relación molar entre el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina e iones de zinc es de 0,1 a 2, de 0,1 a 1 o de 0,2 a 1.

60 59. El uso de acuerdo con los párrafos 52-58, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad hasta 4 mM.

60 60. El uso de acuerdo con los párrafos 52-59, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad de 0,05 mM a 4 mM, de 0,1 mM a 2 mM o de 0,1 a 1,8 mM.

65 61. El uso de acuerdo con los párrafos 52-60, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad hasta 1mM.

62. El uso de acuerdo con los párrafos 52-61, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad de 0,05 mM a 0,95 mM.
- 5 63. El uso de acuerdo con los párrafos 52-62, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad de 0,1 mM a 0,9 mM, de 0,1 mM a 0,8 mM o de 0,1 mM a 0,7 mM, o de 0,1 mM a 0,6 mM o de 0,2 mM a 0,9 mM o de 0,2 mM a 0,8 mM.
- 10 64. El uso de acuerdo con los párrafos 52-63, en donde al menos 76 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como dodecámeros cuando se miden por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 15 65. El uso de acuerdo con los párrafos 52-64, en donde al menos 77 %, al menos 78 %, al menos 79 %, al menos 80 % o al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 99,8 % de las moléculas de insulina en la formulación farmacéutica están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 20 66. El uso de acuerdo con los párrafos 52-65, en donde hasta 5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 25 67. El uso de acuerdo con los párrafos 52-66, en donde hasta 4,5 %, hasta 4 %, hasta 3,5 %, hasta 3,0 %, hasta 2,5 %, hasta 2,0 % o hasta 1,5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 30 68. El uso de acuerdo con los párrafos 52-67, en donde el compuesto de histidina es dipéptidos que contienen histidina o tripéptidos que contienen histidina,
- 35 69. El uso de acuerdo con el párrafo 52-68, en donde el compuesto de histidina es L-histidina.
- 40 70. El uso de acuerdo con los párrafos 52-69, en donde el derivado de insulina tiene un sustituyente –W–X–Y–Z unido al grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, donde el sustituyente es de la fórmula general: –W–X–Y–Z
- 45 en donde W es:
- un residuo de α-aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral cuyo residuo forma, con uno de sus grupos de ácido carboxílico, un grupo amida junto con el grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;
  - una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de α-aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces carbonil amida, cuya cadena – mediante un enlace amida - se une al grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos que tienen un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de manera que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; o
  - un enlace covalente de X a un grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;
- 50 X es:
- –CO–;
  - –CH(COOH)CO–;
  - 55 • –CO –N(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CO–;
  - –CO –N(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CON(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CO–;
  - 60 • –CO –N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO–;
  - –CO –N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CON(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO–;
  - 65 • –CO –NHCH(COOH)(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCO– ;

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

5 que

a) cuando *W* es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, *mediante* un enlace del carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en *W*, o

10 b) cuando *W* es un enlace covalente, *mediante* un enlace del carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

Y es:

- 15
- $-(\text{CH}_2)_m-$  donde *m* es un número entero en el intervalo de 6 a 32;
  - una cadena hidrocarbonada divalente que comprende 1, 2 o 3 grupos  $-\text{CH}=\text{CH}-$  y un número de grupos  $-\text{CH}_2-$  suficiente para proporcionar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32; Y

20 Z es:

- $-\text{COOH}$ ;
- $-\text{CO}-\text{Asp}$ ;

25

- $-\text{CO}-\text{Glu}$ ;
- $-\text{CO}-\text{Gly}$ ;

30

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

35

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

40 siempre que cuando *W* es un enlace covalente y *X* es  $-\text{CO}-$ , entonces *Z* es diferente de  $-\text{COOH}$ .

71. El uso de acuerdo con los párrafos 52-70, en donde el derivado de insulina se selecciona del grupo que consiste en

45 insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^\alpha-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\underline{\gamma}\text{-Glu}) \text{ des}(\text{B}30)$ ;

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^\alpha-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{15}\text{CO})-\underline{\gamma}\text{-Glu}) \text{ des}(\text{B}30)$ ;

50 insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^\alpha-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\underline{\gamma}\text{-Glu}) \text{ des}(\text{B}30)$ ;

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^\alpha-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{17}\text{CO})-\underline{\gamma}\text{-Glu}) \text{ des}(\text{B}30)$ ;

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^\alpha-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO})-\underline{\gamma}\text{-Glu}) \text{ des}(\text{B}30)$ ;

55 insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^\alpha-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\underline{\gamma}\text{-Glu}-\text{N}-(\gamma\text{-Glu})) \text{ des}(\text{B}30)$ ;

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^\alpha-(\text{Asp}-\text{OC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\underline{\gamma}\text{-Glu}) \text{ des}(\text{B}30)$ ;

60 insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^\alpha-(\text{Glu}-\text{OC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\underline{\gamma}\text{-Glu}) \text{ des}(\text{B}30)$ ;

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^\alpha-(\text{Glu}-\text{OC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-) \text{ des}(\text{B}30)$ ;

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^\alpha-(\text{Asp}-\text{OC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-) \text{ des}(\text{B}30)$ ;

65 insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^\alpha-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\alpha\text{-Glu}-\text{N}-(\beta\text{-Asp})) \text{ des}(\text{B}30)$ ;

insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Gly-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);

insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Sar-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);

insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);

insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\beta$ -Asp) des(B30);

insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\beta$ -Glu) des(B30);

insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -D-Glu) des(B30) ;

insulina humana N<sup>ε</sup>B29-hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30; y

insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\beta$ -D-Asp) des(B30)

72. El uso de acuerdo con los párrafos 52-69, en donde el derivado de insulina es insulina humana N<sup>ε</sup>B29- $\omega$ -carboxi-pentadecanoil- $\gamma$ -L-glutamilamida desB30 o insulina humana N<sup>ε</sup>B29- $\omega$ -carboxi-pentadecanoil- $\gamma$ -amino-butanoil desB30.

73. El uso de acuerdo con los párrafos 52-72, en donde la formulación farmacéutica comprende además una insulina de acción rápida.

74. El uso de acuerdo con el párrafo 73, en donde la insulina de acción rápida es insulina humana AspB28, insulina humana LysB3GluB29 y/o insulina humana LysB28ProB29.

75. El uso de acuerdo con los párrafos 52-74, en donde la formulación farmacéutica comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en conservantes, tampones, estabilizadores, agentes espesantes, portadores, agente isotónico y tensioactivos.

76. Un proceso para preparar una formulación farmacéutica soluble que comprende

a) proporcionar una fase acuosa que comprende un derivado de insulina,

b) proporcionar más de 4 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,

c) proporcionar ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse a la forma de dodecámero, mezclar la fase acuosa, los iones de zinc y el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina para formar una formulación farmacéutica soluble.

77. Un proceso para preparar una formulación farmacéutica soluble estable en almacenamiento que comprende

a) proporcionar una fase acuosa que comprende un derivado de insulina

b) proporcionar más de 4 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,

c) proporcionar un ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse a la forma de dodecámero, mezclar la fase acuosa, los iones de zinc y el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina para formar una formulación farmacéutica soluble.

78. El proceso de acuerdo con los párrafos 76 o 77, en donde la formulación comprende más de 4,3 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 4,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 4,7 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 4,9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 5,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 6,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de 7,0 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o más de 7,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

79. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-78, en donde la formulación comprende hasta 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

- 5 80. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-79, en donde la formulación farmacéutica comprende entre 4,3 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 4,5 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 4,7 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 4,9 y 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 5 y 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 5,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 6 y 10,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre 6,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o entre 7 y 9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.
- 10 81. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-80, en donde los átomos de zinc se mezclan en la formulación farmacéutica en dos o más de dos etapas.
82. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-80, en donde la formulación farmacéutica se proporciona mediante la mezcla de los átomos de zinc en la fase acuosa en tres, cuatro, cinco o seis etapas.
- 15 83. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-81, en donde la formulación farmacéutica se proporciona mediante la mezcla de los átomos de zinc en la fase acuosa antes de mezclarse en un conservante.
- 20 84. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-83, en donde la formulación farmacéutica se proporciona mediante la mezcla de los átomos de zinc en la formulación farmacéutica después de mezclarse en un conservante.
85. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-84, la formulación farmacéutica se proporciona mediante la mezcla de los átomos de zinc en al menos dos etapas, en donde al menos una primera etapa comprende mezclar los átomos de zinc en la formulación farmacéutica antes de mezclarse en un conservante y al menos una segunda etapa comprende mezclar los átomos de zinc después de mezclarse en el conservante.
- 25 86. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-85, en donde el conservante es fenol y/o m-cresol.
87. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-86, en donde la relación molar entre el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina e iones de zinc es de 0,05 a 10.
- 30 88. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-87, en donde la relación molar entre el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina e iones de zinc es de 0,1 a 2, de 0,1 a 1 o de 0,2 a 1.
- 35 89. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-88, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad hasta 4 mM.
90. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-89, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad de 0,05 mM a 4 mM, de 0,1 mM a 2 mM o de 0,1 a 1,8 mM.
- 40 91. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-90, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad hasta 1 mM.
92. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-91, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad de 0,05 mM a 0,95 mM.
- 45 93. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-92, en donde el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina están presentes en una cantidad de 0,1 mM a 0,9 mM, de 0,1 mM a 0,8 mM o de 0,1 mM a 0,7 mM, o de 0,1 mM a 0,6 mM o de 0,2 mM a 0,9 mM o de 0,2 mM a 0,8 mM.
- 50 94. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-93, en donde al menos 76 % de las moléculas derivadas de insulina están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 55 95. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-94, en donde al menos 77 %, al menos 78 %, al menos 79 %, al menos 80 % o al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 99,8 % de las moléculas de insulina en la formulación farmacéutica están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 60 96. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-95, en donde hasta 5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 65 97. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-96, en donde hasta 4,5 %, hasta 4 %, hasta 3,5 %, hasta 3,0 %, hasta 2,5 %, hasta 2,0 % o hasta 1,5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.

98. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-97, en donde el compuesto de histidina es dipéptidos que contienen histidina o tripéptidos que contienen histidina,

99. El proceso de acuerdo con el párrafo 98, en donde el compuesto de histidina es L-histidina.

100. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-99, en donde el derivado de insulina se selecciona del grupo que consiste en derivados de insulina de insulina humana, derivados de insulina de insulina humana desB30, derivados de insulina de análogos de insulina, insulina humana acilada, insulina humana desB30 acilada, análogos de insulina acilada, insulina bovina acilada e insulina porcina acilada.

101. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-100, en donde el derivado de insulina tiene un sustituyente  $-W-X-Y-Z$  unido al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, donde el sustituyente es de la fórmula general:  $-W-X-Y-Z$

en donde W es:

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

- una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de  $\alpha$ -aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces carbonilo amida, cuya cadena – mediante un enlace amida - se une al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos que tienen un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de manera que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; o

- un enlace covalente de X a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

X es:

- $-\underline{\text{CO}}-$ ;

- $-\text{CH}(\text{COOH})\underline{\text{CO}}-$ ;

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

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

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

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

- $-\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\underline{\text{NHCO}}-$ ;

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

- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}-$ .

que

a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, *mediante* un enlace del carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o

b) cuando W es un enlace covalente, *mediante* un enlace del carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

Y es:

- $-(\text{CH}_2)_m-$  donde m es un número entero en el intervalo de 6 a 32;

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

Z es:

- -COOH;
- 5 • -CO-Asp;
- -CO-Glu;
- -CO-Gly;
- 10 • -CO-Sar;
- -CH(COOH)<sub>2</sub>;
- -N(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub>;
- 15 • -SO<sub>3</sub>H; o
- -PO<sub>3</sub>H
- 20 siempre que cuando W es un enlace covalente y X es -CO-, entonces Z es diferente de -COOH.

102. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-101, en donde el derivado de insulina se selecciona del grupo que consiste en

- 25 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 30 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 35 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu-N-( $\gamma$ -Glu)) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 40 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO-) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO-) des(B30);
- 45 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\alpha$ -Glu-N-( $\beta$ -Asp)) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Gly-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Sar-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 50 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\beta$ -Asp) des(B30);
- 55 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\beta$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -D-Glu) des(B30) ;
- insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30; y
- 60 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\beta$ -D-Asp) des(B30)

103. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-100, en donde el derivado de insulina es insulina humana N<sup>ε</sup>B29-ω-carboxi-pentadecanoil-γ-L-glutamilamida desB30 o insulina humana N<sup>ε</sup>B29-ω-carboxi-pentadecanoil-γ-amino-butanil desB30.

5 104. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-103, en donde la formulación farmacéutica comprende además una insulina de acción rápida.

105. El proceso de acuerdo con el párrafo 104, en donde la insulina de acción rápida es insulina humana AspB28, insulina humana LysB3GluB29 y/o insulina humana LysB28ProB29.

10 106. El proceso de acuerdo con los párrafos 76-105, en donde la formulación farmacéutica comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en conservantes, tampones, estabilizadores, agentes espesantes, portadores, agente isotónico y tensioactivos.

15 107. El uso de una formulación farmacéutica soluble que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un derivado de insulina y más de 4 átomos de zinc por seis moléculas del derivado de insulina para el tratamiento de la diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y otros estados que provocan hiperglicemia en pacientes que necesitan tal tratamiento.

20 108. El método para tratar la diabetes tipo 1, tipo 2 y otros estados que provocan hiperglicemia en pacientes que necesitan tal tratamiento mediante el uso de una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina, más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina y un ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina.

25 109. El método de acuerdo con el párrafo 108, en donde el compuesto de histidina es dipéptidos que contienen histidina o tripéptidos que contienen histidina,

110. El método de acuerdo con el párrafo 108-109, en donde el compuesto de histidina es L-histidina.

30 111. Una formulación farmacéutica soluble como se describe en los ejemplos.

El derivado de insulina de acuerdo con la invención y el análogo de la insulina de acción rápida pueden mezclarse en una relación de 90/10 %, 70/30 %, 50/50 %, 30/70 % o 10/90 %.

35 En un aspecto, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un derivado de insulina de acuerdo con la invención que es soluble a valores de pH fisiológicos.

En un aspecto, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un derivado de insulina de acuerdo con la invención que es soluble a valores de pH en el intervalo de 6,5 a 8,5.

40 En un aspecto, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que es una solución que contiene de 120 nmol/ml a 2400 nmol/ml, de 400 nmol/ml a 2400 nmol/ml, de 400 nmol/ml a 1200 nmol/ml, de 600 nmol/ml a 2400 nmol/ml, o de 600 nmol/ml a 1200 nmol/ml de un derivado de insulina o una mezcla del derivado de insulina con un análogo de insulina de acción rápida.

45 Cuando se preparan los derivados de insulina que se usan en la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención, el producto de partida para la sustitución, la insulina parental o el análogo de insulina o un precursor de los mismos pueden producirse ya sea por la síntesis de péptidos bien conocida o por la producción recombinante bien conocida en microorganismos transformados adecuados. Por lo tanto, el producto de partida de insulina puede producirse mediante un método que comprende cultivar una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica el polipéptido, y que es capaz de expresar el polipéptido en un medio de nutriente adecuado en condiciones que permitan la expresión del péptido, después de lo cual el péptido resultante se recupera del cultivo. Se hace referencia a la solicitud internacional de patente núm. WO 2005/012347.

55 Composiciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de esta invención, por ejemplo, pueden administrarse por vía subcutánea, parental, oral, nasal, bucal, pulmonar.

60 Para la administración subcutánea, las formulaciones farmacéuticas se formulan de manera análoga con la formulación farmacéutica de insulina conocida. Además, para la administración subcutánea, los compuestos de la fórmula se administran de manera análoga con la administración de insulina conocida y, generalmente, los médicos están familiarizados con este procedimiento.

65 De acuerdo con la invención, una formulación farmacéutica de esta invención puede suministrarse por inhalación para lograr una rápida absorción de la misma. La administración por inhalación puede resultar en una farmacocinética

ca comparable a la administración subcutánea de insulina. La inhalación de una formulación farmacéutica de esta invención conduce a un aumento rápido en el nivel de insulina circulante seguido por una rápida caída en los niveles de glucosa en sangre. Los diferentes dispositivos de inhalación proporcionan típicamente una farmacocinética similar cuando se comparan tamaños de partícula similares y niveles similares de deposición pulmonar.

De acuerdo con la invención, las formulaciones farmacéuticas de esta invención pueden suministrarse por cualquiera de una variedad de dispositivos de inhalación conocidos en la técnica para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos dispositivos incluyen inhaladores de dosis medida, nebulizadores, generadores de polvo seco, atomizadores, y similares. Preferentemente, una composición de insulina acilada de esta invención se suministra por un inhalador de polvo seco o un pulverizador. Existen varias características convenientes de un dispositivo de inhalación para administrar una composición de insulina acilada de esta invención. Por ejemplo, el suministro por el dispositivo de inhalación es ventajosamente confiable, reproducible y preciso. El dispositivo de inhalación debe suministrar partículas pequeñas, por ejemplo, menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo aproximadamente 1-5  $\mu\text{m}$ , para una buena respiración. Algunos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación disponibles comercialmente adecuados para la práctica de esta invención son Turbohaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), inhalador Spiros™ (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, AERx™ (Ardigm), el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), el nebulizador Acorde II® (Marquest Medical Products), el inhalador de dosis medida Ventolina® (Glaxo), el inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons), C-haler© (Microdrug), el E-flex© (Microdrug) o similares.

Como reconocerán los expertos en la técnica, en las formulaciones farmacéuticas de esta invención, la cantidad de la formulación suministrada, y la duración de la administración de una única dosis dependen del tipo de dispositivo de inhalación empleado. Para algunos sistemas de suministro de aerosol, tales como nebulizadores, la frecuencia de administración y la duración para el cual se activa el sistema dependerá principalmente de la concentración del conjugado de insulina en el aerosol. Por ejemplo, pueden usarse períodos de administración más cortos a concentraciones más altas del conjugado de insulina en la solución nebulizadora. Los dispositivos tales como inhaladores de dosis medida pueden producir concentraciones de aerosol más altas, y pueden operarse por períodos más cortos para suministrar la cantidad deseada del conjugado de insulina. Los dispositivos tales como inhaladores de polvo suministran el agente activo hasta que se expulsa una carga determinada del agente desde el dispositivo. En este tipo de inhalador, la cantidad del derivado de insulina de esta invención en una cantidad determinada del polvo determina la dosis suministrada en una sola administración.

El tamaño de partícula del derivado de insulina de esta invención en la formulación suministrada por el dispositivo de inhalación es crítico con respecto a la capacidad de la insulina para llegar a los pulmones, y preferentemente en las vías respiratorias inferiores o alvéolos. Preferentemente, las formulaciones farmacéuticas de esta invención se formulan de manera que al menos aproximadamente 10 % del conjugado de insulina suministrado se deposita en el pulmón, preferentemente aproximadamente 10 a aproximadamente 20 %, o más. Se conoce que la eficiencia máxima de la deposición pulmonar para los humanos que respiran por la boca se obtiene con tamaños de partícula de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ . Cuando los tamaños de partícula están por encima de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  la deposición pulmonar disminuye sustancialmente. Los tamaños de partícula por debajo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  provocan que la deposición pulmonar disminuya, y se hace difícil suministrar partículas con suficiente masa para ser terapéuticamente efectiva. Por lo tanto, las partículas suministradas por inhalación tienen un tamaño de partícula preferentemente menor que aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , con mayor preferencia en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . La formulación de insulina se selecciona para rendir el tamaño de partícula deseado en el dispositivo de inhalación elegido.

Ventajosamente para la administración como un polvo seco, una composición de insulina acilada de esta invención se prepara en una forma de partículas con un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula preferido es efectivo para el suministro a los alvéolos del pulmón del paciente. Preferentemente, el polvo seco se compone en gran medida de partículas producidas de manera que una mayoría de las partículas tienen un tamaño en el intervalo deseado. Ventajosamente, al menos aproximadamente 50 % del polvo seco se hace de partículas que tienen un diámetro de menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . Tales formulaciones pueden lograrse mediante secado por atomizado, molienda, o condensación por el punto crítico de una solución que contiene conjugado de insulina y otros ingredientes deseados. Otros métodos también adecuados para generar partículas útiles en la presente invención se conocen en la técnica.

Las partículas se separan usualmente a partir de una formulación de polvo seco en un contenedor y luego se transportan hacia el pulmón de un paciente mediante una corriente de aire portador. Típicamente, en los inhaladores de polvo seco actuales, la fuerza para romper el sólido se proporciona únicamente por la inhalación del paciente. En otro tipo de inhalador, el flujo de aire generado por la inhalación del paciente activa un motor impulsor que desaglomera las partículas.

Las formulaciones farmacéuticas de esta invención para la administración a partir de un inhalador de polvo seco incluyen típicamente un polvo seco finamente dividido que contiene insulina, pero el polvo puede incluir también un agente espesante, portador, excipiente, otro aditivo, o similares. Los aditivos pueden incluirse en una formulación de polvo seco del conjugado de insulina, por ejemplo, para diluir el polvo según se requiera para el suministro a partir del inhalador de polvo particular, para facilitar el procesamiento de la formulación, para proporcionar propiedades

5 ventajas del polvo a la formulación, para facilitar la dispersión del polvo del dispositivo de inhalación, para estabilizar la formulación (por ejemplo, antioxidantes o tampones), para proporcionar sabor a la formulación, o similares. Ventajosamente, el aditivo no afecta adversamente las vías respiratorias del paciente. La insulina puede mezclarse con un aditivo a un nivel molecular o la formulación sólida puede incluir partículas del conjugado de insulina mezclado con o recubierto con partículas del aditivo. Los aditivos típicos incluyen mono-, di-, y polisacáridos; alcoholes de azúcar y otros polioles, tales como, por ejemplo, lactosa, glucosa, rafinosa, melezitosa, lactitol, maltitol, trehalosa, sacarosa, manitol, almidón o combinaciones de los mismos; tensioactivos, tales como sorbitoles, difosfatidil colina, o lecitina; o similares. Típicamente un aditivo, tal como un agente espesante, está presente en una cantidad efectiva para un propósito descrito anteriormente, a menudo de aproximadamente 50 % a aproximadamente 90 % en peso de la formulación. Los agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tal como proteína análoga de insulina también pueden incluirse en la formulación.

15 Un pulverizado que incluye la formulación farmacéutica de esta invención puede producirse al forzar una solución de conjugado de insulina a través de una boquilla bajo presión. La configuración y tamaño de la boquilla, la presión aplicada, y la velocidad de alimentación del líquido pueden elegirse para lograr la salida y tamaño de partícula deseados. Un electropulverizador puede producirse, por ejemplo, mediante un campo eléctrico en conexión con una alimentación capilar o de boquilla. Ventajosamente, las partículas del conjugado de insulina suministrado por un pulverizador tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ .

20 Las formulaciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para su uso con un pulverizador incluirán típicamente el derivado de insulina en una solución acuosa a una concentración de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg del conjugado de insulina por ml de solución. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un tensioactivo, y, preferentemente, zinc. La formulación puede incluir además un excipiente o agente para la estabilización de la insulina, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína voluminosa, o un carbohidrato. Las proteínas voluminosas útiles en la formulación de conjugados de insulina incluyen albúmina, protamina o similares. Los carbohidratos típicos útiles para formular conjugados de insulina incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similares. La formulación farmacéutica puede incluir además un tensioactivo, que puede reducir o prevenir la agregación inducida por la superficie del conjugado de insulina provocada por la atomización de la solución en la formación de un aerosol. Pueden emplearse varios tensioactivos convencionales, tales como ésteres de ácidos grasos de polioxietileno y alcoholes, y ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitol. Las cantidades generalmente variarán entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 4 % en peso de la formulación.

35 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden administrarse por vía parenteral a los pacientes que necesitan dicho tratamiento. La administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo lapicera u otro equipo de dosificación conveniente. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión.

40 Las composiciones inyectables de la formulación farmacéutica pueden prepararse con el uso de las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican disolver y mezclar los ingredientes según sea adecuado para proporcionar el producto final deseado. Por lo tanto, de acuerdo con un procedimiento, la insulina de acción prolongada se disuelve en una cantidad de agua que es algo menor que el volumen final de la composición a preparar. Se añade un agente isotónico, un conservante o una mezcla de conservantes, zinc como acetato o cloruro o una mezcla de los mismos y puede añadirse un tampón según se requiera, además puede añadirse un tensioactivo y el valor de pH de la solución se ajusta - si es necesario - con el uso de un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico, o una base, por ejemplo, hidróxido de sodio acuoso según sea necesario. Por último, el volumen de la solución se ajusta con agua para proporcionar la concentración deseada de los ingredientes.

50 El tampón puede seleccionarse del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, glicina, lisina, arginina, fosfato dihidrógeno de sodio, fosfato de hidrógeno disodio, fosfato de sodio, ADA (ácido N-[2-acetamido]-2-iminodiacético), ACES (ácido N-[2-acetamido]-2-aminoetansulfónico), BES (ácido N,N-bis[2-hidroxietyl]-2-aminoetanosulfónico), bicina (N,N-bis-[2-hidroxietyl]glicina), BIS-TRIS (bis[2-hidroxietyl]iminotris[hidroxietyl]-metano), DIPSO (ácido 3[N,N-bis(2-hidroxietyl)amin]-2-hidroxiopropanosulfónico), etilendiamina dihidrocloruro, glicilglicina, HE-  
55 PES (ácido N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[2-etanosulfónico]), HEPPSO (ácido N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[2-hidroxiopropanosulfónico]), imidazol, MOBS (ácido 4-[N-morfolino]butanosulfónico), MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico), PIPES (ácido piperazina-N,N'-bis[2-etanosulfónico]), TAPSO (ácido 3-[N-tris(hidroxietyl)metilamino]-2-hidroxiopropanosulfónico), THAM (tris[hidroxietyl]-aminometano), TES (ácido N-tris[hidroxietyl]metil-2-aminoetanosulfónico, tricina (N-tris[hidroxietyl]metilglicina), ácido adípico, ácido aspártico, ácido glutárico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, y/o sales de estos y/o sus mezclas.

65 En un aspecto adicional de la invención la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable que puede seleccionarse del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencilico, clorobutanol, y bronopol, ácido benzoico, imidaurea, clorohexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3-(4-clorfenoxipropano-1,2-diol) o sus mezclas. En un

aspecto adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En un aspecto adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En un aspecto adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En un aspecto adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19na edición, 1995.

En un aspecto adicional de la invención la formulación comprende además un agente isotónico que puede seleccionarse del grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro sódico), un azúcar o azúcar alcohólico, un aminoácido (por ejemplo, l-glicina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ejemplo, PEG400), o sus mezclas. Puede usarse cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, que incluyen, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de Na. En un aspecto el aditivo de azúcar es sacarosa. El azúcar alcohólico se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En un aspecto, el aditivo de azúcar alcohólico es manitol. Los azúcares o azúcares alcohólicos mencionados anteriormente pueden usarse individualmente o en combinación. No hay un límite fijo para la cantidad usada, siempre que el azúcar o el alcohol de azúcar sean solubles en la composición líquida y no afecten adversamente los efectos estabilizantes alcanzados mediante el uso de los métodos de la invención. En un aspecto, la concentración del azúcar o el azúcar alcohólico está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En un aspecto adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En un aspecto adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En un aspecto adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En un aspecto adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19na edición, 1995.

En un aspecto adicional de la invención, la formulación comprende un tensioactivo para prevenir la fibrilación especialmente cuando se mezcla el derivado de insulina con una insulina de acción rápida como parte de insulina. Pueden emplearse varios tensioactivos convencionales, tales como ésteres de ácidos grasos de polioxietileno y alcoholes, y ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitol. Las cantidades generalmente variarán entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 0,1 % en peso de la formulación.

En una modalidad adicional de la invención el tensioactivo se selecciona de un detergente, aceite de castor etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de sorbitán y ácido graso, polímeros de bloques de polioxipropileno-polioxietileno (por ejemplo, poloxámeros como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de polioxietileno sorbitán y ácido graso, derivados de polioxietileno y polietileno como derivados alquilados y alcoxilados (polisorbatos, por ejemplo Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o sus derivados etoxilados, diglicéridos o sus derivados de polioxietileno, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidil serina, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol, difosfatidil glicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoil fosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo, palmitoil lisofosfatidil-L-serina y 1-acil-sn-glicero-3-fosfato ésteres de etanolamina, colina, serina o treonina) y alquil, alcoxil (alquil éster), alcoxi (alquil éter)- derivados de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo lauroil y miristoil derivados de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de la cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP cargados positivamente, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas), gliceroglicolípidos (por ejemplo, galactopiranosido), esfingoglicolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilfosfolcolina, lisolecitina del huevo de gallina, derivados del ácido fusídico - (por ejemplo tauro-dihidrofusidato de sodio, etcétera), ácidos grasos de cadena larga y sus sales C6-C12 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados de lisina, arginina o histidina, N-acilados, o derivados de lisina o arginina acilados en la cadena lateral, derivados N-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N-acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, registro CAS núm. [577-11-7]), docusato de calcio, registro CAS núm. [128-49-4]), docusato de potasio, registro CAS núm. [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sodio o laurilsulfato de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o derivados de estos, ácidos biliares y sus sales y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensoactivos monovalentes (alquil-aril-sulfonatos) aniónicos, tensoactivos zwitteriónicos (por ejemplo N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensoactivos catiónicos (bases cuaternarias de amonio) (por ejemplo bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensoactivos no iónicos (por ejemplo, dodecil -D-glucopiranosido), poloxaminas (por ejemplo, de Tetric), que son copolímeros de bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensoactivo puede seleccionar-

se del grupo de derivados de imidazolina, o sus mezclas. Cada uno de estos tensoactivos específicos constituye una modalidad alternativa de la invención.

5 El uso de un tensoactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19na edición, 1995.

Los agentes isotónicos típicos son cloruro sódico, manitol, dimetil sulfona, 1,2 propanodiol y glicerol y los conservantes típicos son fenol, m-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo y alcohol bencílico.

10 Los ejemplos de tampones adecuados son acetato de sodio, glicilglicina, HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico), tris-hidroximetil-aminometano, y fosfato de sodio.

15 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden usarse en el tratamiento de estados que son sensibles a la insulina. Por lo tanto, pueden usarse en el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y la hiperglucemia, por ejemplo, como se observa en ocasiones en personas gravemente lesionadas y personas que se han sometido a cirugía mayor. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores que incluyen la eficacia de la insulina acilada específica o la mezcla de la insulina acilada con una insulina de acción rápida empleada, la edad, el peso corporal, la actividad física, y la dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos, y de la gravedad del estado a tratar. Se recomienda que la dosificación diaria del derivado de insulina de esta invención se determine para cada paciente individual por los expertos en la técnica de una manera similar a las composiciones de insulina conocidas.

20 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la protección.

25 Los siguientes párrafos resumen la invención:

1a. La formulación farmacéutica que comprende un derivado de insulina en donde la formulación comprende además

30 c) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,

d) un compuesto que forma complejos de zinc usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

35 2a. Una formulación farmacéutica estable en almacenamiento que comprende un derivado de insulina en donde la formulación comprende además

40 c) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina

d) un compuesto que forma complejos de zinc usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

45 3a. La formulación farmacéutica que comprende un derivado de insulina para el tratamiento de la diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y otros estados que provocan hiperglicemia en pacientes que necesitan de tal tratamiento, en donde la formulación comprende además

c) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,

50 d) un compuesto que forma complejos de zinc usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.

4a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1, 2 o 3, en donde la formulación comprende más de aproximadamente 4,3 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 4,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 4,7 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 4,9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 5,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 6,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 7,0 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o más de aproximadamente 7,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

5a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-4, en donde la formulación comprende hasta aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

65 6a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-5, en donde la formulación farmacéutica comprende entre aproximadamente 4,3 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre

- aproximadamente 4,5 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 4,7 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 4,9 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.
- 5 7a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-6, en donde la relación molar entre el compuesto que forma complejos de zinc y los iones de zinc es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10.
- 8a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-7, en donde la relación molar entre el compuesto que forma complejos de zinc y los iones de zinc es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1.
- 15 9a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-8, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 4 mM.
- 20 10a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-9, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 4 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2 mM o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,8 mM.
- 25 11a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-10, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 1 mM.
- 12a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-11, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 0,95 mM.
- 30 13a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-12, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,9 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,8 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,7 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,6 mM, de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,9 mM o de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,8 mM.
- 35 14a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-13, en donde al menos aproximadamente 76 % de las moléculas derivadas de insulina están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 40 15a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-14, en donde al menos aproximadamente 77 %, al menos aproximadamente 78 %, al menos aproximadamente 79 %, al menos aproximadamente 80 % o al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o al menos aproximadamente 99,8 % de las moléculas de insulina en la formulación farmacéutica están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 45 16a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-17, en donde hasta aproximadamente 5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 50 17a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-16, en donde hasta aproximadamente 4,5 %, hasta aproximadamente 4 %, hasta aproximadamente 3,5 %, hasta aproximadamente 3,0 %, hasta aproximadamente 2,5 %, hasta aproximadamente 2,0 % o hasta aproximadamente 1,5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 55 18a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-17, en donde el compuesto que forma complejos de zinc son compuestos de citrato y/o compuestos de histidina.
- 60 19a. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 18, en donde el compuesto de citrato es ácido cítrico monohidrato.
- 20a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-19, en donde el compuesto de histidina es dipéptidos que contienen histidina o tripéptidos que contienen histidina,
- 65 21a. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 20, en donde el compuesto que forma complejos de zinc es L-histidina.

22a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-21, en donde el derivado de insulina se selecciona del grupo que consiste en derivados de insulina de insulina humana, derivados de insulina de insulina humana desB30, derivados de insulina de análogos de insulina, insulina humana acilada, insulina humana desB30 acilada, análogos de insulina acilada, insulina bovina acilada e insulina porcina acilada.

23a. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 1-22, en donde el derivado de insulina tiene un sustituyente  $-W-X-Y-Z$  unido al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, donde el sustituyente es de la fórmula general:  $-W-X-Y-Z$

en donde W es:

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

- una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de  $\alpha$ -aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces carbonilo amida, cuya cadena – mediante un enlace amida - se une al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos que tienen un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de manera que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; o

- un enlace covalente de X a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

X es:

- $-\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

- $-\text{CH}(\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ;

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

- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ ; o

$-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O}-$ .

que

a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, *mediante* un enlace del carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o

b) cuando W es un enlace covalente, *mediante* un enlace del carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

Y es:

- $-(\text{CH}_2)_m-$  donde m es un número entero en el intervalo de 6 a 32;

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

Z es:

- $-\text{COOH}$ ;

- $-\text{CO}-\text{Asp}$ ;

- -CO-Glu;
  - -CO-Gly;
  - 5 • -CO-Sar;
  - -CH(COOH)<sub>2</sub>;
  - 10 • -N(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub>;
  - -SO<sub>3</sub>H; o
  - -PO<sub>3</sub>H
- 15 siempre que cuando W es un enlace covalente y X es -CO-, entonces Z es diferente de -COOH.

24a. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 23, en donde la formulación comprende un derivado de insulina seleccionado del grupo que consiste en

- 20 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 25 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 30 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu-N-( $\gamma$ -Glu)) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 35 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO-) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO-) des(B30);  
 40 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\alpha$ -Glu-N-( $\beta$ -Asp)) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Gly-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(Sar-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 45 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\beta$ -Asp) des(B30);  
 50 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\beta$ -Glu) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -D-Glu) des(B30) ;  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30; y  
 55 insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\beta$ -D-Asp) des(B30)

25a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-22, en donde el derivado de insulina es insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>- $\omega$ -carboxi-pentadecanoil- $\gamma$ -L-glutamilamida desB30 o insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>- $\omega$ -carboxi-pentadecanoil- $\gamma$ -amino-butanoil desB30.

26a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-25, en donde la formulación farmacéutica comprende además una insulina de acción rápida.

27a. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 26, en donde la insulina de acción rápida es insulina humana AspB28, insulina humana LysB3GluB29 y/o insulina humana LysB28ProB29.

5 28a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-27, en donde la formulación farmacéutica comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en conservantes, tampones, estabilizadores, agentes espesantes, portadores, agente isotónico y tensioactivos.

29a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-28, en donde el pH de la formulación está en el intervalo de aproximadamente 6,5 a 8,5.

10 30a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 1-29, en donde el pH de la formulación está en el intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0 o de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 7,6.

31a. La formulación farmacéutica que comprende un derivado de insulina, en donde la formulación comprende además

15 d) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,

e) un compuesto que forma complejos de zinc usado en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros, y

20 f) el derivado de insulina tiene un sustituyente  $-W-X-Y-Z$  unido al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, donde el sustituyente es de la fórmula general:  $-W-X-Y-Z$

en donde W es:

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

30 • una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de  $\alpha$ -aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces carbonil amida, cuya cadena – mediante un enlace amida - se une al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos que tienen un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de manera que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; o

35 • un enlace covalente de X a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

40 X es:

•  $-\underline{C}O-$ ;

45 •  $-\text{CH}(\text{COOH})\underline{C}O-$ ;

•  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{C}O-$ ;

•  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{C}O-$ ;

50 •  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{C}O-$ ;

•  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{C}O-$ ;

55 •  $-\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}\underline{C}O-$  ;

•  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{C}O-$ ; o

•  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{C}O-$ .

60 que

a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, mediante un enlace del carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o

b) cuando W es un enlace covalente, mediante un enlace del carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

Y es:

- 5
- $-(CH_2)_m-$  donde m es un número entero en el intervalo de 6 a 32;
  - una cadena hidrocarbonada divalente que comprende 1, 2 o 3 grupos  $-CH=CH-$  y un número de grupos  $-CH_2-$  suficiente para proporcionar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32; Y

Z es:

- 10
- $-COOH$ ;
  - 15 •  $-CO-Asp$ ;
  - $-CO-Glu$ ;
  - 20 •  $-CO-Gly$ ;
  - $-CO-Sar$ ;
  - $-CH(COOH)_2$ ;
  - 25 •  $-N(CH_2COOH)_2$ ;
  - $-SO_3H$ ; o
  - $-PO_3H$

30 siempre que cuando W es un enlace covalente y X es  $-CO-$ , entonces Z es diferente de  $-COOH$ .

32a. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 31, en donde la formulación comprende más de aproximadamente 4,3 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 4,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 4,7 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 4,9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 5,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 6,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 7,0 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o más de aproximadamente 7,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

33a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-32, en donde la formulación comprende hasta aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

45 34a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-33, en donde la formulación farmacéutica comprende entre aproximadamente 4,3 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 4,7 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 4,9 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

55 35a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-34, en donde la relación molar entre el compuesto que forma complejos de zinc y los iones de zinc es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10.

60 36a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-35, en donde la relación molar entre el compuesto que forma complejos de zinc y los iones de zinc es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1.

65 37a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-36, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 4 mM.

- 38a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-37, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 4 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2 mM o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,8 mM.
- 5 39a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-38, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 1mM.
- 40a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-39, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 0,95 mM.
- 10 41a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-40, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,9 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,8 mM o de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,7 mM, o de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,6 mM o de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,9 mM o de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,8 mM.
- 15 42a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-41, en donde al menos aproximadamente 76 % de las moléculas derivadas de insulina están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 20 43a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-42, en donde al menos aproximadamente 77 %, al menos aproximadamente 78 %, al menos aproximadamente 79 %, al menos aproximadamente 80 % o al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o al menos aproximadamente 99,8 % de las moléculas de insulina en la formulación farmacéutica están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 25 44a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-43, en donde hasta aproximadamente 5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 30 45a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-44, en donde hasta aproximadamente 4,5 %, hasta aproximadamente 4 %, hasta aproximadamente 3,5 %, hasta aproximadamente 3,0 %, hasta aproximadamente 2,5 %, hasta aproximadamente 2,0 % o hasta aproximadamente 1,5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 35 46a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-45, en donde el compuesto que forma complejos de zinc son compuestos de citrato y/o compuestos de histidina.
- 40 47a. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 31-46, en donde el compuesto de citrato es ácido cítrico monohidrato.
- 48a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-47, en donde el compuesto de histidina es dipéptidos que contienen histidina o tripéptidos que contienen histidina,
- 45 49a. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 31-48, en donde el compuesto que forma complejos de zinc es L-histidina.
- 50a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-49, en donde la formulación comprende un derivado de insulina seleccionado del grupo que consiste en
- 50 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 55 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 60 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu-N-( $\gamma$ -Glu)) des(B30);
- 65 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);

- insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO-) des(B30);
- 5 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO-) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\alpha$ -Glu-N-( $\beta$ -Asp)) des(B30);
- 10 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Gly-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Sar-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);
- 15 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\beta$ -Asp) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\beta$ -Glu) des(B30);  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -D-Glu) des(B30) ;
- 20 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30; y  
 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\beta$ -D-Asp) des(B30)
- 25 51a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-50, en donde la formulación farmacéutica comprende además una insulina de acción rápida.
- 52a. La formulación farmacéutica de acuerdo con el párrafo 51, en donde la insulina de acción rápida es insulina humana AspB28, insulina humana LysB3GluB29 y/o insulina humana LysB28ProB29.
- 30 53a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-52, en donde la formulación farmacéutica comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en conservantes, tampones, estabilizadores, agentes espesantes, portadores, agente isotónico y tensioactivos.
- 35 54a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-53, en donde el pH de la formulación está en el intervalo de aproximadamente 6,5 a 8,5.
- 55a. La formulación farmacéutica de acuerdo con los párrafos 31-54, en donde el pH de la formulación está en el intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0 o de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 7,6.
- 40 56a. El uso del compuesto que forma complejos de zinc en una formulación farmacéutica que comprende un derivado de insulina e iones de zinc, en donde el compuesto que forma complejos de zinc se usa en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia de dicho derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.
- 45 57a. El uso de acuerdo con el párrafo 56, en donde la formulación farmacéutica comprende más de 4 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.
- 58a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-57, en donde la formulación comprende más de aproximadamente 4,3 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 4,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 4,7 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 4,9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 5,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 6,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 7,0 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o más de aproximadamente 7,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.
- 55 59a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-58, en donde la formulación comprende hasta aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.
- 60 60a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-59, en donde la formulación farmacéutica comprende entre aproximadamente 4,3 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 4,7 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 4,9 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 10 átomos
- 65

de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.

5 61a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-60, en donde la relación molar entre el compuesto que forma complejos de zinc y los iones de zinc es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10.

10 62a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-61, en donde la relación molar entre el compuesto que forma complejos de zinc y los iones de zinc es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1.

15 63a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-62, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 4 mM.

64a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-63, donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 4 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2 mM o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,8 mM.

20 65a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-64, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 1mM.

25 66a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-65, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 0,95 mM.

30 67a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-66, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,9 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,8 mM o de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,7 mM, o de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,6 mM o de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,9 mM o de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,8 mM.

35 68a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-67, en donde al menos aproximadamente 76 % de las moléculas derivadas de insulina están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.

40 69a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-68, en donde al menos aproximadamente 77 %, al menos aproximadamente 78 %, al menos aproximadamente 79 %, al menos aproximadamente 80 % o al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o al menos aproximadamente 99,8 % de las moléculas de insulina en la formulación farmacéutica están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.

45 70a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-69, en donde hasta aproximadamente 5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.

50 71a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-70, en donde hasta aproximadamente 4,5 %, hasta aproximadamente 4 %, hasta aproximadamente 3,5 %, hasta aproximadamente 3,0 %, hasta aproximadamente 2,5 %, hasta aproximadamente 2,0 % o hasta aproximadamente 1,5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.

72a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-71, en donde el compuesto que forma complejos de zinc son compuestos de citrato y/o compuestos de histidina.

55 73a. El uso de acuerdo con el párrafo 56-72, en donde el compuesto de citrato es ácido cítrico monohidrato.

74a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-73, en donde el compuesto de histidina es dipéptidos que contienen histidina o tripéptidos que contienen histidina,

60 75a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-73, en donde el compuesto que forma complejos de zinc es L-histidina.

76a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-75, en donde el derivado de insulina tiene un sustituyente -W-X-Y-Z unido al grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, donde el sustituyente es de la fórmula general: -W-X-Y-Z

65 en donde W es:

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

5  
 • una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de  $\alpha$ -aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces carbonil amida, cuya cadena – mediante un enlace amida - se une al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos que tienen un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de manera que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; o

10  
 • un enlace covalente de X a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

15  
 X es:

•  $\text{—}\underline{\text{C}}\text{O—}$ ;

20  
 •  $\text{—CH}(\text{COOH})\underline{\text{C}}\text{O—}$ ;

•  $\text{—CO—N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O—}$ ;

25  
 •  $\text{—CO—N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O—}$ ;

•  $\text{—CO—N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O—}$ ;

•  $\text{—CO—N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O—}$ ;

30  
 •  $\text{—CO—NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}\underline{\text{C}}\text{O—}$  ;

•  $\text{—CO—N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O—}$ ; o

•  $\text{—CO—N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O—}$ .

35  
 que

a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, *mediante* un enlace del carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o

40  
 b) cuando W es un enlace covalente, *mediante* un enlace del carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

Y es:

45  
 •  $\text{—}(\text{CH}_2)_m\text{—}$  donde m es un número entero en el intervalo de 6 a 32;

• una cadena hidrocarbonada divalente que comprende 1, 2 o 3 grupos  $\text{—CH=CH—}$  y un número de grupos  $\text{—CH}_2\text{—}$  suficiente para proporcionar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32; Y

50  
 Z es:

•  $\text{—COOH}$ ;

55  
 •  $\text{—CO—Asp}$ ;

•  $\text{—CO—Glu}$ ;

•  $\text{—CO—Gly}$ ;

60  
 •  $\text{—CO—Sar}$ ;

•  $\text{—CH}(\text{COOH})_2$ ;

65  
 •  $\text{—N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ ;

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

5

siempre que cuando W es un enlace covalente y X es  $-\text{CO}-$ , entonces Z es diferente de  $-\text{COOH}$ .

77a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-76, en donde el derivado de insulina se selecciona del grupo que consiste en

10

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  des(B30);

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{15}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  des(B30);

15

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  des(B30);

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{17}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  des(B30);

20

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  des(B30);

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-Glu-N}-(\gamma\text{-Glu}))$  des(B30);

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{Asp-OC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  des(B30);

25

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{Glu-OC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  des(B30);

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{Glu-OC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-))$  des(B30);

30

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{Asp-OC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-))$  des(B30);

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\alpha\text{-Glu-N}-(\beta\text{-Asp}))$  des(B30);

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{Gly-OC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  des(B30);

35

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{Sar-OC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  des(B30);

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$  des(B30);

40

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\beta\text{-Asp})$  des(B30);

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{13}\text{CO})-\beta\text{-Glu})$  des(B30);

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO})-\gamma\text{-D-Glu})$  des(B30);

45

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30; y

insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\beta\text{-D-Asp})$  des(B30)

50

78a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-75, en donde el derivado de insulina es insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ - $\omega$ -carboxi-pentadecanoil- $\gamma$ -L-glutamilamida desB30 o insulina humana  $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ - $\omega$ -carboxi-pentadecanoil- $\gamma$ -amino-butanoil desB30.

79a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-78, en donde la formulación farmacéutica comprende además una insulina de acción rápida.

55

80a. El uso de acuerdo con el párrafo 79, en donde la insulina de acción rápida es insulina humana AspB28, insulina humana LysB3GluB29 y/o insulina humana LysB28ProB29.

60

81a. El uso de acuerdo con los párrafos 56-80, en donde la formulación farmacéutica comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en conservantes, tampones, estabilizadores, agentes espesantes, portadores, agente isotónico y tensioactivos.

82a. Un proceso para preparar una formulación farmacéutica que comprende

d) proporcionar una fase acuosa que comprende un derivado de insulina,

- e) proporcionar más de aproximadamente 4 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,
- f) proporcionar un compuesto que forma complejos de zinc para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse a la forma de dodecámero,  
 5 mezclar la fase acuosa, los iones de zinc y el compuesto que forma complejos de zinc para formar una formulación farmacéutica.
- 83a. Un proceso para preparar una formulación farmacéutica estable en almacenamiento que comprende
- 10 d) proporcionar una fase acuosa que comprende un derivado de insulina
- e) proporcionar más de aproximadamente 4 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,
- 15 f) proporcionar un compuesto que forma complejos de zinc para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse a la forma de dodecámero,  
 mezclar la fase acuosa, los iones de zinc y el compuesto que forma complejos de zinc para formar una formulación farmacéutica.
- 20 84a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82 u 83, en donde la formulación comprende más de aproximadamente 4,3 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 4,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 4,7 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 4,9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 5,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 6,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, más de aproximadamente 7,0 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o más de aproximadamente 7,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.
- 25
- 85a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-84, en donde la formulación comprende hasta aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.
- 30
- 86a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-85, en donde la formulación farmacéutica comprende entre aproximadamente 4,3 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 4,7 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 4,9 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10,5 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 10 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina o entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina.
- 35
- 87a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-86, en donde los átomos de zinc se mezclan en la formulación farmacéutica en dos o más de dos etapas.
- 40
- 88a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-87, en donde la formulación farmacéutica se proporciona mediante la mezcla de los átomos de zinc en la fase acuosa en tres, cuatro, cinco o seis etapas.
- 45
- 89a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-88, en donde la formulación farmacéutica se proporciona mediante la mezcla de los átomos de zinc en la fase acuosa antes de mezclarse en un conservante.
- 50
- 90a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-89, en donde la formulación farmacéutica se proporciona mediante la mezcla de los átomos de zinc en la formulación farmacéutica después de mezclarse en un conservante.
- 91a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-90, la formulación farmacéutica se proporciona mediante la mezcla de los átomos de zinc en al menos dos etapas, en donde al menos una primera etapa comprende mezclar los átomos de zinc en la formulación farmacéutica antes de mezclarse en un conservante y al menos una segunda etapa comprende mezclar los átomos de zinc después de mezclarse en el conservante.
- 55
- 92a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-91, en donde el conservante es fenol y/o m-cresol.
- 60
- 93a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-92, en donde la relación molar entre el compuesto que forma complejos de zinc y los iones de zinc es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10.
- 94a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-93, en donde la relación molar entre el compuesto que forma complejos de zinc y los iones de zinc es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1.
- 65

- 95a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-94, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 4 mM.
- 5 96a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-95, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 4 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2 mM o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,8 mM.
- 97a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-96, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 1mM.
- 10 98a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-97, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 0,95 mM.
- 99a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-98, en donde el compuesto que forma complejos de zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,9 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,8 mM o de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,7 mM, o de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,6 mM o de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,9 mM o de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 0,8 mM.
- 15 100a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-99, en donde al menos aproximadamente 76 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 101a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-100, en donde al menos aproximadamente 77 %, al menos aproximadamente 78 %, al menos aproximadamente 79 %, al menos aproximadamente 80 % o al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o al menos aproximadamente 99,8 % de las moléculas de insulina en la formulación farmacéutica están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 30 102a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-101, en donde hasta aproximadamente 5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros cuando se miden por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 35 103a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-102, en donde hasta aproximadamente 4,5 %, hasta aproximadamente 4 %, hasta aproximadamente 3,5 %, hasta aproximadamente 3,0 %, hasta aproximadamente 2,5 %, hasta aproximadamente 2,0 % o hasta aproximadamente 1,5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 40 104a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-103, en donde el compuesto que forma complejos de zinc son compuestos de citrato y/o compuestos de histidina.
- 105a. El proceso de acuerdo con el párrafo 82-104, en donde el compuesto de citrato es ácido cítrico monohidrato.
- 45 106a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-105, en donde el compuesto de histidina es dipéptidos que contienen histidina o tripéptidos que contienen histidina,
- 107a. El proceso de acuerdo con el párrafo 104, en donde el compuesto que forma complejos de zinc es L-histidina.
- 50 108a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-107, en donde el derivado de insulina se selecciona del grupo que consiste en derivados de insulina de insulina humana, derivados de insulina de insulina humana desB30, derivados de insulina de análogos de insulina, insulina humana acilada, insulina humana desB30 acilada, análogos de insulina acilada, insulina bovina acilada e insulina porcina acilada.
- 55 109a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-108, en donde el derivado de insulina tiene un sustituyente –W–X–Y–Z unido al grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, donde el sustituyente es de la fórmula general: –W–X–Y–Z
- en donde W es:
- 60
- un residuo de α-aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral cuyo residuo forma, con uno de sus grupos de ácido carboxílico, un grupo amida junto con el grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;
- 65
- una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de α-aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces carbonil amida, cuya cadena – mediante un enlace amida - se une al grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la

cadena B de la insulina parental, los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos que tienen un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de manera que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; o

5 • un enlace covalente de X a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;  
X es:

- 10 •  $\text{—}\underline{\text{C}}\text{O—}$ ;
- $\text{—CH(COOH)}\underline{\text{C}}\text{O—}$ ;
- 15 •  $\text{—CO—N(CH}_2\text{COOH)CH}_2\underline{\text{C}}\text{O—}$ ;
- $\text{—CO—N(CH}_2\text{COOH)CH}_2\text{CON(CH}_2\text{COOH)CH}_2\underline{\text{C}}\text{O—}$ ;
- $\text{—CO—N(CH}_2\text{CH}_2\text{COOH)CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O—}$ ;
- 20 •  $\text{—CO—N(CH}_2\text{CH}_2\text{COOH)CH}_2\text{CH}_2\text{CON(CH}_2\text{CH}_2\text{COOH)CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O—}$ ;
- $\text{—CO—NHCH(COOH)(CH}_2\text{)}_4\text{NH}\underline{\text{C}}\text{O—}$  ;
- $\text{—CO—N(CH}_2\text{CH}_2\text{COOH)CH}_2\underline{\text{C}}\text{O—}$ ; o
- 25 •  $\text{—CO—N(CH}_2\text{COOH)CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{O—}$ .

que

30 a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, *mediante* un enlace del carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o

b) cuando W es un enlace covalente, *mediante* un enlace del carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;

35 Y es:

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

Z es:

- 45 •  $\text{—COOH}$ ;
- $\text{—CO—Asp}$ ;
- 50 •  $\text{—CO—Glu}$ ;
- $\text{—CO—Gly}$ ;
- $\text{—CO—Sar}$ ;
- 55 •  $\text{—CH(COOH)}_2$ ;
- $\text{—N(CH}_2\text{COOH)}_2$ ;
- 60 •  $\text{—SO}_3\text{H}$ ; o
- $\text{—PO}_3\text{H}$

siempre que cuando W es un enlace covalente y X es  $\text{—CO—}$ , entonces Z es diferente de  $\text{—COOH}$ .

110a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-109, en donde el derivado de insulina se selecciona del grupo que consiste en

- 5 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
10 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu-N-( $\gamma$ -Glu)) des(B30);  
15 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
20 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Glu-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO-) des(B30);  
insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Asp-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO-) des(B30);  
insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\alpha$ -Glu-N-( $\beta$ -Asp)) des(B30);  
25 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Gly-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(Sar-OC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
30 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\gamma$ -Glu) des(B30);  
insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\square$ -Asp) des(B30);  
insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CO)- $\square$ -Glu) des(B30);  
35 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)- $\gamma$ -D-Glu) des(B30) ;  
insulina humana N<sup>ε</sup>B29-hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30; y  
40 insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)- $\square$ -D-Asp) des(B30)

111a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-108, en donde el derivado de insulina es insulina humana N<sup>ε</sup>B29- $\omega$ -carboxi-pentadecanoil- $\gamma$ -L-glutamilamida desB30 o insulina humana N<sup>ε</sup>B29- $\omega$ -carboxi-pentadecanoil- $\gamma$ -amino-butanoil desB30.

45 112a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-109, en donde la formulación farmacéutica comprende además una insulina de acción rápida.

50 113a. El proceso de acuerdo con el párrafo 112, en donde la insulina de acción rápida es insulina humana AspB28, insulina humana LysB3GluB29 y/o insulina humana LysB28ProB29.

55 114a. El proceso de acuerdo con los párrafos 82-113, en donde la formulación farmacéutica comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en conservantes, tampones, estabilizadores, agentes espesantes, portadores, agente isotónico y tensioactivos.

60 116a. El uso de una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una formulación que comprende un derivado de insulina y más de 4 átomos de zinc por seis moléculas del derivado de insulina para el tratamiento de la diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y otros estados que provocan hiperglicemia en pacientes que necesitan tal tratamiento.

117a. El método para tratar la diabetes tipo 1, tipo 2 y otros estados que provocan hiperglicemia en pacientes que necesitan de tal tratamiento mediante el uso de una formulación farmacéutica que comprende un derivado de insulina, más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina y un compuesto que forma complejos de zinc.

118a. El método de acuerdo con el párrafo 117, en donde el compuesto que forma complejos de zinc son compuestos de citrato y/o compuestos de histidina.

119a. El método de acuerdo con el párrafo 117-118, en donde el compuesto de citrato es ácido cítrico monohidrato.

120a. El método de acuerdo con los párrafos 117-119, en donde el compuesto de histidina es dipéptidos que contienen histidina o tripéptidos que contienen histidina,

121a. El método de acuerdo con el párrafo 117-119, en donde el compuesto que forma complejos de zinc es L-histidina.

122a. La formulación farmacéutica como se describe en los ejemplos.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

A. Formulación farmacéutica con concentración variable de zinc pero sin citrato o histidina: insulina humana LysB29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 0,6 mM, 3-6 Zn<sup>2+</sup>/6ins, glicerol 174 mM, fenol 16 mM, *m*-cresol 16 mM, NaCl 10 mM, pH 7,4:

Una solución acuosa (Solución madre I) de fenol, *m*-cresol, glicerol y NaCl se preparó junto con una solución acuosa (Solución madre II) de insulina humana LysB29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30. Una fracción de Solución madre I se mezcló con una fracción de Solución madre II y el pH se ajustó a aproximadamente 7,5. Se añadió cantidades variables de una solución acuosa de acetato de zinc 10 mM en las fracciones correspondientes al número de iones de zinc por molécula de insulina, el pH se ajustó a 7,4 mediante el uso de HCl/NaOH diluido y la solución se filtró a través de un filtro estéril de 0,22  $\mu$ m.

B. Formulación farmacéutica con concentración variable de histidina: insulina humana LysB29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 0,6 mM, 6 Zn<sup>2+</sup>/6ins, glicerol 174 mM, fenol 16 mM, *m*-cresol 16 mM, NaCl 10 mM, pH 7,4, histidina 0-6 mM:

Una solución acuosa (Solución madre I) de fenol, *m*-cresol, glicerol y NaCl se preparó junto con una solución acuosa (Solución madre II) de insulina humana LysB29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30. Se preparó una solución acuosa (Solución madre III) de histidina y el pH se ajustó a 7,4 mediante el uso de HCl/NaOH diluido. Una fracción de Solución madre I se mezcló con cantidades variables de Solución madre III y se añadió una fracción de Solución madre II y el pH se ajustó a aproximadamente 7,5. Se añadió una solución acuosa de acetato de zinc 10 mM en seis porciones iguales, el pH se ajustó a 7,4 mediante el uso de HCl/NaOH diluido y la solución se filtró a través de un filtro estéril de 0,22  $\mu$ m.

C. Formulación farmacéutica con concentración variable de citrato: insulina humana LysB29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30 0,6 mM, 6 Zn<sup>2+</sup>/6ins, glicerol 174 mM, fenol 16 mM, *m*-cresol 16 mM, NaCl 10 mM, pH 7,4, citrato 0-0,6 mM:

Una solución acuosa (Solución madre I) de fenol, *m*-cresol, glicerol y NaCl se preparó junto con una solución acuosa (Solución madre II) de insulina humana LysB29N $\epsilon$ -hexadecandioil- $\gamma$ -Glu desB30. Se preparó una solución acuosa (Solución madre III) de citrato (ácido cítrico, monohidrato) y el pH se ajustó a 7,4 mediante el uso de HCl/NaOH diluido. Una fracción de Solución madre I se mezcló con cantidades variables de Solución madre III y se añadió una fracción de Solución madre II y el pH se ajustó a aproximadamente 7,5. Se añadió una solución acuosa de acetato de zinc 10 mM en seis porciones iguales, el pH se ajustó a 7,4 mediante el uso de HCl/NaOH diluido y la solución se filtró a través de un filtro estéril de 0,22  $\mu$ m.

### Ejemplo 2

Las preparaciones del Ejemplo 1 se llenaron en cartuchos de vidrio y la distribución de las especies de asociación individuales en la formulación y las condiciones posteriores a la inyección se estimó mediante el uso de los métodos de cromatografía de exclusión por tamaño que se describen en el Ejemplo 3. Las muestras se analizaron inmediatamente después de la preparación y después de su almacenamiento a 5 y 37 °C durante 2 semanas y/o 4 semanas.

### Ejemplo 3

Método analítico A: SEC con fenol (Condiciones de la formulación)

El siguiente método de cromatografía de exclusión por tamaño se usó para evaluar la distribución de los asociados no covalentes en las condiciones de la formulación, es decir con fenol en el eluyente. Una columna TSK-GEL Super SW2000 se usó con elución isocrática con un eluyente que consiste en tris(hidroxi)metilaminometano 10 mM, NaCl 140 mM y fenol 2 mM, pH 7,4 a temperatura ambiente y 0,3 ml/min. Los resultados se expresan en % de dodecámero y % de HMWA (Asociados de Alto Peso Molecular) en base al área relativa del pico de las especies individuales.

Método analítico B: SEC sin fenol (Condiciones después de la inyección)

El siguiente método de cromatografía de exclusión por tamaño se usó para evaluar la distribución de los asociados no covalentes *después de la inyección* es decir, sin fenol en el líquido de elución. Una columna Superdex 200 (10/300 GL) se usó con elución isocrática con un eluyente que consiste en tris(hidroxi)metilaminometano 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 a temperatura ambiente y 0,5 ml/min. Los resultados se expresan en % de monómero en base al área relativa del pico del monómero.

#### Ejemplo 4

Las preparaciones con concentraciones de zinc a 3, 4, 5 o 6 iones de zinc por 6 derivados de insulina se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 1A, sometidas a las condiciones de prueba descritas en el Ejemplo 2 y analizadas de acuerdo con los métodos analíticos en el Ejemplo 3A y 3B. Se observó una disminución significativa en la formación de HMWA y un aumento casi concomitante en la cantidad de dodecámeros de insulina con la disminución de la concentración de zinc en las condiciones de la formulación (Figura 1 y 2, respectivamente). Por otra parte, se observó un aumento significativo de la formación de insulina monomérica en las condiciones posteriores a la inyección al reducir la concentración de zinc (Figura 3). Por lo tanto, la formación de HMWA no puede reducirse simplemente reduciendo la concentración de zinc sin la formación de insulina monomérica en las condiciones posteriores a la inyección.

#### Ejemplo 5

Las preparaciones con concentraciones de histidina a 0,0 mM, 0,2 mM, 0,4 mM y 0,6 mM se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 1B, sometidas a las condiciones de prueba descritas en el Ejemplo 2 y analizadas de acuerdo con los métodos analíticos en el Ejemplo 3A y 3B. De la Figura 5 se observa que una formulación farmacéutica con histidina 0,0 mM almacenada durante 4 semanas a 37 °C, el 75 % de los derivados de insulina están presentes como dodecámeros. Se observó una disminución significativa en la formación de HMWA y un aumento casi concomitante en la cantidad de dodecámeros de insulina con el aumento de la concentración de histidina en las condiciones de la formulación (Figura 4 y 5, respectivamente). Adicionalmente, no se pudo detectar la formación de insulina monomérica en las condiciones posteriores a la inyección con el aumento de la concentración de histidina (Figura 6). Por lo tanto, la formación de HMWA se reduce significativamente en presencia de hasta 0,6 mM de histidina sin la formación de insulina monomérica en las condiciones posteriores a la inyección.

#### Ejemplo 6

Las preparaciones con concentraciones de histidina a 0,0 mM, 0,6 mM, 1,2 mM, 1,8 mM, 2,0 mM, 4,0 mM y 6,0 mM se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 1B, sometidas a las condiciones de prueba descritas en el Ejemplo 2 y analizadas de acuerdo con los métodos analíticos en el Ejemplo 3A y 3B. Se observó una disminución significativa en la formación de HMWA y un aumento casi concomitante en la cantidad de dodecámeros de insulina con el aumento de la concentración de histidina en las condiciones de la formulación (Figura 7 y 8, respectivamente). Adicionalmente, sólo se pudo detectar la formación moderada de insulina monomérica en las condiciones posteriores a la inyección con el aumento de la concentración de histidina (Figura 9). Por lo tanto, la formación de HMWA se reduce significativamente en presencia de hasta 6 mM de histidina sin la formación de cantidades importantes de insulina monomérica en las condiciones posteriores a la inyección.

#### Ejemplo 7

Las preparaciones con concentraciones de citrato 0,0 mM, 0,2 mM, 0,4 mM y 0,6 mM se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 1C, sometidas a las condiciones de prueba descritas en el Ejemplo 2 y analizadas de acuerdo con los métodos analíticos en el Ejemplo 3A y 3B. Se observó una disminución significativa en la formación de HMWA y un aumento casi concomitante en la cantidad de dodecámeros de insulina con el aumento de la concentración de citrato en las condiciones de la formulación (Figura 10 y 11, respectivamente). Adicionalmente, sólo se pudo detectar la formación moderada de insulina monomérica en las condiciones posteriores a la inyección con el aumento de la concentración de citrato (Figura 12). Por lo tanto, la formación de HMWA se reduce significativamente en presencia de citrato sin la formación de cantidades importantes de insulina monomérica en las condiciones posteriores a la inyección.

## REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina en donde la formulación comprende además
- 5 a) más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,  
b) ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina usado en una cantidad de 0,1 mM a 2 mM suficiente para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.
2. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la relación molar entre el ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina y los iones de zinc es de 0,05 a 10, de aproximadamente 0,1 a 2, de 0,1 a 1 o de 0,2 a 1.
3. La formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en donde 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, o 99,8 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como dodecámeros medido por SEC con fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
4. La formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en donde 5 %, 4,5 %, 4 %, 3,5 %, 3,0 %, 2,5 %, 2,0 % o 1,5 % de las moléculas del derivado de insulina están presentes como monómeros medido por SEC sin fenol después del almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.
- 20 5. La formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en donde la formulación comprende un compuesto de histidina.
6. La formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en donde el derivado de insulina tiene un sustituyente -W-X-Y-Z unido al grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, donde el sustituyente es de la fórmula general: -W-X-Y-Z en donde W es:
- un residuo de α-aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral cuyo residuo forma, con uno de sus grupos de ácido carboxílico, un grupo amida junto con el grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;
  - una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de α-aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces carbonil amida, cuya cadena - mediante un enlace amida - se une al grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental, los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos que tienen un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de manera que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; o
  - un enlace covalente de X a un grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;
- X es:
- -CO-;
  - -CH(COOH)CO-;
  - —CO -N(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CO-;
  - —CO -N(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CON(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CO-;
  - —CO -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-;
  - —CO -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CON(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-;
  - -CO -NHCH(COOH)(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCO- ;
  - —CO -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CO-; o
  - —CO -N(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-.
- que
- 50 a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, mediante un enlace del carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o
- b) cuando W es un enlace covalente, mediante un enlace del carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con el grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina parental;
- Y es:
- -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>- donde m es un número entero en el intervalo de 6 a 32;
  - una cadena hidrocarbonada divalente que comprende 1, 2 o 3 grupos -CH=CH- y un número de grupos -CH<sub>2</sub>- suficiente para proporcionar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32;
- Z es:
- -COOH;
  - -CO-Asp;
  - -CO-Glu;
  - -CO-Gly;
  - -CO-Sar;
  - -CH(COOH)<sub>2</sub>;
- 65

- $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ ;
- $-\text{SO}_3\text{H}$ ; o
- $-\text{PO}_3\text{H}$

siempre que cuando W es un enlace covalente y X es  $-\text{CO}-$ , entonces Z es diferente de  $-\text{COOH}$ .

- 5
7. La formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, en donde la formulación farmacéutica comprende además una insulina de acción rápida.
- 10
8. El uso de ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina en una formulación farmacéutica soluble que comprende un derivado de insulina e iones de zinc, en donde ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina se usa en una cantidad suficiente para aumentar la tendencia de dicho derivado de insulina a autoasociarse en dodecámeros.
- 15
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la relación molar entre el ácido cítrico y/o el compuesto de histidina y los iones de zinc es de 0,05 a 10, de 0,1 a 2, de 0,1 a 1 o de 0,2 a 1.
- 20
10. Un proceso para preparar una formulación farmacéutica soluble que comprende
- a) proporcionar una fase acuosa que comprende un derivado de insulina,
  - b) proporcionar más de aproximadamente 4 iones de zinc por 6 moléculas del derivado de insulina,
  - c) proporcionar ácido cítrico monohidrato y/o un compuesto de histidina para aumentar la tendencia del derivado de insulina a autoasociarse a la forma dodecámero,
- mezclar la fase acuosa, los iones de zinc y el ácido cítrico monohidrato y/o el compuesto de histidina para formar una formulación farmacéutica soluble.

Figura 1

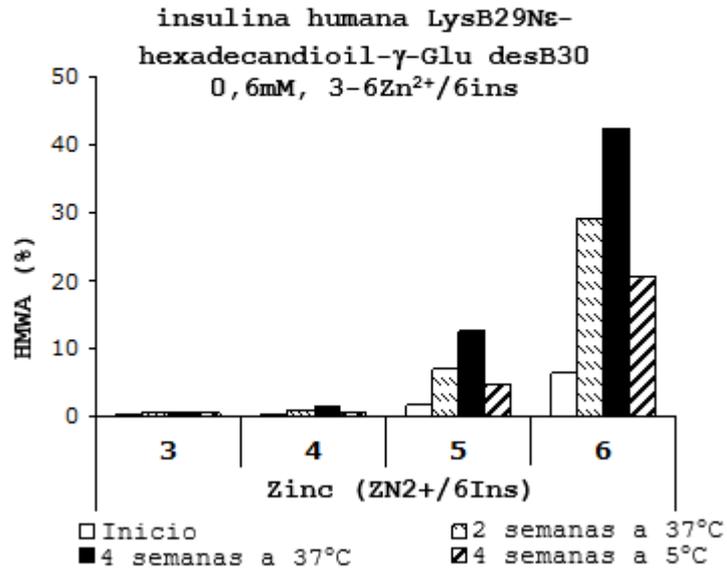


Figura 2

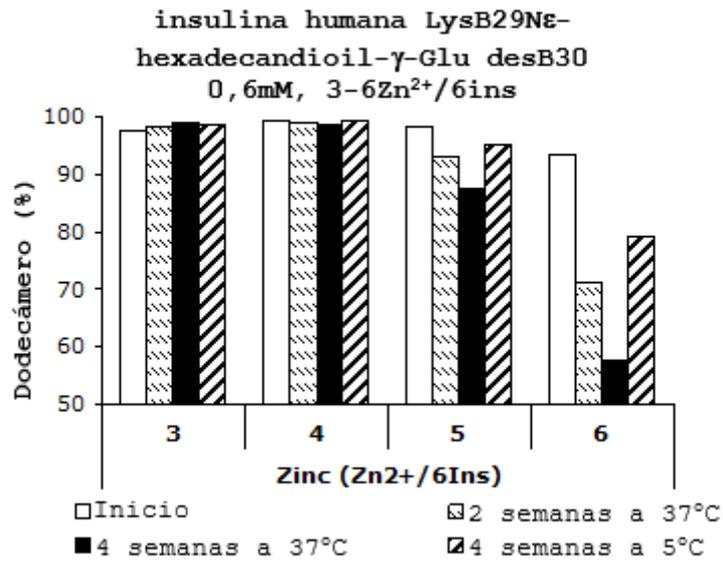


Figura 3

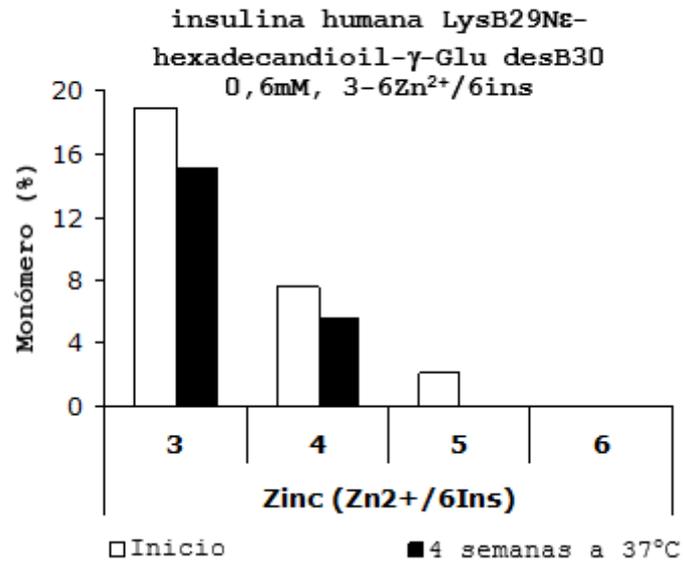


Figura 4

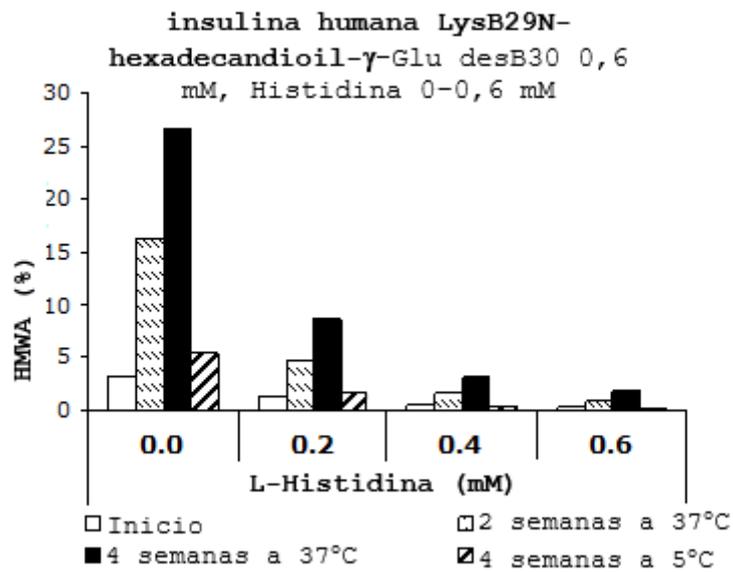


Figura 5

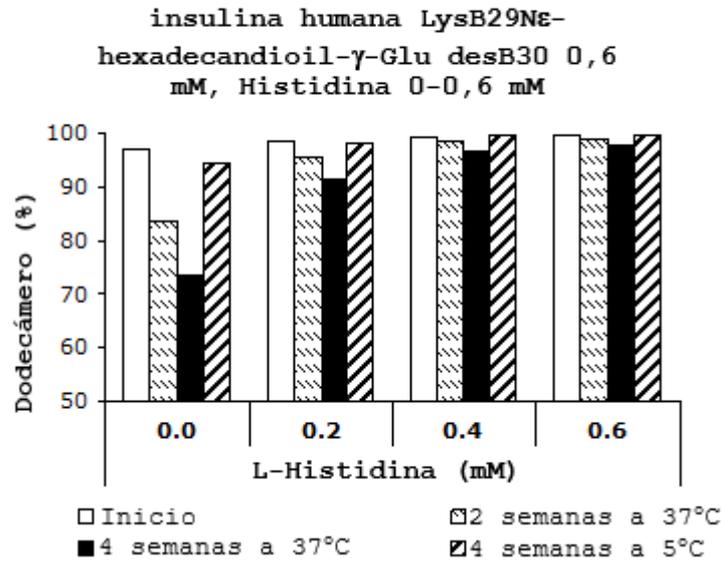


Figura 6

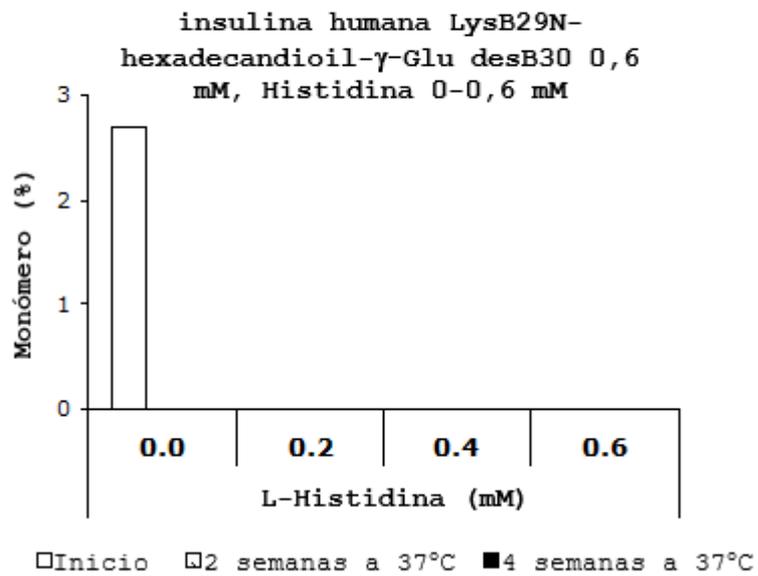




Figura 9

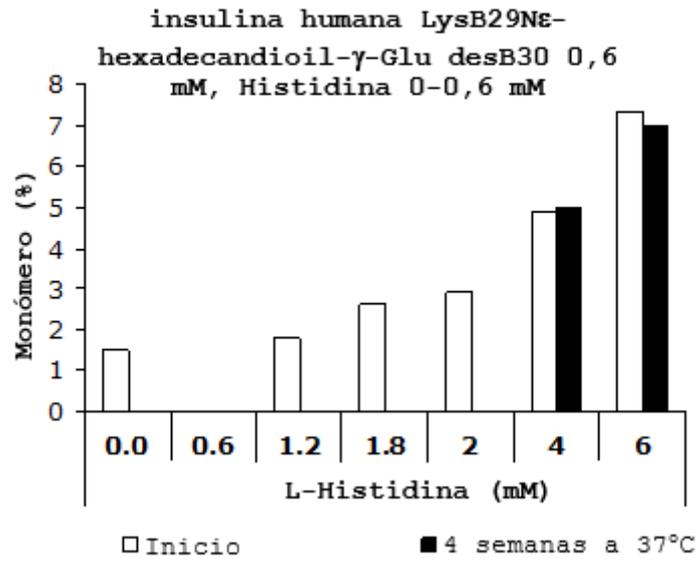


Figura 10

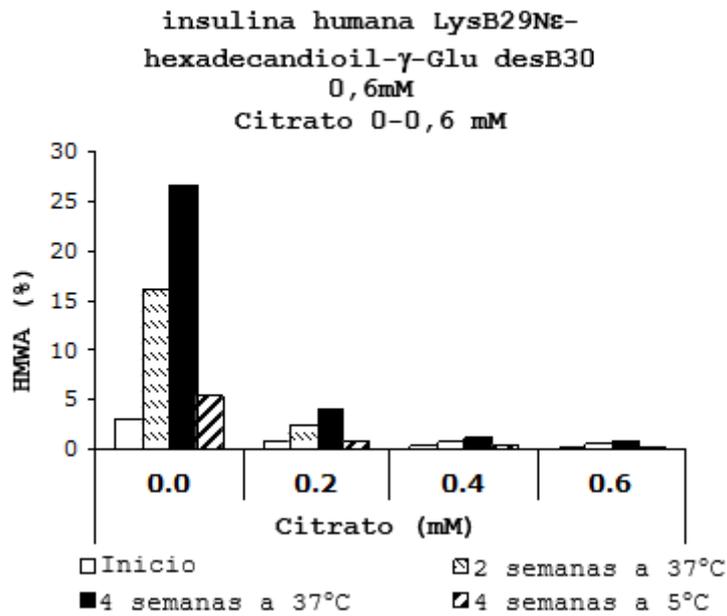


Figura 11

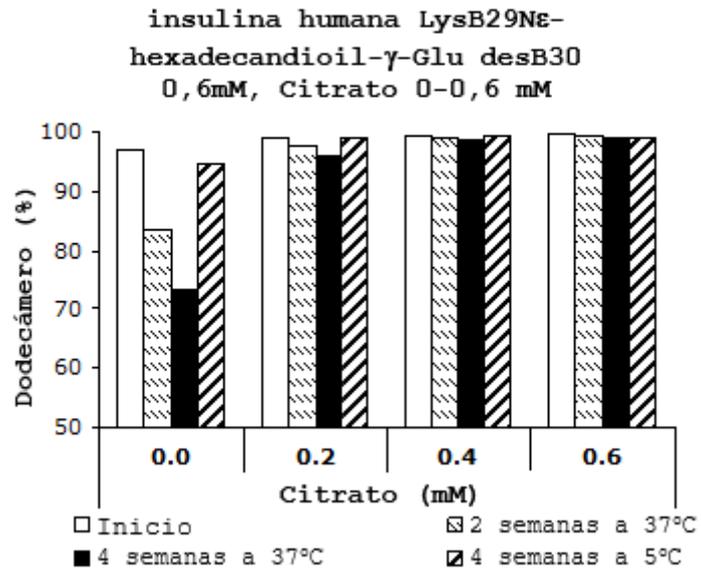


Figura 12

