

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 374**

51 Int. Cl.:

A61K 33/30 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2018 PCT/GB2018/051177**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2018 WO18203059**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2018 E 18723925 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023 EP 3618840**

54 Título: **Formulaciones de insulina estables**

30 Prioridad:

05.05.2017 GB 201707189

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

19.06.2024

73 Titular/es:

**ARECOR LIMITED (100.0%)
 Chesterford Research Park, Little Chesterford
 Saffron Walden CB10 1XL, GB**

72 Inventor/es:

**JEZEK, JAN;
 GERRING, DAVID;
 HOWELL, SARAH y
 ZAKRZEWSKI, LEON**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 973 374 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de insulina estables

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere entre otras a formulaciones líquidas acuosas de acción rápida de compuestos de insulina como se definen en la presente memoria. Dichas formulaciones son adecuadas para el tratamiento de sujetos que padecen diabetes mellitus, especialmente diabetes mellitus tipo 1.

Antecedentes de la invención

10 La diabetes mellitus ("diabetes") es un trastorno metabólico asociado con el pobre control de niveles de azúcar en sangre que lleva a hipo o hiperglucemia. La diabetes no tratada puede llevar a complicaciones microvasculares y macrovasculares serias que incluyen enfermedad arterial coronaria, enfermedad arterial periférica, ictus, nefropatía diabética, neuropatía y retinopatía. Los dos tipos principales de diabetes son (i) diabetes tipo 1 que resulta de que el páncreas no produce insulina por lo que el tratamiento normal es terapia de sustitución de insulina y (ii) diabetes tipo 2 donde los pacientes o producen insulina insuficiente o tienen resistencia a la insulina y por lo que los tratamientos incluyen agentes sensibilizantes a la insulina (como metformina o pioglitazona), secretagogos de insulina tradicionales (tales como sulfonilureas), inhibidores de SGLT2 (tales como dapagliflozina, canagliflozina y empagliflozina) que reducen la absorción de glucosa en los riñones y promueven por tanto la excreción de glucosa, agonistas de GLP-1 (tales como exenatida y dulaglutida) que estimulan la liberación de insulina desde células beta pancreáticas e inhibidores de DPPIV (como sitagliptina o vildagliptina) que inhiben la ruptura de GLP-1 que lleva a la secreción de insulina aumentada. Los pacientes con diabetes tipo 2 pueden necesitar eventualmente terapia de sustitución de insulina.

20 Para pacientes que necesitan terapia de sustitución de insulina, es posible una gama de opciones terapéuticas. El uso de insulina humana recombinante se ha superado en tiempos recientes mediante el uso de análogos de insulina que tienen propiedades modificadas, por ejemplo, son de acción más prolongada o de acción más rápida que la insulina normal. Por consiguiente, un régimen común para un paciente que implica recibir una insulina basal de acción prolongada suplementada por una insulina de acción rápida alrededor de las horas de las comidas.

25 La insulina es una hormona peptídica formada por dos cadenas (cadena A y cadena B, respectivamente 21 y 30 aminoácidos de longitud) unidas por medio de puentes disulfuro. La insulina existe normalmente a pH neutro en forma de un hexámero, comprendiendo cada hexámero tres dímeros unidos por iones de zinc. Los residuos de histidina en la insulina se conocen por estar implicados en la interacción con los iones de zinc. La insulina se almacena en el cuerpo en forma hexamérica pero la forma de monómero es la forma activa. Tradicionalmente, las composiciones terapéuticas de insulina se han formulado también en forma hexamérica en presencia de iones de zinc. Normalmente, hay aproximadamente tres cationes de zinc por un hexámero de insulina. Se ha apreciado que la forma hexamérica se absorbe desde el sitio de inyección considerablemente más lentamente que la forma monomérica o dimérica. Por lo tanto, un inicio más rápido de la acción de insulina se puede lograr si la forma hexamérica se desestabiliza permitiendo una disociación más rápida del hexámero unido al zinc en dímeros y monómeros en el espacio subcutáneo después de la inyección. Se han diseñado genéticamente tres análogos de insulina con este principio en mente. Uno primero es insulina lispro (Humalog®) en que los residuos 28 y 29 de la cadena B (Pro y Lys respectivamente) están invertidos, uno segundo es insulina aspart (NovoLog®) en que el residuo 28 de la cadena B, normalmente Pro, está sustituido por Asp y uno tercero es insulina glulisina (Apidra®) en que el residuo 3 de la cadena B, normalmente Asn, está sustituido por Lys y el residuo 29 de la cadena B, normalmente Lys, está sustituido por Glu.

40 Aunque los análogos de insulina de acción rápida existentes pueden lograr un inicio de acción más rápido, se ha apreciado que las insulinas de acción incluso más rápida ("acción ultrarrápida") se pueden lograr eliminando los cationes de zinc de la insulina completamente. Desafortunadamente, la consecuencia de la disociación de hexámeros es normalmente una disminución considerable en la estabilidad de la insulina tanto con respecto a la estabilidad física (p. ej., estabilidad de agregación) como a la estabilidad química (p. ej., estabilidad a la desaminación). Por ejemplo, la insulina monomérica o análogos de insulina que tienen un rápido inicio de acción se conocen por agregarse y volverse físicamente inestables muy rápidamente debido a que la formulación de agregados insolubles continúa por medio de monómeros de insulina. Se han descrito diversos enfoques para abordar este problema en la técnica:

El documento US5,866,538 (Norup) describe preparados de insulina de estabilidad química superior que comprenden insulina humana o un análogo o derivado de la misma, glicerol y/o manitol y 5 a 100 mM de un halogenuro (p. ej., NaCl).

50 El documento US7,205,276 (Boderke) aborda los problemas de estabilidad asociados con la preparación de formulaciones de insulina y derivados y análogos de insulina libres de zinc y describe una formulación líquida acuosa que comprende al menos un derivado de insulina, al menos un tensioactivo, opcionalmente al menos un conservante y opcionalmente al menos uno de un agente de isotonicidad, un tampón y un excipiente, en donde la formulación es estable y libre de o contiene menos de 0,4 % (p. ej., menos del 0,2 %) en peso de zinc en base al contenido de insulina de la formulación. El tensioactivo preferido parece ser polisorbato 20 (monolaurato de polioxietileno (20) de sorbitano).

El documento US2008/0194461 (Maggio) describe formulaciones de péptidos y polipéptidos que incluyen insulina que contienen un alquilglicósido, cuyo componente se dice que reduce la agregación y la inmunogenicidad.

- 5 La patente internacional WO2012/006283 (Pohl) describe formulaciones que contienen insulina junto con un quelante de zinc como etilendiaminatetraacetato (EDTA). Se dice que la modulación del tipo y cantidad de EDTA cambia el perfil de absorción de insulina. EDTA de calcio es la forma preferida de EDTA ya que se dice que se asocia con dolor reducido en el sitio de inyección y es menos probable que elimine calcio del cuerpo. Las formulaciones preferidas también contienen citrato que se dice que potencia adicionalmente la absorción y mejora la estabilidad química de la formulación.
- 10 El documento US2010/0227795 (Steiner) describe una composición que comprende insulina, un agente de disociación tal como ácido cítrico o citrato sódico, y un quelante de zinc tal como EDTA en donde la formulación tiene un pH fisiológico y es una disolución acuosa transparente. Las formulaciones se dice que tienen estabilidad mejorada y rápido inicio de acción.
- 15 La patente internacional WO2015/120457 (Wilson) describe formulaciones de insulina de acción ultrarrápida estabilizada que comprenden insulina en combinación con un quelante de zinc tal como EDTA, un agente de disolución/estabilización tal como ácido cítrico, una sal de magnesio, un compuesto de zinc y opcionalmente excipientes adicionales.
- Se han descrito enfoques adicionales para acelerar la absorción y el efecto de la insulina a través del uso de aditivos acelerantes específicos:
- La patente internacional WO91/09617 (Jørgensen) informa que la nicotinamida o ácido nicotínico o una sal de los mismos aumenta la velocidad de absorción de insulina a partir de preparados acuosos administrados parenteralmente.
- La patente internacional WO2010/149772 (Olsen) describe una formulación que comprende insulina, un compuesto nicotínico y arginina. La presencia de arginina se dice que mejora la estabilidad química de la formulación.
- 20 La patente internacional WO2015/171484 (Christe) describe formulaciones de acción rápida de insulina en donde el inicio de acción y/o absorción de insulina es más rápida debido a la presencia de treprostinilo.
- El documento US2013/0231281 (Soula) describe una composición en disolución acuosa que comprende insulina o un análogo de insulina y al menos un oligosacárido cuyo grado medio de polimerización está entre 3 y 13 y cuyo índice de polidispersión es superior a 1,0, teniendo dicho oligosacárido grupos funcionales carboxilo parcialmente sustituidos, siendo los grupos funcionales carboxilo no sustituidos salificables. Dicha formulación se dice que es de acción rápida.
- 25 La patente internacional WO2017/191464 (Arecor Limited) describe formulaciones que comprenden insulina o un análogo de insulina, zinc iónico, un agente quelante y polisorbato 80.
- El documento US2009/137455 (Steiner) describe una formulación que contiene una combinación de una insulina de acción rápida y una insulina de acción prolongada, en donde el pH de la insulina de acción rápida se ajusta de manera que la insulina de acción prolongada permanece soluble cuando se mezclan.
- 30 Pohl et al. (Journal of Diabetes Science and Technology, vol. 6, núm. 4, 2012, páginas 755-763) describe experimentos *in vitro* que investigan una formulación de insulina humana recombinante que contiene citrato y ácido etilendiaminatetraacético disódico (EDTA).
- 35 Moghaddam et al. (Asian Journal of Biochemistry, vol. 10, núm. 1, 2015, páginas 17-30) describe un estudio que investiga las posibles interacciones de la insulina con cuatro tensioactivos de polisorbato no iónicos usando difracción circular y espectroscopia de fluorescencia.
- Lougheed et al. (Diabetes, American Diabetes Association, EE. UU., vol. 32, núm. 5, 1983, páginas 424-432) describe un estudio que investiga los efectos de varios compuestos en el comportamiento de agregación de disoluciones de insulina con zinc cristalina (CZI).
- 40 Sería deseable si los análogos o formulaciones de insulina estuvieran disponibles que fueran de acción ultra-rápida, ajustando por consiguiente de forma más estrecha la actividad de la insulina fisiológica. Existe también una necesidad en la técnica para proporcionar formulaciones adicionales, y preferiblemente mejoradas, de insulina y análogos de insulina que son de acción rápida y estables.

Compendio de la invención

- 45 Según la invención se proporciona una formulación farmacéutica líquida acuosa que comprende: (i) un compuesto de insulina seleccionado de insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina e insulina humana recombinante; (ii) zinc iónico; (iii) una especie que se une al zinc a una concentración de 1 mM o más seleccionada de especies que tienen un logK con respecto a la unión al ion zinc en el intervalo de 4,5-10 a 25 °C, en donde dicha especie que se une al zinc es citrato; (iv) una especie que se une al zinc seleccionada de especies que tienen un logK con respecto a la
- 50 unión al ion zinc de más de 12,3 a 25 °C a una concentración de entre aproximadamente 0,02 mM y aproximadamente 0,2 mM; y (v) un tensioactivo no iónico que es un glicósido de alquilo seleccionado del grupo que consiste en maltósido de dodecilo, glucósido de dodecilo, glucósido de octilo, maltósido de octilo, glucósido de decilo, maltósido de decilo, glucósido de tridecilo, maltósido de tridecilo, glucósido de tetradecilo, maltósido de tetradecilo, glucósido de hexadecilo, maltósido de hexadecilo, monoctanoato de sacarosa, monodecanoato de sacarosa, monododecanoato

de sacarosa, monotridecanoato de sacarosa, monotetradecanoato de sacarosa y monohexadecanoato de sacarosa ("la formulación de la invención").

5 Las formulaciones de la invención proporcionan insulina en una forma que es de acción rápida o ultrarrápida con buena estabilidad física y química. Como se anota en la discusión de antecedentes anterior, el uso de EDTA para quelar iones zinc en insulina hexamérica aumenta la rapidez de acción pero al coste de estabilidad muy reducida. Los presentes inventores han apreciado que una combinación de una especie que se une al zinc menos fuertemente, junto con una cantidad pequeña de un quelante fuerte tal como EDTA y un tensioactivo no iónico pueden conseguir efectos similares en términos de velocidad de acción, pero con mucha mejor estabilidad.

10 Las formulaciones de la invención pueden usarse en el tratamiento de sujetos que padecen diabetes mellitus, particularmente diabetes mellitus tipo 1 para la administración en los momentos de las comidas.

15 Como se puede ver a partir de los ejemplos acompañantes, las formulaciones de la invención son significativamente más estables que las formulaciones correspondientes sin tensioactivo no iónico. Se espera que las formulaciones actúen más rápidamente que las formulaciones correspondientes que no contienen una especie que se une al zinc. La inclusión de una pequeña cantidad de una especie que se une al zinc fuertemente en presencia de un tensioactivo no iónico se cree que aumenta adicionalmente la velocidad de acción de la insulina más allá de lo que se logra mediante la especie que se une al zinc más débilmente solo sin comprometer la estabilidad de la formulación.

Descripción de los listados de secuencia

SEQ ID NO: 1: cadena A de la insulina humana

SEQ ID NO: 2: cadena B de la insulina humana

20 SEQ ID NO: 3: cadena B de la insulina lispro

SEQ ID NO: 4: cadena B de la insulina aspart

SEQ ID NO: 5: cadena B de la insulina glulisina

Descripción detallada de la invención

25 Como se usa en la presente memoria, "compuesto de insulina" se refiere a insulina y análogos de insulina. El compuesto de insulina en el conjunto de reivindicaciones adjuntas se selecciona de insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina e insulina humana recombinante.

30 Como se usa en la presente memoria, "insulina" se refiere a la insulina humana nativa que tiene una cadena A y una cadena B como se describe en las SEQ ID NOs. 1 y 2 y que contienen y están conectadas por puentes disulfuro como en la molécula nativa (Cys A6-Cys A11, Cys B7 a Cys A7 y Cys B19-Cys A20). La insulina es adecuadamente insulina recombinante.

35 "Análogo de insulina" se refiere a un análogo de insulina que es un agonista receptor de insulina y tiene una secuencia de aminoácidos modificada, de manera que contiene 1 o 2 cambios de aminoácidos en la secuencia de la cadena A o B (especialmente la cadena B). De forma deseable, dichas modificaciones de aminoácidos pretenden reducir la afinidad de la molécula por el zinc y aumentar así la velocidad de acción. Los análogos de insulina ejemplares incluyen análogos de acción más rápida tales como insulina lispro, insulina aspart e insulina glulisina. Estas formas de insulina tienen la cadena A de insulina humana pero variantes de cadenas B – véanse las SEQ ID NOs. 3-5. Se describen análogos de acción más rápida adicionales en las patentes europeas EP0214826, EP0375437 y EP0678522. Por consiguiente, deseablemente un análogo de insulina tiene una velocidad de acción que es igual que o preferiblemente mayor que la de la insulina. La velocidad de acción de la insulina o un análogo de insulina puede determinarse en el modelo farmacocinético/farmacodinámico del cerdo diabético (véanse los ejemplos, Métodos generales).

40

En una realización el compuesto de insulina es insulina humana recombinante. En otra realización es una insulina lispro. En otra realización es una insulina aspart. En otra realización es insulina glulisina.

45 El término "formulación farmacéutica acuosa", como se usa en la presente memoria, se refiere a una formulación adecuada para uso terapéutico en que el componente acuoso es o comprende agua, preferiblemente agua destilada, agua desionizada, agua para inyección, agua estéril para inyección o agua bacteriostática para inyección. Las formulaciones farmacéuticas acuosas de la invención son formulaciones en disolución en que todos los componentes están disueltos en agua.

50 La concentración del compuesto de insulina en la formulación estará normalmente en el intervalo de 10-1000 U/ml, tal como 50-500 U/ml, p. ej., 50-200 U/ml. Una formulación ejemplar contiene compuesto de insulina a una concentración de 100 U/ml (aproximadamente 3,6 mg/ml). Otro intervalo de interés es 500-1000 U/ml, p. ej., 800-1000 U/ml y otra formulación ejemplar contiene compuesto de insulina a una concentración de 1000 U/ml (aproximadamente 36 mg/ml).

Las formulaciones de la invención contienen zinc iónico, es decir, iones Zn^{2+} . La fuente de zinc iónico será

normalmente una sal de zinc soluble en agua tal como $ZnCl_2$, ZnO , $ZnSO_4$, $Zn(NO_3)_2$ o $Zn(\text{acetato})_2$ y lo más adecuado $ZnCl_2$ u ZnO .

5 La concentración del zinc iónico en la formulación será normalmente más de 0,05 % p. ej., más de 0,1 % p. ej., más de 0,2 %, más de 0,3 % o más de 0,4 % en peso de zinc en base al peso del compuesto de insulina en la formulación. Por tanto la concentración del zinc iónico en la formulación puede ser más de 0,5 % en peso de zinc en base al peso de compuesto de insulina en la formulación, por ejemplo 0,5-1 %, p. ej. 0,5-0,75 %, p. ej. 0,5-0,6 % en peso de zinc en base al peso de compuesto de insulina en la formulación. Para el cálculo se excluye el peso del contraión del zinc.

10 En una formulación que contiene, p. ej., 100 U/ml de compuesto de insulina, la concentración del zinc iónico será normalmente de más de 0,015 mM, p. ej., más de 0,03 mM, p. ej., más de 0,06 mM, más de 0,09 mM o más de 0,12 mM. Por tanto la concentración del zinc iónico en la formulación puede ser de más de 0,15 mM, por ejemplo 0,15-0,60 mM, p. ej. 0,20-0,45 mM, p. ej. 0,25-0,35 mM.

15 En una formulación que contiene, p. ej., 1000 U/ml de compuesto de insulina, la concentración del zinc iónico será normalmente de más de 0,15 mM, p. ej., más de 0,3 mM, p. ej., más de 0,6 mM, más de 0,9 mM o más de 1,2 mM. Por consiguiente, la concentración del zinc iónico en la formulación puede ser más de 1,5 mM, por ejemplo, 1,5-6,0 mM, p. ej. 2,0-4,5 mM, p. ej. 2,5-3,5 mM.

20 Las formulaciones de la invención contienen al menos dos especies diferentes que se unen al zinc: una especie que se une al zinc que tiene un $\log K$ con respecto a la unión al ion de zinc en el intervalo de 4,5-10 a 25 °C, y una especie que se une al zinc que tiene un $\log K$ con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C. Pueden usarse las constantes de estabilidad de unión al metal enumeradas en la base de datos de referencia 46 del Instituto nacional de estándares y tecnología (Constantes de estabilidad de complejos metálicos seleccionadas de manera crítica). La base de datos normalmente enumera constantes $\log K$ determinadas a 25 °C. Por lo tanto, la idoneidad de las especies que se unen al zinc para la presente invención puede determinarse en base a su constante de estabilidad de unión al metal $\log K$ con respecto a la unión al zinc, como se mide a 25 °C y como se cita por la base de datos.

Especie que se une al zinc que tiene un $\log K$ con respecto a la unión al ion de zinc en el intervalo de 4,5-10 a 25 °C

25 La especie que se une al zinc que tienen un $\log K$ con respecto a la unión al ion de zinc en el intervalo de 4,5-10 a 25 °C es citrato ($\log K = 4,93$) que puede emplearse, por ejemplo, como citrato trisódico.

La concentración más adecuada de la especie que se une al zinc estará normalmente en el intervalo de 1-100 mM.

30 Por ejemplo, la concentración de la especie que se une al zinc que tiene un $\log K$ con respecto a la unión al zinc en el intervalo de 4,5-10 a 25 °C en la formulación puede estar normalmente en el intervalo de 1-50 mM, más preferiblemente 5-50 mM, p. ej., 10-50 mM, p. ej., 10-30 mM, más preferiblemente aproximadamente 20 mM (p. ej., 22 mM), y especialmente para formulaciones de 100 U/ml de compuesto de insulina. De forma adecuada, la concentración de la especie que se une al zinc en la formulación es 10-50 mM, p. ej., 30-50 mM, p. ej. 40-50 mM, más preferiblemente aproximadamente 44 mM para formulaciones de 1000 U/ml de compuesto de insulina.

En una realización, la concentración de la especie que se une al zinc es 10 mM o más.

35 La especie que se une al zinc aniónico puede emplearse como el ácido libre o una forma salina, tal como una forma salina con iones de sodio o calcio, especialmente iones de sodio.

De forma adecuada la relación molar de zinc iónico a especie que se une al zinc que tiene un $\log K$ con respecto a la unión al ion de zinc en el intervalo de 4,5-10 a 25 °C en la formulación está en el intervalo de 1:1 a 1:1000, p. ej. 1:1 a 1:500, p. ej. 1:3 a 1:500, p. ej. 1:3 a 1:175.

40 Por ejemplo, una relación molar adecuada de zinc iónico a especie que se une al zinc es 1:10-1:500, p. ej. 1:20-1:500, p. ej. 1:20-1:100 o 1:40-1:250, p. ej. 1:40:1-90 o 1:60-1:200, p. ej. 1:60-1:80. Los siguientes intervalos son particularmente de interés: 1:10-1:500, p. ej. 1:10-1:200, p. ej. 1:10 a 1:100, p. ej. 1:10-1:50, p. ej. 1:10 a 1:30 (especialmente para la formulación de 1000 U/ml de compuesto de insulina) o 1:50-1:100, p. ej. 1:60-1:80 (especialmente para la formulación de 100 U/ml de compuesto de insulina).

45 Por ejemplo, una formulación que contiene 100 U/ml de compuesto de insulina puede contener aproximadamente 0,3 mM de zinc iónico (es decir, aproximadamente 19,7 $\mu\text{g/ml}$ de zinc iónico, es decir, aproximadamente 0,54 % en peso de zinc en base al peso de compuesto de insulina en la formulación) y aproximadamente 15-30 mM, p. ej. 20-30 mM de especie que se une al zinc que tiene un $\log K$ con respecto a la unión al ion de zinc en el intervalo de 4,5-10 a 25 °C.

50 Por ejemplo, una formulación que contiene 1000 U/ml de compuesto de insulina puede contener aproximadamente 3 mM de zinc iónico (es decir, aproximadamente 197 $\mu\text{g/ml}$ de zinc iónico, es decir, aproximadamente 0,54 % en peso de zinc en base al peso de compuesto de insulina en la formulación) y aproximadamente 30-60 mM, p. ej. 40-60 mM de especie que se une al zinc que tiene un $\log K$ con respecto a la unión al ion de zinc en el intervalo de 4,5-10 a 25 °C.

La referencia al citrato se refiere a la o a una forma ionizada del ácido cítrico correspondiente.

El citrato en forma ácida (ácido cítrico) puede introducirse en las formulaciones acuosas de la invención en forma de una sal del ácido, tal como una sal sódica (citrato sódico). De forma alternativa, puede introducirse en forma del ácido con el posterior ajuste de pH al nivel requerido.

Especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C.

- 5 Una especie que se une al zinc preferida que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C es EDTA (logK = 14,5) que puede, por ejemplo, emplearse como EDTA disódico. Un ejemplo adicional es EGTA (etilenglicoltetraacetato; logK = 12,6). Otra posible especie que se une al zinc puede seleccionarse de la siguiente lista:

Tetraetilenpentamina (logK = 15,1);

- 10 N-(2-hidroxi)etilendinitrilotriacetato (HEDTA) (logK = 14,6);

1-Metil-etilendinitrilotriacetato (PDTA) (logK = 17,5);

1-Etil-etilendinitrilotriacetato (logK = 18,3);

1-Propil-etilendinitrilotriacetato (logK = 18,2);

1-Carboxietil-etilendinitrilotriacetato (logK = 15,3);

- 15 Trietilentetranitriohexaacetato (TTHA) (logK = 17,9);

Tetraetilenpentanitriohexaacetato (TPHA) (logK = 18,0); y

Tris(2-aminoetil)amina (Tren) (logK = 14,5).

Normalmente dicha especie que se une al zinc tendrá un logK con respecto a la unión al ion de zinc de 12,3-18, p. ej. 12,3-16 a 25 °C.

- 20 La concentración de la especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C está entre aproximadamente 0,02 mM y aproximadamente 0,2 mM.

Por ejemplo, la concentración de la especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C en la formulación puede estar normalmente en el intervalo de aproximadamente 0,02-0,15 mM, p. ej. 0,05-0,15 mM, más preferiblemente aproximadamente 0,1 mM, especialmente cuando la especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C es EDTA.

- 25 La especie que se une al zinc aniónico puede emplearse como el ácido libre o una forma salina, tal como una forma salina con iones de sodio o calcio, especialmente iones de sodio.

Puede emplearse una mezcla de especies que se unen al zinc que tienen un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C, aunque se prefiere una sola especie que se une al zinc.

- 30 De forma adecuada la relación molar del zinc iónico a la especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C a zinc iónico en la formulación está en el intervalo de 1:1 a 1:100, p. ej. 1:1 a 1:50, p. ej. 1:2 a 1:25 o 1:4 a 1:20, p. ej. 1:5 a 1:10, especialmente para EDTA como especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C.

- 35 Por ejemplo, una formulación que contiene 100 U/ml de compuesto de insulina puede contener aproximadamente 0,3 mM de zinc iónico (es decir, aproximadamente 19,7 µg/ml de zinc iónico, es decir, aproximadamente 0,54 % en peso de zinc en base al peso de compuesto de insulina en la formulación) y aproximadamente 0,05-0,2 mM de especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C (especialmente EDTA).

- 40 Por ejemplo, una formulación que contiene 1000 U/ml de compuesto de insulina puede contener aproximadamente 3 mM de zinc iónico (es decir, aproximadamente 197 µg/ml de zinc iónico, es decir, aproximadamente 0,54 % en peso de zinc en base al peso de compuesto de insulina en la formulación) y aproximadamente 0,05-0,2 mM de especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C (especialmente EDTA).

- 45 De forma adecuada la relación molar de citrato a la especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C en la formulación está en el intervalo de 3:1 a 2000:1, p. ej. 10:1 a 1500:1, p. ej. 20:1 a 1000:1 o 50:1 a 1000:1, p. ej. 100:1 a 500:1, especialmente para el citrato como especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc en el intervalo de 4,5-10 a 25 °C y EDTA como especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C.

Sin estar limitados por la teoría, los inventores creen que lo siguiente es relevante para el funcionamiento de la invención: el logK es una medida de la fuerza del enlace coordinado entre un ligando (es decir, una especie que se une al zinc en el contexto de la presente invención) y un ion metálico (es decir, zinc iónico en el contexto de la presente

- invención). Un ligando con mayor logK se unirá al zinc más fuertemente que un ligando con un menor logK y un experto será capaz de calcular las concentraciones de equilibrio del (de los) complejo(s) ligando-metal, ligando(s) libre(s) y metal(es) libre(s) si se conocen las constantes logK y las concentraciones totales de todos los ligandos y metales. La estructura hexamérica de la insulina puede disociarse en presencia de una especie que tenga un logK suficientemente alto con respecto a la unión al zinc y es por tanto capaz de eliminar el zinc de la estructura hexamérica de la insulina. Mientras que una especie que se une al zinc que tenga un logK con respecto a la unión al zinc de más de 12,3 tendrá la capacidad de disociar la estructura hexamérica de insulina, una especie que se une al zinc que tenga un logK con respecto a la unión al zinc en el intervalo de 4,5-10 tendrá una capacidad más limitada (en algunos casos insignificante) para disociar la estructura hexamérica de insulina.
- 5 Las formulaciones de la invención están preferiblemente esencialmente libres (p. ej. menos de 0,01 mM tal como menos de 0,005 mM y preferiblemente libres) de especies que tienen un logK con respecto a la unión al ion de zinc de 10-12,3 a 25 °C.
- Las especies que se unen al zinc que son ácidos (p. ej. ácido etilendiaminatetraacético) pueden introducirse en la disolución acuosa en forma de una sal del ácido, tal como una sal sódica (p. ej. las sales disódicas o tetrasódicas de ácido etilendiaminatetraacético). Alternativamente, pueden introducirse en forma del ácido con ajuste posterior de pH al nivel requerido.
- 15 Las formulaciones de la invención contienen un tensioactivo no iónico que es un glicósido de alquilo seleccionado de maltósido de dodecilo, glucósido de dodecilo, glucósido de octilo, maltósido de octilo, glucósido de decilo, maltósido de decilo, glucósido de tridecilo, maltósido de tridecilo, glucósido de tetradecilo, maltósido de tetradecilo, glucósido de hexadecilo, maltósido de hexadecilo, monooctanoato de sacarosa, monodecanoato de sacarosa, monododecanoato de sacarosa, monotridecanoato de sacarosa, monotetradecanoato de sacarosa y monohexadecanoato de sacarosa, especialmente maltósido de dodecilo.
- 20 La concentración del tensioactivo no iónico en la formulación estará normalmente en el intervalo de 1-1000 µg/ml, p. ej. 5-500 µg/ml, p. ej. 10-200 µg/ml, tal como 10-100 µg/ml especialmente aproximadamente 50 µg/ml.
- 25 De forma adecuada el pH de las formulaciones acuosas de la invención está en el intervalo de 5,5-9,0, especialmente 6,5-8,0, p. ej. 7,0-7,8, p. ej. 7,0-7,5. Para minimizar el dolor de la inyección el pH está preferiblemente cerca del pH fisiológico (aproximadamente pH 7,4). Otro intervalo de pH de interés es 7,6-8,0, p. ej., aproximadamente 7,8.
- De forma adecuada, la formulación de la invención comprende un tampón para estabilizar el pH de la formulación, que puede además seleccionarse para mejorar la estabilidad de la proteína. En una realización, se selecciona un tampón para tener un pKa cercano al pH de la formulación; por ejemplo se emplea histidina de forma adecuada como un tampón cuando el pH de la formulación está en el intervalo de 5,0-7,0. Dicho tampón puede emplearse en una concentración de 0,5-20 mM, p. ej., 2-5 mM. El citrato en la formulación como una especie que se une al zinc puede tener también un papel tamponante. Como otro ejemplo, el fosfato se emplea de forma adecuada como un tampón cuando el pH de la formulación está en el intervalo de 6,1-8,1. Dicho tampón puede emplearse en una concentración de 0,5-20 mM, p. ej. 2-5 mM. De forma alternativa, en otra realización, la formulación de la invención se estabiliza adicionalmente como se describe en la patente internacional WO2008/084237, que describe una formulación que comprende una proteína y uno o más aditivos, caracterizados por que el sistema está esencialmente libre de un tampón convencional, es decir, un compuesto con un grupo ionizable que tiene un pKa dentro de 1 unidad del pH de la formulación en el intervalo de temperatura previsto de almacenamiento de la formulación, tal como 25 °C. En esta realización, el pH de la formulación se ajusta a un valor al que la formulación tenga una estabilidad medible máxima con respecto al pH; el uno o más aditivos (tampones reemplazados) son capaces de intercambiar protones con el compuesto de insulina y tienen valores de pKa de al menos 1 unidad más o menos que el pH de la formulación en el intervalo de temperatura previsto de almacenamiento de la formulación. Los aditivos pueden tener grupos ionizables que tienen pKa entre 1 a 5 unidades de pH, preferiblemente entre 1 a 3 unidades de pH, lo más preferiblemente de 1,5 a 2,5 unidades de pH, del pH de la formulación acuosa al intervalo de temperatura previsto de almacenamiento de la formulación (p. ej., 25 °C). Dichos aditivos pueden emplearse normalmente a una concentración de 0,5-10 mM, p. ej. 2-5 mM.
- 30 De forma adecuada, la formulación de la invención comprende un tampón para estabilizar el pH de la formulación, que puede además seleccionarse para mejorar la estabilidad de la proteína. En una realización, se selecciona un tampón para tener un pKa cercano al pH de la formulación; por ejemplo se emplea histidina de forma adecuada como un tampón cuando el pH de la formulación está en el intervalo de 5,0-7,0. Dicho tampón puede emplearse en una concentración de 0,5-20 mM, p. ej., 2-5 mM. El citrato en la formulación como una especie que se une al zinc puede tener también un papel tamponante. Como otro ejemplo, el fosfato se emplea de forma adecuada como un tampón cuando el pH de la formulación está en el intervalo de 6,1-8,1. Dicho tampón puede emplearse en una concentración de 0,5-20 mM, p. ej. 2-5 mM. De forma alternativa, en otra realización, la formulación de la invención se estabiliza adicionalmente como se describe en la patente internacional WO2008/084237, que describe una formulación que comprende una proteína y uno o más aditivos, caracterizados por que el sistema está esencialmente libre de un tampón convencional, es decir, un compuesto con un grupo ionizable que tiene un pKa dentro de 1 unidad del pH de la formulación en el intervalo de temperatura previsto de almacenamiento de la formulación, tal como 25 °C. En esta realización, el pH de la formulación se ajusta a un valor al que la formulación tenga una estabilidad medible máxima con respecto al pH; el uno o más aditivos (tampones reemplazados) son capaces de intercambiar protones con el compuesto de insulina y tienen valores de pKa de al menos 1 unidad más o menos que el pH de la formulación en el intervalo de temperatura previsto de almacenamiento de la formulación. Los aditivos pueden tener grupos ionizables que tienen pKa entre 1 a 5 unidades de pH, preferiblemente entre 1 a 3 unidades de pH, lo más preferiblemente de 1,5 a 2,5 unidades de pH, del pH de la formulación acuosa al intervalo de temperatura previsto de almacenamiento de la formulación (p. ej., 25 °C). Dichos aditivos pueden emplearse normalmente a una concentración de 0,5-10 mM, p. ej. 2-5 mM.
- 35 Las formulaciones acuosas de la presente invención cubren un amplio intervalo de osmolaridad, que incluyen formulaciones hipotónicas, isotónicas e hipertónicas. Preferiblemente, las formulaciones de la invención son esencialmente isotónicas. De forma adecuada, la osmolaridad de la formulación se selecciona para minimizar el dolor según la ruta de administración, p. ej., tras la inyección. Las formulaciones preferidas tienen una osmolaridad en el intervalo de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 mOsm/L. Preferiblemente, la osmolaridad está en el intervalo de aproximadamente 250 a aproximadamente 350 mOsm/L. Más preferiblemente, la osmolaridad es aproximadamente 300 mOsm/L.
- 50 La tonicidad de la formulación puede ajustarse con un agente modificador de la tonicidad. Los agentes modificadores de la tonicidad pueden estar cargados o no cargados. Ejemplos de agentes modificadores de la tonicidad cargados incluyen sales tales como una combinación de iones de sodio, potasio, magnesio o calcio, con iones cloruro, sulfato, carbonato, sulfito, nitrato, lactato, succinato, acetato o maleato (especialmente cloruro sódico o sulfato sódico, particularmente cloruro sódico). Los aminoácidos tales como arginina, glicina o histidina también pueden usarse para
- 55

este fin. El agente modificador de tonicidad cargado se usa preferiblemente a una concentración de 100-300 mM, p. ej., aproximadamente 150 mM. Ejemplos de agentes modificadores de tonicidad no cargados incluyen azúcares, alcoholes de azúcar y otros polioles, tales como trehalosa, sacarosa, manitol, glicerol, 1,2-propanodiol, rafinosa, lactosa, dextrosa, sorbitol o lactitol (especialmente trehalosa, manitol, glicerol o 1,2-propanodiol, particularmente glicerol). El agente modificador de tonicidad no cargado se usa preferiblemente a una concentración de 200-500 mM, p. ej., aproximadamente 300 mM.

Cuando el compuesto de insulina es insulina lispro, la tonicidad se ajusta adecuadamente usando un agente modificador de la tonicidad no cargado, preferiblemente a una concentración de 200-500 mM, p. ej., aproximadamente 300 mM. En esta realización, el agente modificador de la tonicidad no cargado se selecciona adecuadamente del grupo que consiste en trehalosa, manitol, glicerol y 1,2-propanodiol (lo más adecuadamente glicerol). Cuando el compuesto de insulina es insulina aspart a una concentración de 500 U/ml o menos (p. ej., 100 U/ml), la tonicidad se ajusta de forma adecuada usando un agente modificador de la tonicidad cargado, especialmente cloruro sódico, preferiblemente a una concentración de 100-300 mM, p. ej., aproximadamente 150 mM. Cuando el compuesto de insulina es insulina aspart a una concentración de >500 U/ml (p. ej., 1000 U/ml), la tonicidad se ajusta adecuadamente usando un agente modificador de la tonicidad no cargado, preferiblemente a una concentración de 200-500 mM, p. ej., aproximadamente 300 mM. En esta realización, el agente modificador de la tonicidad no cargado se selecciona adecuadamente del grupo que consiste en trehalosa, manitol, glicerol y 1,2-propanodiol (lo más adecuadamente glicerol).

La fuerza iónica de una formulación puede calcularse según la fórmula:

$$I = 0,5 \times \sum_{x=1}^n c_x z_x^2$$

En que c_x es la concentración molar del ion x (mol L^{-1}), z_x es el valor absoluto de la carga del ion x y la suma cubre todos los iones (n) presentes en la formulación. La contribución del propio compuesto de insulina debería ignorarse para el cálculo. Para los zwitteriones el valor absoluto de la carga es la carga total excluyendo la polaridad, p. ej., para la glicina los iones posibles tienen carga absoluta de 0, 1 o 2 y para el aspartato los posibles iones tienen carga absoluta de 0, 1, 2 o 3.

En general, la fuerza iónica de la formulación está adecuadamente en el intervalo de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 500 mM.

Cuando el compuesto de insulina es insulina lispro, la fuerza iónica de la formulación se mantiene adecuadamente a un nivel mínimo ya que las formulaciones de mayor fuerza iónica son menos estables que las formulaciones de menor fuerza iónica. Adecuadamente, la fuerza iónica teniendo en cuenta los iones en la formulación excepto para la especie que se une al zinc y el compuesto de insulina, es menor que 40 mM, p. ej., menos de 20 mM, p. ej., menos que 10 mM tal como 5-10 mM.

Cuando el compuesto de insulina es insulina aspart a una concentración de >500 U/ml (p. ej., 1000 U/ml), la fuerza iónica de la formulación se mantiene adecuadamente a un nivel mínimo ya que las formulaciones de mayor fuerza iónica son menos estables que las formulaciones de menor fuerza iónica. Adecuadamente, la fuerza iónica teniendo en cuenta los iones de la formulación excepto para la especie que se une al zinc y el compuesto de insulina, es menor que 40 mM, p. ej., menos de 20 mM, p. ej., menos de 10 mM.

Cuando el compuesto de insulina es insulina aspart a una concentración de 500 U/ml o menos (p. ej., 100 U/ml), la fuerza iónica de la formulación puede ser alta. Adecuadamente, la fuerza iónica teniendo en cuenta los iones en la formulación excepto para la especie que se une al zinc y el compuesto de insulina, es más que 50 mM, p. ej., más que 100 mM, p. ej., 50-500 mM o 100-500 mM o 100-300 mM tal como aproximadamente 150 mM.

Las formulaciones de la invención pueden incluir opcionalmente conservante, preferiblemente fenol, m-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, propilparabeno, metilparabeno, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio.

Las formulaciones de la invención pueden comprender opcionalmente nicotinamida. La presencia de nicotinamida puede aumentar adicionalmente la velocidad del inicio de acción de la insulina formulada en formulaciones de la invención. Adecuadamente, la concentración de la nicotinamida está en el intervalo de 10-150 mM, preferiblemente en el intervalo de 20-100 mM, tal como aproximadamente 80 mM.

Las formulaciones de la invención pueden comprender opcionalmente ácido nicotínico o una sal del mismo. La presencia de ácido nicotínico o una sal del mismo puede aumentar más también la velocidad del inicio de acción de la insulina formulada en formulaciones de la invención. Adecuadamente, la concentración de ácido nicotínico o una sal del mismo está en el intervalo de 10-150 mM, preferiblemente en el intervalo de 20-100 mM, tal como aproximadamente 80 mM. Sales de ejemplo incluyen sales metálicas tales como sales de sodio, potasio y magnesio.

En una realización, uno de nicotinamida y ácido nicotínico (o como sales de los mismos) se incluye en la formulación pero no ambos. En una realización, una mezcla de nicotinamida y ácido nicotínico (o como sales de los mismos) se incluye en la formulación.

Las formulaciones de la invención pueden incluir opcionalmente otros componentes beneficiosos que incluyen agentes estabilizantes. Por ejemplo, pueden incluirse aminoácidos tales como arginina o prolina que pueden tener propiedades estabilizantes. Así en una realización, las formulaciones de la invención comprenden arginina.

5 Las formulaciones de la invención pueden comprender una sal de magnesio, tal como cloruro de magnesio. El magnesio (como una sal) puede estar incluido normalmente a una concentración de 0,1 a 10 mM, p. ej., 1 a 5 mM tal como aproximadamente 4 mM. Se ha informado de que las sales de magnesio pueden reducir la irritación en el sitio de inyección provocado por el EDTA (véase la patente internacional WO2015/120457).

10 En una realización de la invención las formulaciones están libres de ácidos seleccionados de ácido glutámico, ácido ascórbico, ácido succínico, ácido aspártico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido adípico y ácido acético y están también libres de las correspondientes formas iónicas de estos ácidos.

En una realización de la invención las formulaciones están libres de arginina.

En una realización de la invención las formulaciones están libres de protamina y sales de protamina.

En una realización de la invención las formulaciones están libres de iones de magnesio.

En una realización de la invención las formulaciones están libres de iones de calcio.

15 De manera adecuada, las formulaciones de la invención son suficientemente estables para que la concentración de especies de alto peso molecular permanezca bajo tras un largo almacenamiento. El término "especie de alto peso molecular" como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier componente formado de manera irreversible del contenido de proteína que tiene un peso molecular aparente al menos aproximadamente el doble que el peso molecular del compuesto de insulina parental, como se detecta mediante un método analítico adecuado, tal como
20 cromatografía de exclusión por tamaño. Es decir, las especies de alto peso molecular son agregados multiméricos del compuesto de insulina parental. Los agregados multiméricos pueden comprender las moléculas de proteína parental con conformación considerablemente alterada o pueden ser un montaje de las unidades de proteína parental en la conformación nativa o casi nativa. La determinación de especies de alto peso molecular puede hacerse usando métodos conocidos en la técnica, que incluyen cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis,
25 ultracentrifugación analítica, dispersión de luz, dispersión de luz dinámica, dispersión de luz estática y fraccionamiento del flujo de campo.

Adecuadamente las formulaciones de la invención son suficientemente estables para que permanezcan esencialmente libres de partículas visibles después del almacenamiento a 30 °C durante al menos uno, dos o tres meses. Las partículas visibles se detectan adecuadamente usando la monografía de farmacopea europea 2.9.20. (Particulate
30 Contamination: Visible Particles). Por ejemplo, una formulación está esencialmente libre de partículas visibles si tiene una puntuación visual de 1 o 2, especialmente 1 según la definición dada en la sección de ejemplos.

De manera adecuada, las formulaciones de la invención son suficientemente estables para que la concentración de especies relacionadas permanezca baja tras un largo almacenamiento. El término "especie relacionada" como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier componente del contenido de proteína formado mediante una
35 modificación química del compuesto de insulina parental, particularmente formas desamido o imida cíclica de la insulina. Las especies relacionadas se detectan de forma adecuada mediante RP-HPLC.

En una realización preferida, la formulación de la invención conserva a menos el 95 %, p. ej., al menos el 96 %, p. ej., al menos el 97 %, p. ej., al menos el 98 %, p. ej., al menos el 99 % del compuesto de insulina parental (en peso de la proteína total) después del almacenamiento a 30 °C durante uno, dos o tres meses. El porcentaje de compuesto de
40 insulina (en peso de la proteína total) puede determinarse por cromatografía de exclusión por tamaño o RP-HPLC.

En una realización preferida, la formulación de la invención comprende no más de 4 % (en peso de la proteína total), preferiblemente no más de 2 % de especies de alto peso molecular después de almacenamiento a 30 °C durante uno, dos o tres meses.

En una realización preferida, la formulación de la invención comprende no más de 4 % (en peso de la proteína total), preferiblemente no más de 2 %, preferiblemente no más de 1 % de la forma desamido A-21 del compuesto de insulina después del almacenamiento a 30 °C durante uno, dos o tres meses.

En realizaciones preferidas, una formulación de la presente invención debería mostrar un aumento en las especies de alto peso molecular durante el almacenamiento que sea al menos un 10 % menor, preferiblemente al menos 25 % menor, más preferiblemente al menos 50 % menor, que una formulación que carece del tensioactivo no iónico pero por lo demás idéntica, después del almacenamiento bajo las mismas condiciones (p. ej., 30 °C) y longitud de tiempo
50 (p. ej. uno, dos o tres meses).

En realizaciones preferidas, una formulación de la presente invención debería mostrar un aumento en las especies relacionadas durante el almacenamiento que sea al menos 10 % menor, preferiblemente al menos 25 % menor, más preferiblemente al menos 50 % menor, que una formulación que carece del tensioactivo no iónico pero por lo demás

idéntica, después del almacenamiento bajo las mismas condiciones (p. ej. 30 °C) y longitud de tiempo (p. ej. uno, dos o tres meses).

5 La velocidad de acción de una formulación de la invención puede determinarse en el modelo de farmacocinética/farmacodinámica del cerdo diabético (véanse los ejemplos, Métodos generales). En realizaciones preferidas, una formulación de la presente invención debería mostrar una $T_{m\acute{a}x}$ (es decir el tiempo hasta la concentración máxima de insulina) que sea al menos 10 % más corto, preferiblemente al menos 20 % más corto, más preferiblemente al menos 30 % más corto que una formulación que carece de la combinación de especies que se unen al zinc pero por lo demás idéntica, usando el modelo. En realizaciones preferidas, una formulación de la presente invención podría mostrar un área bajo la curva en el perfil farmacodinámico en el periodo de los primeros 45 minutos después de la inyección que es al menos 10 % mayor, preferiblemente al menos 20 % mayor, más preferiblemente al menos 30 % mayor que una formulación que carece de la combinación de especies que se unen al zinc pero por lo demás idéntica, usando el modelo.

Según aspectos adicionales de la invención, se proporciona una formulación de la invención para el uso en el tratamiento de un sujeto que padece diabetes mellitus.

15 Una dosis típica de la formulación de la invención es 2-30 U, p. ej. 5-15 U. La administración ocurriría de forma adecuada en la ventana entre 15 minutos antes de comer (es decir, antes de comenzar una comida) y 15 minutos después de comer (es decir, después del final de una comida).

20 Un recipiente p. ej., hecho de plásticos o cristal puede contener una dosis o una pluralidad de dosis de la formulación de la invención. El recipiente puede ser, por ejemplo, un cartucho diseñado para ser un objeto sustituible para el uso con un dispositivo de inyección.

Las formulaciones de la invención pueden estar empaquetadas de forma adecuada para la inyección, especialmente inyección subcutánea o intramuscular. Se prefiere la inyección subcutánea. La inyección puede ser mediante una jeringa convencional o más preferiblemente mediante un dispositivo de pluma adaptado para el uso por sujetos diabéticos. Dispositivos de pluma ejemplares incluyen el dispositivo Kwikpen® y el dispositivo Flexpen®.

25 También se describe un dispositivo de inyección, particularmente un dispositivo adaptado para inyección subcutánea o intramuscular, para el uso único o múltiple que comprende un recipiente que contiene una dosis o una pluralidad de dosis de la formulación de la invención junto con una aguja de inyección. En una realización el recipiente es un cartucho sustituible que contiene una pluralidad de dosis. En una realización, la aguja es sustituible, p. ej., después de cada ocasión de uso.

30 También se describe un dispositivo médico que comprende un reservorio que comprende una pluralidad de dosis de la formulación de la invención y una bomba adaptada para operación automática o remota de manera que tras la operación automática o remota una o más dosis de la formulación de la invención se administra al cuerpo, p. ej., subcutáneamente o intramuscularmente. Dichos dispositivos se pueden llevar en el exterior del cuerpo o implantados en el cuerpo.

35 Las formulaciones de la invención pueden prepararse mezclando los ingredientes. Por ejemplo, el compuesto de insulina puede disolverse en una formulación acuosa que comprende los demás componentes. Alternativamente, el compuesto de insulina puede disolverse en un ácido fuerte (normalmente HCl), después de la disolución puede diluirse con una formulación acuosa que comprende los demás componentes, y después ajustar el pH al pH deseado con la adición de un álcali (p. ej., NaOH). Como una variación de este método, se puede realizar una etapa de neutralización de la disolución ácida antes de la etapa de dilución y puede entonces no ser necesario ajustar el pH después de la etapa de dilución (o puede ser necesario solo un pequeño ajuste).

40 Se describe una composición farmacéutica de sólido seco adecuada para la reconstitución con un medio acuoso que comprende (i) un compuesto de insulina seleccionado de insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina, e insulina humana recombinante; (ii) zinc iónico, p. ej., a una concentración de 0,05 % o más, p. ej. 0,5 % o más en peso de zinc en base al peso de compuesto de insulina en la formulación; (iii) citrato; (iv) una especie que se une al zinc seleccionada de especies que tienen un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C a una concentración de entre aproximadamente 0,02 mM y aproximadamente 0,2 mM; y (v) un tensioactivo no iónico que es un glicósido de alquilo seleccionado del grupo que consiste en maltósido de dodecilo, glucósido de dodecilo, glucósido de octilo, maltósido de octilo, glucósido de decilo, maltósido de decilo, glucósido de tridecilo, maltósido de tridecilo, glucósido de tetradecilo, maltósido de tetradecilo, glucósido de hexadecilo, maltósido de hexadecilo, monooctanoato de sacarosa, monodecanoato de sacarosa, monododecanoato de sacarosa, monotridecanoato de sacarosa, monotetradecanoato de sacarosa y monohexadecanoato de sacarosa.

55 Por consiguiente, se puede preparar una formulación de la invención disolviendo dicha composición farmacéutica sólida seca en un medio acuoso p. ej., agua o solución salina. Dicha composición farmacéutica sólida seca puede prepararse deshidratando (p. ej., secando por congelación) una formulación de la invención. También se proporciona un recipiente que contiene una dosis o una pluralidad de dosis de dicha composición farmacéutica sólida seca.

Se espera que las formulaciones de la invención tengan una o más de las siguientes propiedades ventajosas:

- Rápida velocidad de acción, normalmente más rápida que la insulina humana normal, tras la administración a un sujeto;
 - Buena estabilidad física tras el almacenamiento, especialmente según se mide por la cantidad de HMWS o detección visual de partículas;
- 5
- Buenas estabilidad química tras el almacenamiento, especialmente según se mide por la cantidad de productos relacionados, p. ej., productos de desaminación.

Abreviaturas

- EDTA etilendiaminatetraacetato
- EGTA etilenglicoltetraacetato
- 10 HEDTA N-(2-hidroxietil)etilendinitrilotriacetato
- PDTA 1-metil-etilendinitrilotriacetato
- TPHA tetraetilenpentanitriloheptaacetato
- Tren tris(2-aminoetil)amina
- HPLC cromatografía líquida de alto rendimiento
- 15 HMWS especie de alto peso molecular
- RP fase inversa
- SEC cromatografía de exclusión por tamaño

Ejemplos

Métodos generales

- 20 (a) Modelo farmacocinético/farmacodinámico del cerdo diabético: método para determinar la velocidad de acción:

Se usan 10 cerdos miniatura de Yucatán macho diabéticos. Se inyecta a los cerdos de forma subcutánea con una muestra de la formulación de prueba y se saca sangre (1 o 2 ml) en los siguientes puntos temporales (min) con respecto a la inyección: -30 (o -15), 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 210 y 240. Para el perfil farmacodinámico, el suero se analiza para la glucosa (usando un glucómetro disponible comercialmente). Para el perfil farmacocinético, se determina la concentración de insulina en el suero usando un inmunoensayo.

- 25

(b) Evaluación visual

Las partículas visibles se detectan de forma adecuada usando la monografía de farmacopea europea 2.9.20. (Particulate Contamination: Visible Particles). El aparato necesario consiste en una estación de visualización que comprende:

- 30
- Un panel negro mate de tamaño apropiado situado en una posición vertical
 - Un panel blanco sin brillo de tamaño apropiado situado en una posición vertical al lado del panel negro
 - Un portalámparas ajustable equipado con una fuente de luz blanca, sombreada, adecuada, y con un difusor de luz adecuado (un iluminador de visualización que contiene dos tubos fluorescentes de 13 W, cada uno de 525 mm de longitud, es adecuado). La intensidad de la iluminación en el punto de visión se mantiene entre 2000 lux y 3750 lux.
- 35

Cualquier etiqueta adherente se elimina del recipiente y el exterior se lava y se seca. El recipiente se gira o invierte suavemente, asegurando que no se introducen burbujas de aire, y se observa durante aproximadamente 5 s enfrente del panel blanco. El procedimiento se repite enfrente del panel negro. Se registra la presencia de cualquier partícula. Las puntuaciones visuales son clasifican como sigue:

- 40 Puntuación visual 1: >10 partículas muy pequeñas
- Puntuación visual 2: 10-20 partículas muy pequeñas
- Puntuación visual 3: 20-50 partículas, incluyendo partículas más grandes
- Puntuación visual 4: >50 partículas, incluyendo partículas más grandes

Mientras que las partículas en muestras con puntuaciones visuales 3 y 4 son claramente detectables en la evaluación visual casual con luz normal, las muestras con puntuación visual 1 y 2 generalmente aparecen como disoluciones transparentes en la misma evaluación. Las muestras con puntuaciones visuales 1-2 se considera que "Pasan"; las muestras con puntuación visual 3-4 se considera que "Fallan".

5 Ejemplo 1 – formulaciones de ejemplo

Pueden prepararse las siguientes formulaciones de ejemplo:

Ejemplo A:

Insulina aspart	100 U/ml
Fosfato sódico	2 mM
Fenol	15,9 mM
m-cresol	15,9 mM
Zinc iónico (como ZnCl ₂)	19,7 µg/ml (0,3 mM), iguala el 0,55 % (p/p) en base al peso de compuesto de insulina en la formulación
Citrato	22 mM
NaCl	150 mM
EDTA	0,1 mM
Tensioactivo	Maltósido de dodecilo (0,05 mg/ml)
Agua para inyección	qs
NaCl residual	La acidificación y posterior neutralización durante la preparación da por resultado la formación de NaCl 2-4 mM
pH ajustado a 7,4	

Ejemplo B:

Insulina lispro	100 U/ml
Fosfato sódico	2 mM
Fenol	15,9 mM
m-cresol	15,9 mM
Zinc iónico (como ZnCl ₂)	19,7 µg/ml (0,3 mM), iguala el 0,55 % (p/p) en base al peso de compuesto de insulina en la formulación
Citrato	22 mM
Glicerol	174 mM
EDTA	0,1 mM
Tensioactivo	Maltósido de dodecilo (0,05 mg/ml)
Agua para inyección	qs
NaCl residual	La acidificación y posterior neutralización durante la preparación da por resultado la formación de NaCl 2-4 mM
pH ajustado a 7,4	

ES 2 973 374 T3

Ejemplo C:

Insulina aspart	100 U/ml
Fosfato sódico	2 mM
Fenol	15,9 mM
m-cresol	15,9 mM
Zinc iónico (como ZnCl ₂)	19,7 µg/ml (0,3 mM), iguala el 0,55 % (p/p) en base al peso de compuesto de insulina en la formulación
Citrato	22 mM
NaCl	150 mM
EDTA	0,02 mM
Tensioactivo	Maltósido de dodecilo (0,05 mg/ml)
Agua para inyección	qs
NaCl residual	La acidificación y posterior neutralización durante la preparación da por resultado la formación de NaCl 2-4 mM
pH ajustado a 7,4	

Ejemplo D:

Insulina lispro	100 U/ml
Fosfato sódico	2 mM
Fenol	15,9 mM
m-cresol	15,9 mM
Zinc iónico (como ZnCl ₂)	19,7 µg/ml (0,3 mM), iguala el 0,55 % (p/p) en base al peso de compuesto de insulina en la formulación
Citrato	22 mM
Glicerol	174 mM
EDTA	0,02 mM
Tensioactivo	Maltósido de dodecilo (0,05 mg/ml)
Agua para inyección	qs
NaCl residual	La acidificación y posterior neutralización durante la preparación da por resultado la formación de NaCl 2-4 mM
pH ajustado a 7,4	

ES 2 973 374 T3

Ejemplo E:

Insulina aspart	1000 U/ml
Fosfato sódico	2 mM
Fenol	15,9 mM
m-cresol	15,9 mM
Zinc iónico (como ZnCl ₂)	19,7 µg/ml (0,3 mM), iguala el 0,55 % (p/p) en base al peso de compuesto de insulina en la formulación
Citrato	44 mM
Glicerol	174 mM
EDTA	0,1 mM
Tensioactivo	Maltósido de dodecilo (0,05 mg/ml)
Agua para inyección	qs
NaCl residual	La acidificación y posterior neutralización durante la preparación da por resultado la formación de NaCl 2-4 mM
pH ajustado a 7,4	

Ejemplo F:

Insulina lispro	1000 U/ml
Fosfato sódico	2 mM
Fenol	15,9 mM
m-cresol	15,9 mM
Zinc iónico (como ZnCl ₂)	19,7 µg/ml (0,3 mM), iguala el 0,55 % (p/p) en base al peso de compuesto de insulina en la formulación
Citrato	44 mM
Glicerol	174 mM
EDTA	0,1 mM
Tensioactivo	Maltósido de dodecilo (0,05 mg/ml)
Agua para inyección	qs
NaCl residual	La acidificación y posterior neutralización durante la preparación da por resultado la formación de NaCl 2-4 mM
pH ajustado a 7,4	

ES 2 973 374 T3

Ejemplo G:

Insulina aspart	100 U/ml
Fosfato sódico	2 mM
Fenol	15,9 mM
m-cresol	15,9 mM
Zinc iónico (como ZnCl ₂)	19,7 µg/ml (0,3 mM), iguala el 0,55 % (p/p) en base al peso de compuesto de insulina en la formulación
Citrato	22 mM
NaCl	150 mM
EDTA	0,1 mM
Tensioactivo	Maltósido de dodecilo (0,05 mg/ml)
Agua para inyección	qs
NaCl residual	La acidificación y posterior neutralización durante la preparación da por resultado la formación de NaCl 2-4 mM
pH ajustado a 7,8	

Ejemplo H:

Insulina lispro	100 U/ml
Fosfato sódico	2 mM
Fenol	15,9 mM
m-cresol	15,9 mM
Zinc iónico (como ZnCl ₂)	19,7 µg/ml (0,3 mM), iguala el 0,55 % (p/p) en base al peso de compuesto de insulina en la formulación
Citrato	22 mM
Glicerol	174 mM
EDTA	0,1 mM
Tensioactivo	Maltósido de dodecilo (0,05 mg/ml)
Agua para inyección	qs
NaCl residual	La acidificación y posterior neutralización durante la preparación da por resultado la formación de NaCl 2-4 mM
pH ajustado a 7,8	

ES 2 973 374 T3

Ejemplo I:

Insulina aspart	100 U/ml
Fosfato sódico	2 mM
Fenol	15,9 mM
m-cresol	15,9 mM
Zinc iónico (como ZnCl ₂)	19,7 µg/ml (0,3 mM), iguala el 0,55 % (p/p) en base al peso de compuesto de insulina en la formulación
Citrato	22 mM
NaCl	150 mM
EDTA	0,02 mM
Tensioactivo	Maltósido de dodecilo (0,05 mg/ml)
Agua para inyección	qs
NaCl residual	La acidificación y posterior neutralización durante la preparación da por resultado la formación de NaCl 2-4 mM
pH ajustado a 7,8	

Ejemplo J:

Insulina lispro	100 U/ml
Fosfato sódico	2 mM
Fenol	15,9 mM
m-cresol	15,9 mM
Zinc iónico (como ZnCl ₂)	19,7 µg/ml (0,3 mM), iguala el 0,55 % (p/p) en base al peso de compuesto de insulina en la formulación
Citrato	22 mM
Glicerol	174 mM
EDTA	0,02 mM
Tensioactivo	Maltósido de dodecilo (0,05 mg/ml)
Agua para inyección	qs
NaCl residual	La acidificación y posterior neutralización durante la preparación da por resultado la formación de NaCl 2-4 mM
pH ajustado a 7,8	

Ejemplo K:

Insulina aspart	1000 U/ml
Fosfato sódico	2 mM
Fenol	15,9 mM
m-cresol	15,9 mM
Zinc iónico (como ZnCl ₂)	19,7 µg/ml (0,3 mM), iguala el 0,55 % (p/p) en base al peso de compuesto de insulina en la formulación
Citrato	44 mM
Glicerol	174 mM
EDTA	0,1 mM
Tensioactivo	Maltósido de dodecilo (0,05 mg/ml)
Agua para inyección	qs
NaCl residual	La acidificación y posterior neutralización durante la preparación da por resultado la formación de NaCl 2-4 mM
pH ajustado a 7,8	

Ejemplo L:

Insulina lispro	1000 U/ml
Fosfato sódico	2 mM
Fenol	15,9 mM
m-cresol	15,9 mM
Zinc iónico (como ZnCl ₂)	19,7 µg/ml (0,3 mM), iguala el 0,55 % (p/p) en base al peso de compuesto de insulina en la formulación
Citrato	44 mM
Glicerol	174 mM
EDTA	0,1 mM
Tensioactivo	Maltósido de dodecilo (0,05 mg/ml)
Agua para inyección	qs
NaCl residual	La acidificación y posterior neutralización durante la preparación da por resultado la formación de NaCl 2-4 mM
pH ajustado a 7,8	

5 Método para la preparación para las formulaciones anteriores:

Se añade polvo de insulina al agua y se añade HCl hasta que el polvo se disuelve totalmente (el pH tiene que ser <3 para conseguir la disolución total). Se añade ZnCl₂ al nivel necesario. Una vez disuelto, se ajusta el pH a aproximadamente 7 y se ajusta el volumen con agua de manera que la concentración de insulina sea 2x la concentración necesaria. La composición se mezcla entonces 1:1 (v/v) con una mezcla de excipientes adicionales (todos a 2x de la concentración necesaria).

10

Ejemplo 2 – Estabilidad de insulina aspart en presencia de baja concentración de un agente quelante fuerte, con y sin un tensioactivo

El efecto de la baja concentración de EDTA en la estabilidad de insulina aspart se investigó tanto en ausencia como en presencia de un tensioactivo. El efecto se investigó en dos diferentes disoluciones de referencia:

15

Disolución de referencia 1: fosfato sódico (13,2 mM), citrato sódico (9,3 mM), sulfato de magnesio (4 mM), glicerol (173,7 mM), fenol (0,3 mM), m-cresol (29,1 mM), zinc iónico (19,7 µg/ml, como ZnCl₂), pH 7,4

Disolución de referencia 2: fosfato sódico (2 mM), citrato sódico (22 mM), cloruro sódico (150 mM), fenol (15,9 mM),

m-cresol (15,9 mM), zinc iónico (19,7 µg/ml, como ZnCl₂), pH 7,4

La composición de la disolución de referencia 1 es idéntica a la mostrada en la solicitud WO2015/120457 (formulación BIOD-288 en la tabla 8), excepto la concentración de EDTA.

Las formulaciones probadas se muestran en la tabla 1.

5 Tabla 1: componentes adicionales probados en formulaciones de insulina aspart

	Disolución de referencia	EDTA (mM)	Dodecil-β-D-maltósido (mg/ml)
Formulación 1	1	0	0
Formulación 2	1	0,02	0
Formulación 3	1	0,05	0
Formulación 4	1	0,1	0
Formulación 5	1	0,2	0
Formulación 6 ¹	1	0,33	0
Formulación 7	2	0	0
Formulación 8	2	0,02	0
Formulación 9	2	0,05	0
Formulación 10	2	0,1	0
Formulación 11	2	0,2	0
Formulación 12	2	0,33	0
Formulación 13	2	0	0,05
Formulación 14 ²	2	0,02	0,05
Formulación 15	2	0,05	0,05
Formulación 16 ³	2	0,1	0,05
Formulación 17	2	0,2	0,05
Formulación 18	2	0,33	0,05

¹ corresponde a la formulación BIOD-288 en la tabla 8 en la patente internacional WO2015/120457

² equivalente a la formulación C en el ejemplo 1

³ equivalente a la formulación A en el ejemplo 1

10 La estabilidad de la insulina aspart se probó mediante evaluación visual. Los resultados se muestran en la tabla 2. Se observó formación de partículas tanto en la disolución de referencia en ausencia de EDTA como con dodecil-β-D-maltósido, alcanzando el límite "Fallo" (puntuación visual 4) en 7 días. La presencia de EDTA 0,02 mM dio por resultado una diferencia no medible. La presencia de mayores concentraciones de EDTA (0,05 – 0,33 mM) dio por resultado la
 15 aceleración de la formación de partículas, siendo el efecto proporcional a la concentración de EDTA. Las formulaciones que contienen EDTA alcanzaron por consiguiente el límite "Fallo" en puntos temporales más tempranos. La presencia de dodecil-β-D-maltósido retrasó significativamente la formación de partículas. Las formulaciones que contienen EDTA hasta 0,2 mM en presencia de dodecil-β-D-maltósido permanecieron en el nivel "Pasa" hasta el punto temporal del día 7 y solo la formulación que contiene EDTA 0,33 mM alcanzó el límite "Fallo".

Tabla 2: puntuaciones visuales de las formulaciones de insulina aspart después del almacenamiento a 30 °C. Puntuación visual 1: <10 partículas muy pequeñas; puntuación visual 2: 10-20 partículas muy pequeñas; puntuación visual 3: 20-50 partículas, incluyendo partículas más grandes; puntuación visual 4: >50 partículas, incluyendo partículas más grandes.

	0 semanas	1 día	4 días	7 días	14 días	28 días
Formulación 1	1	1	1	3	4	4
Formulación 2	1	1	1	3	4	4
Formulación 3	1	1	3	3	4	4
Formulación 4	1	1	3	3	4	4
Formulación 5	1	1	4	4	4	4
Formulación 6	1	1	4	4	4	4
Formulación 7	1	1	1	3	3	4
Formulación 8	1	1	1	3	4	4
Formulación 9	1	1	3	3	4	4
Formulación 10	1	2	3	4	4	4
Formulación 11	1	2	4	4	4	4
Formulación 12	1	2	4	4	4	4
Formulación 13	1	1	1	1	1	1
Formulación 14	1	1	1	1	1	1
Formulación 15	1	1	1	1	1	1
Formulación 16	1	1	1	1	1	2
Formulación 17	1	1	1	2	3	4
Formulación 18	1	1	2	3	4	4

5

A lo largo de la memoria y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto necesite otra cosa, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero, etapa, grupo de números enteros o grupo de etapas, indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero, etapa, grupo de números enteros o grupos de etapas.

10 El término "y/o" como se usa en una frase tal como "A y/o B" en la presente memoria pretende incluir tanto A como B; A o B; A (solo); y B (solo). Asimismo, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A, B y/o C" pretende abarcar cada una de las siguientes realizaciones: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo) y C (solo).

Listado de secuencias

- 15 SEQ ID NO: 1: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
- SEQ ID NO: 2: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
- SEQ ID NO: 3: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT
- SEQ ID NO: 4: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT
- SEQ ID NO: 5: FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPET

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica líquida acuosa que comprende:
 - (i) un compuesto de insulina seleccionado de insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina e insulina humana recombinante;
 - 5 (ii) zinc iónico;
 - (iii) una especie que se une al zinc a una concentración de 1 mM o más seleccionada de especies que tienen un logK con respecto a la unión al ion de zinc en el intervalo de 4,5-10 a 25 °C, en donde dicha especie que se une a zinc es citrato;
 - 10 (iv) una especie que se une a zinc seleccionada de especies que tienen un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C a una concentración de entre aproximadamente 0,02 mM y aproximadamente 0,2 mM; y
 - 15 (v) un tensioactivo no iónico que es un glicósido de alquilo seleccionado del grupo que consiste en maltósido de dodecilo, glucósido de dodecilo, glucósido de octilo, maltósido de octilo, glucósido de decilo, maltósido de decilo, glucósido de tridecilo, maltósido de tridecilo, glucósido de tetradecilo, maltósido de tetradecilo, glucósido de hexadecilo, maltósido de hexadecilo, monoctanoato de sacarosa, monodecanoato de sacarosa, monododecanoato de sacarosa, monotridecanoato de sacarosa, monotetradecanoato de sacarosa y monohexadecanoato de sacarosa.
2. La formulación según la reivindicación 1, en donde el compuesto de insulina está presente a una concentración de 10-1000 U/ml.
- 20 3. La formulación según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el zinc iónico está presente a una concentración de más de 0,05 % en peso de zinc en base al peso de compuesto de insulina en la formulación;

Preferiblemente en donde el zinc iónico está presente a una concentración de más de 0,5 % en peso de zinc en base al peso de compuesto de insulina en la formulación;

Lo más preferiblemente en donde el zinc iónico está presente a una concentración de 0,5-1 % en peso de zinc en base al peso de compuesto de insulina en la formulación.
- 25 4. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el citrato está presente a una concentración de 1-50 mM.
5. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la relación molar de zinc iónico a citrato es 1:3 a 1:500.
- 30 6. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el glicósido de alquilo es maltósido de dodecilo.
7. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tensioactivo no iónico que es un glicósido de alquilo está presente a una concentración de 1-1000 µg/ml.
- 35 8. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C se selecciona de etilendiaminatetraacetato (EDTA), etilenglicoltetraacetato (EGTA), tetraetilenpentamina, N-(2-hidroxi)etilendinitrilotriacetato (HEDTA), 1-metil-etilendinitrilotriacetato (PDTA), 1-etil-etilendinitrilotriacetato, 1-propil-etilendinitrilotriacetato, 1-carboxietilendinitrilotriacetato, trietilentetranitrihexaacetato, tetraetilenpentanitriheptaacetato (TPHA) y tris(2-aminoetil)amina (Tren).
- 40 9. La formulación según la reivindicación 8, en donde la especie que se une al zinc que tiene un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C es EDTA.
10. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además un agente modificador de la tonicidad.
- 45 11. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además un conservante; preferiblemente en donde el conservante se selecciona del grupo que consiste en fenol, m-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, propilparabeno, metilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio.
12. Una formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para el uso en el tratamiento de un sujeto que padece diabetes mellitus.
- 50 13. Un dispositivo de inyección para uso único o múltiple que comprende un recipiente que contiene una dosis o una pluralidad de dosis de la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 junto con una aguja de inyección.

14. Un dispositivo médico que comprende un reservorio que comprende una pluralidad de dosis de la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y una bomba adaptada para la operación automática o remota de manera que tras la operación automática o remota una o más dosis de la formulación se administra al cuerpo.
- 5 15. El uso de un tensioactivo no iónico que es un glicósido de alquilo para mejorar la estabilidad de almacenamiento de una formulación farmacéutica líquida acuosa que comprende:
- (i) un compuesto de insulina seleccionado de insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina e insulina humana recombinante;
- (ii) zinc iónico;
- 10 (iii) una especie que se une al zinc a una concentración de 1 mM o más seleccionada de especies que tienen un logK con respecto a la unión al ion de zinc en el intervalo de 4,5-10 a 25 °C, en donde dicha especie que se une al zinc es citrato; y
- (iv) una especie que se une al zinc seleccionada de especies que tienen un logK con respecto a la unión al ion de zinc de más de 12,3 a 25 °C a una concentración de entre aproximadamente 0,02 mM y aproximadamente 0,2 mM;
- 15 En donde el glicósido de alquilo se selecciona del grupo que consiste en maltósido de dodecilo, glucósido de dodecilo, glucósido de octilo, maltósido de octilo, glucósido de decilo, maltósido de decilo, glucósido de tridecilo, maltósido de tridecilo, glucósido de tetradecilo, maltósido de tetradecilo, glucósido de hexadecilo, maltósido de hexadecilo, monoctanoato de sacarosa, monodecanoato de sacarosa, monododecanoato de sacarosa, monotridecanoato de sacarosa, monotetradecanoato de sacarosa y monohexadecanoato de sacarosa.