



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 316 161**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/28 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **98902423 .7**

(96) Fecha de presentación : **09.01.1998**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1044015**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2000**

(54) Título: **Formulaciones para péptidos agonistas de amilina con insulina.**

(73) Titular/es: **AMYLIN PHARMACEUTICALS, Inc.**
9360 Towne Centre Drive
San Diego, California 92121, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

(72) Inventor/es: **L'Italian, James;**
Musunuri, Shankar y
Ruby, Cale

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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 para péptidos agonistas de amilina con insulina.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a una mezcla obtenible mezclando insulina y una formulación farmacéutica líquida, en donde la formulación farmacéutica comprende del 0,01% al 0,5% (peso/volumen) de un agonista de amilina, en donde dicho agonista de amilina es un péptido análogo de la amilina humana, mezclado con un agente de tonicidad hidrato de carbono o alcohol polihídrico, estando suministrado dicho agente de tonicidad en una cantidad de entre el 1,0% y el 10% (peso/volumen), y del 0,02% al 0,5% (peso/volumen) de un tampón acetato, fosfato, citrato o glutamato, teniendo dicha formulación un pH de 3,8 a 4,2, y un conservante seleccionado del grupo que consiste en m-cresol, alcohol bencílico, metil, etil, propil y butil parabenos, y fenol, estando suministrado dicho conservante a una concentración del 0,1% al 0,6% (peso/volumen) para m-cresol, del 0,1% al 1,0% (peso/volumen) para alcohol bencílico, del 0,05% al 0,25% (peso/volumen) para metil y del 0,005% al 0,03% (peso/volumen) para etil o propil o butil parabenos, y del 0,1% al 0,8% para fenol.

Antecedentes de la invención

La deposición de amiloide en los islotes pancreáticas es una característica común en pacientes diabéticos de tipo II humanos. La principal proteína que forma estas partículas amiloides, denominada amilina, tiene propensión a formar estructuras amiloides fibrilares. *National Academy of Sciences USA* 8628, 1987. La amilina es una proteína de 37 aminoácidos que, en su forma totalmente activa, está carboxi-amidada y tiene un puente disulfuro entre los residuos de cisteína encontrados en las posiciones 2 y 7. La amilina tiene un papel en el control de las concentraciones sistémicas de glucosa, y se ha propuesto como un agente terapéutico útil. Ver, por ejemplo, Leighton y Cooper, 15 *TIBS* 295, 1990. La amilina humana se describe y reivindica en la patente de EE.UU. No. 5367052 titulada "Amylin Peptides," y la patente de EE.UU. No. 5124314, titulada "Pharmaceutical Compositions Containing Amylin." La amilina se ha revisado en la bibliografía, por ejemplo, en Gaeta, L.S.L. y Rink, T.J., 3 *Med. Chem. Res.* 483-490, 1994, Pittner, R. A. *et al.*, 55S *J. Cell. Biochem.* 19-28, 1994, y Rink, T.J. *et al.*, 14 *TIPS* 113-118, 1993.

Se han buscado oportunidades terapéuticas para personas con diabetes que usan insulina y otras que son deficientes en amilina o para las que la terapia de amilina podría ser beneficiosa, y el bloqueo de hormonas para otras personas, por ejemplo, los obesos y diabéticos de tipo II y aquellos con resistencia a insulina que podrían tener la amilina en plasma aumentada o actividad amilina indeseada. El uso de agonistas de amilina, incluyendo la amilina misma, para el tratamiento de diabetes se describe y reivindica en la patente de EE.UU. No. 5175145. El uso de antagonistas de amilina para el tratamiento de diabetes mellitus de tipo II, obesidad e hipertensión esencial, y resistencia a insulina, se describen y reivindican en las patentes de EE.UU. Nos. 5266561, 5280014, 5281581 y 5364841.

La forma más grave de la enfermedad es la diabetes de tipo I (de comienzo juvenil). Se ha estimado en 1 millón los diabéticos de tipo I en los EE.UU. que necesitan diariamente inyecciones de insulina para sobrevivir. Su calidad de vida está con frecuencia marcadamente afectada por los rigores de sus desequilibrios metabólicos diarios, en particular ataques hipoglucémicos (glucosa en sangre peligrosamente baja) y por el inicio de complicaciones serias a largo plazo, incluyendo ceguera, insuficiencia renal, impotencia, úlceras, amputaciones y atherosclerosis (Ensayo de Complicaciones y Control de la Diabetes del NIH).

La diabetes de tipo II (de inicio adulto) afecta a más de 10 millones de americanos, que también están sometidos a las mismas complicaciones. Se piensa que la tolerancia alterada a la glucosa, un factor de riesgo para la diabetes de tipo II y enfermedad cardiovascular, afecta a otras 20 millones de personas en los EE.UU. y no es tratable mediante ninguna pauta conocida. También hay un aumento alarmante en la incidencia de diabéticos de tipo II en grupos de población alrededor del mundo, cuyos niveles de vida aumentan por medio del desarrollo económico o la migración. Las sulfonilureas son las principales medicaciones orales antihiperglucémicas diabéticas vendidas en los EE.UU. Descubiertas en la década de 1940, estos compuestos no abordan las causas subyacentes de la diabetes de tipo II y, en muchos casos, no son eficaces o pierden su eficacia después de unos pocos años de tratamiento. Los diabéticos de tipo II no carecen de insulina, sino que son resistentes a insulina, de modo que la insulina no actúa adecuadamente y las respuestas secretoras de insulina están trastornadas.

Después de una comida, el páncreas secreta insulina en respuesta al aumento en glucosa. La insulina estimula la absorción de glucosa en el músculo y la grasa, y envía señales al hígado para reducir la producción de glucosa; esto produce el retorno de la glucosa en sangre a niveles normales. En el músculo, se almacenan grandes cantidades de glucosa como glucógeno. Parte del glucógeno se rompe a lactato, que circula al hígado y puede ser convertido de nuevo a glucosa y almacenarse como glucógeno. Entre comidas el hígado rompe estos almacenes de glucógeno para suministrar glucosa al cerebro y otros tejidos. Este ciclo en el que el glucógeno se transfiere de forma eficaz del músculo al hígado se conoce como el ciclo de Cori. El estímulo para este flujo del músculo al hígado en condiciones de reposo permanece sin identificar; resultados recientes indican que la amilina proporciona un estímulo principal a esta vía.

Se ha demostrado que la amilina tiene efectos metabólicos directos tanto en músculo esquelético como en el páncreas. En el músculo esquelético, la amilina actúa como un antagonista no competitivo de la insulina, reduciendo

ES 2 316 161 T3

la incorporación de glucosa a glucógeno estimulada por insulina. Estudios *in vitro* indican que la amilina reduce la actividad glucógeno sintasa y favorece la formación de una forma activa de la glucógeno fosforilasa, la enzima que convierte el glucógeno en glucosa 6-fosfato. Las acciones de la amilina en el músculo esquelético fomentan la rotura del glucógeno, estimulando de esta manera la formación de lactato y aumentando el recambio del ciclo de Cori. La amilina se cosecreta con la insulina de las células beta del páncreas y se ha demostrado que suprime la secreción de insulina. Parece que proporciona retro-regulación de la célula beta, para modular la actividad secretora de insulina.

Se cree que la amilina tiene un papel en la regulación de la absorción de glucosa de los alimentos ingeridos a la sangre, y que la terapia de amilina o de agonistas de amilina en diabéticos, particularmente en diabéticos que usan insulina, tal como diabéticos de tipo I y diabéticos de tipo II de fase tardía, suavizará los aumentos excesivos de glucosa que estos pacientes típicamente experimentan tras las comidas. La deficiencia en una hormona importante tal como la amilina que se ha descrito que tiene efectos en el metabolismo de hidratos de carbono, grasa y hueso, también puede trastornar otros mecanismos fisiológicos importantes. La coadministración de amilina, o un agonista de amilina que ejerce los efectos fisiológicos de amilina, mejorará significativamente la terapia existente de insulina restaurando el equilibrio metabólico apropiado.

Muchos factores afectan la estabilidad de un producto farmacéutico, incluyendo la reactividad química de el/los principio(s) activo(s), la potencial interacción entre ingredientes activos e inactivos, el proceso de producción, la forma posológica, el sistema de cierre del envase, y las condiciones ambientales encontradas durante el transporte, almacenamiento, manejo y extensión de tiempo entre la producción y el uso. La estabilidad del producto farmacéutico se determina mediante la estabilidad química así como la estabilidad física de la formulación. Los factores físicos incluyendo calor y luz pueden iniciar o acelerar reacciones químicas.

La estabilidad física óptima de una formulación es muy importante al menos por tres razones principales. Primero, un producto farmacéutico debe aparecer fresco, elegante y profesional, cuando se administra a un paciente. Cualquier cambio en el aspecto físico tal como cambios de color u opacidad pueden producir que un paciente o consumidor pierda la confianza en el producto. Segundo, debido a que algunos productos se preparan en envases multidosis, se debe asegurar la uniformidad del contenido del principio activo en las dosis a lo largo del tiempo. Una solución turbia o una emulsión rota pueden producir un patrón de dosis no uniforme. Tercero, el principio activo debe estar disponible al paciente a lo largo de la vida útil esperada de la preparación. Una rotura del producto a formas inactivas o indeseables de otra manera puede producir una no disponibilidad del medicamento para el paciente.

La estabilidad de un producto farmacéutico, por lo tanto, se puede definir como la capacidad de una formulación particular para permanecer dentro de sus especificaciones físicas, químicas, microbiológicas, terapéuticas y toxicológicas. Una solución estable retiene su transparencia, color y olor originales a lo largo de su vida útil. La retención de la transparencia de una solución es un asunto principal en el mantenimiento de la estabilidad física. Las soluciones deben permanecer transparentes en un intervalo relativamente amplio de temperaturas tal como de alrededor de 4°C hasta alrededor de 37°C. En la zona inferior del intervalo un ingrediente puede precipitar debido a una solubilidad baja a esa temperatura, mientras que a temperaturas mayores se puede destruir la homogeneidad mediante extraíbles de los envases de vidrio o cierres de plástico. De esta manera, las soluciones de ingredientes farmacéuticos activos deben ser capaces de aguantar condiciones cíclicas de temperatura. De forma similar, una formulación debe mantener su color a lo largo de este intervalo de temperatura, y su olor se debe mantener establemente.

Los péptidos pequeños son típicamente inestables y son susceptibles de degradación en soluciones acuosas. A este respecto, una vez que un agonista de la amilina o la amilina humana tiene menos de aproximadamente el 90% de su potencia marcada, no se considera más que sea adecuado para la administración a un paciente. Se han usado varios tipos de moléculas tal como azúcares, agentes tensoactivos, aminoácidos y ácidos grasos, usados individualmente o en combinación, en intentos de estabilizar productos de proteínas y péptidos contra la degradación. Ver Wang y Hansson, *J. Parenteral Science and Technology Supplement*, 1988, Technical Report No. 10 (que describe formulaciones parenterales de proteínas y péptidos); Manning *et al.*, 6 *Pharmaceutical Research*, 1989. También son conocidos en la técnica ejemplos de excipientes tal como tampones, conservantes, agentes isotónicos, y agentes tensoactivos. Ver 21 C.F.R. §180.22 y siguientes (que definen aditivos reconocidos de alimentos); Wang y Kowal, 34 *J. Parenteral Drug Association* 452, 1980 (que describe varios excipientes); A.R. Gennaro *et al.*, 17th Remington's "Pharmaceutical Sciences," 1985; Avis *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Vol. 1, 1992, todos ellos, incluyen las definiciones de varios excipientes útiles.

Redalieu *et al.*, *Diabetologia*, Vol. 40, no. 1, 1997, p.356, se refiere a efectos farmacocinéticas de mezclar pramlintida con insulina.

Se entiende que el desarrollo de una formulación farmacéutica adecuada para administrar a un sujeto es complejo. Existe una necesidad en la técnica para formulaciones farmacéuticas de péptidos agonistas de amilina, o amilinas, diseñadas para suministrar dosis individuales o múltiples que tienen estabilidad sustancial cuando están refrigeradas y a temperatura ambiente. Además, existe una necesidad en la técnica para una formulación farmacéutica líquida empaquetada con un sistema de envase/cerrado que también minimice la degradación física y química de tales péptidos. Por último, existe una necesidad de una formulación farmacéutica líquida para péptidos agonistas de amilina, o amilinas, que se pueda mezclar con insulina antes de la administración. La invención descrita y reivindicada aquí satisface estas necesidades.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una mezcla obtenible mezclando insulina y una formulación farmacéutica líquida, en donde la formulación farmacéutica comprende del 0,01% al 0,5% (peso/volumen) de un agonista de amilina, en 5 donde dicho agonista de amilina es un análogo peptídico de la amilina humana, mezclado con un agente de tonicidad hidrato de carbono o alcohol polihídrico, estando suministrado dicho agente de tonicidad en una cantidad de entre el 1,0% y el 10% (peso/volumen), y del 0,02% al 0,5% (peso/volumen) de un tampón acetato, fosfato, citrato o glutamato, teniendo dicha formulación un pH de 3,8 a 4,2, y un conservante seleccionado del grupo que consiste en m-cresol, alcohol bencílico, metil, etil, propil y butíl parabenos, y fenol, estando suministrado dicho conservante a 10 una concentración del 0,1% al 0,6% (peso/volumen) para m-cresol, del 0,1% al 1,0% (peso/volumen) para alcohol bencílico, del 0,05% al 0,25% (peso/volumen) para metil y del 0,005% al 0,03% (peso/volumen) para etil o propil o butíl parabenos, y del 0,1% al 0,8% para fenol.

15 La presente invención se refiere además al uso de una mezcla respectiva para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de diabetes.

De forma importante, no se requiere un estabilizador en esta formulación de un producto agonista de amilina. Se usa una cantidad suficiente de agua para inyección para obtener la concentración de solución deseada. También puede estar presente cloruro de sodio, así como otros excipientes, si se desea. Tales excipientes, sin embargo, deben mantener 20 la estabilidad global del agonista de amilina o péptido de amilina. Las formulaciones líquidas de la invención deben ser sustancialmente isotónicas. Una solución isotónica se puede definir como una solución que tiene una concentración de electrolitos, no electrolitos, o una combinación de los dos que ejercerá una presión osmótica equivalente a aquella en la que se introduce, aquí, por ejemplo en el caso de inyección parenteral de la formulación, un tejido de mamífero. Mediante "sustancialmente isotónica" se quiere decir dentro del $\pm 20\%$ de isotonicidad, preferiblemente dentro del 25 $\pm 10\%$ de isotonicidad. El producto formulado se incluye en un envase, típicamente, por ejemplo, un vial, cartucho, jeringuilla precargada o pluma desechable.

Se ha encontrado que estas nuevas formas posológicas parenterales mantienen de forma sorprendente la estabilidad del péptido hasta cuatro años a temperaturas refrigeradas, por ejemplo, aproximadamente 5°C, y durante más de 30 días a temperatura ambiente, por ejemplo, aproximadamente a 30°C.

30 Los inventores han descubierto además que esta formulación farmacéutica se puede mezclar además con producto de insulina en una jeringuilla y mantiene la estabilidad a corto plazo. Esta compatibilidad de mezcla a corto plazo es extremadamente ventajosa. Esto permite la administración de una inyección única de un agonista de amilina, o amilina, junto con insulina a un paciente.

Las formulaciones de agonistas de amilina, o amilinas, están estabilizadas con respecto a agregación, adsorción y degradación, y de esta manera aumenta la conservación de sus actividades biológicas, aunque las formulaciones de un agonista de amilina o una amilina que tienen propiedades fisicoquímicas similares a las de la amilina humana, que es 40 poco soluble y muy estable deben incluir también un estabilizador, que comprende del 1,0% al 10% (peso/volumen) de un hidrato de carbono o un alcohol polihídrico, y un agente tensoactivo, preferiblemente del 0,1 a alrededor del 1,0% (peso/volumen) de polisorbato 80 u otro detergente no iónico, se deben liofilizar en seguida tras la formulación, y se deben usar en seguida tras las reconstitución y son por lo tanto menos preferidas.

45 Las formulaciones que incluyen un agonista de amilina se pueden mezclar con un compuesto estabilizador que reduce la pérdida de potencia biológica del péptido en, por ejemplo, un ensayo de unión a un receptor específico de amilina, reduce la pérdida de actividad biológica medida en, por ejemplo, el bioensayo *in vitro* en el músculo sóleo, y la pérdida general de material mediante, por ejemplo, un ensayo de HPLC, comparadas con formulaciones que consisten en la amilina sola.

50 En un aspecto relacionado, la invención presenta un método para formular agonistas de amilina que mantienen la compatibilidad de mezcla a corto plazo (por ejemplo, 24 horas) con insulina.

Otras características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción de las formas de 55 realización preferidas de la misma, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra las velocidades de degradación de formulaciones de pramlintida a varios pH.

60 La figura 2 muestra la estabilidad de la formulación de pramlintida a lo largo del tiempo a 30°C.

La figura 3 muestra la estabilidad de la formulación de pramlintida a lo largo del tiempo a 40°C.

65 La figura 4 muestra la estabilidad de la formulación de pramlintida a lo largo del tiempo a 50°C.

La figura 5 muestra una gráfica de Arrenhius de los valores de K_{obs} de las figuras 2-4.

ES 2 316 161 T3

La figura 6 muestra las concentraciones en plasma frente al tiempo para la insulina tras la mezcla del péptido agonista de amilina pramlintida formulado según la tabla A.

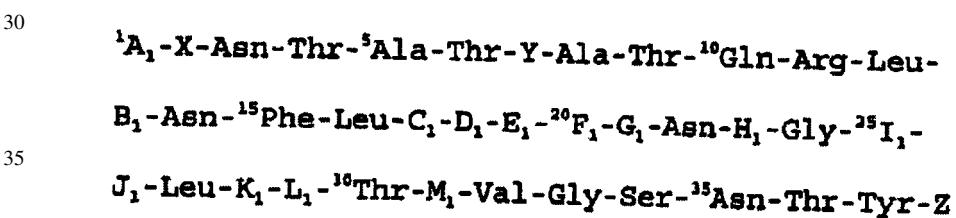
Descripción detallada

Las drogas peptídicas sufren degradación física y química en solución y pierden su actividad biológica. La formulación del agonista de amilina minimiza la degradación química de la amilina, por ejemplo, la pramlintida, a través de diferentes vías, por ejemplo, desamidación e hidrólisis del enlace peptídico, y mantiene el péptido biológicamente activo hasta cuatro años cuando se almacena a aproximadamente 5°C. Esta forma posológica es bien tolerada por los pacientes. El sistema de envase/cierre usado para almacenar esta formulación también minimiza la pérdida física del producto de la droga por medio de la adsorción a la superficie del envase o adsorción al cierre de goma.

Las personas con diabetes de tipo I deben ser tratadas con insulina exógena. Generalmente, las personas que requieren inicialmente insulina tienden a ser menores de 30 años de edad en el momento del diagnóstico, delgadas, propensas a desarrollar cetoacidosis, y marcadamente hiperglucémicas incluso en estado de ayuno. La insulina también está indicada para diabéticos de tipo II que no responden a la terapia de dieta y ejercicio sola o en combinación con drogas hipoglucémicas orales. La terapia de insulina también es necesaria en algunos pacientes diabéticos de tipo II que están sometidos a tensiones tales como infecciones, embarazo, o cirugía. En los diabéticos de tipo II, se necesitan ocasionalmente dosis de 10-20 unidades de insulinas de acción intermedia para tener la hiperglucemia bajo control.

Cualquier componente macromolecular funcional de un paciente puede servir operacionalmente como receptor de fármaco. Un grupo particularmente importante de receptores de fármacos son proteínas que normalmente sirven como receptores para ligandos reguladores endógenos (por ejemplo, hormonas, neurotransmisores). Muchos fármacos actúan en tales receptores fisiológicos. Aquellos que mimetizan los efectos del compuesto regulador endógeno se denominan agonistas.

“Agonista de amilina” es un análogo peptídico de la amilina humana útil como agonista de amilina, incluyendo pero no limitado a aquellos agonistas de amilina que se representan mediante la fórmula



40 en donde A₁ es hidrógeno Lys, Ser, Ala, des- α -amino Lys, o Lys acetilada; B₁ es Ala, Ser o Thr; C₁ es Val, Leu o Ile; D₁ es His o Arg; E₁ es Ser o Thr; F₁ es Ser, Thr, Gln o Asn; G₁ es Asn, Gln o His; H₁ es Phe, Leu o Tyr; I₁ es Ala o Pro; J₁ es Ile, Val, Ala o Leu; K₁ es Ser, Pro, Leu, Ile o Thr; L₁ es Ser, Pro o Thr; M₁ es Asn, Asp o Gln; X e Y son residuos independientemente seleccionados que tienen cadenas laterales que están químicamente unidas entre sí para formar un enlace intramolecular; y Z es hidroxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquiloxy, ariloxi o aralquiloxi; siempre que (a) cuando A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es His, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Phe, I₁ es Ala, J₁ es Ile, K₁ es Ser, L₁ es Ser, y M₁ es Asn; (b) cuando A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Ile, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Ala, J₁ es Ile, K₁ es Ser, L₁ es Pro, y M₁ es Asn; (c) cuando A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Thr, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Ala, J₁ es Ile, K₁ es Ser, L₁ es Pro, y M₁ es Asn; (d) cuando A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Pro, J₁ es Val, K₁ es Pro, L₁ es Pro, y M₁ es Asn; (e) cuando A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es His, E₁ es Ser, F₁ es Asn, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Pro, J₁ es Val, K₁ es Ser, L₁ es Pro y M₁ es Asn; o (f) cuando A₁ es Lys, B₁ es Thr, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es His, H₁ es Leu, I₁ es Ala, J₁ es Leu, K₁ es Leu, L₁ es Pro y M₁ es Asp; entonces uno o más de cualquiera de A₁ a M₁ no es un L-aminoácido y Z no es amino, advirtiéndose además que los péptidos sustituidos con prolina única en I₁, K₁, y L₁ no son preferidos.

55 Las cadenas laterales adecuadas para X e Y incluyen grupos derivados de sulfhidrilos de alquilo que pueden formar puentes disulfuro; ácidos de alquilo y alquilaminas que pueden formar lactamas cíclicas; aldehídos de alquilo o haluros de alquilo y alquilaminas que se pueden condensar y reducir para formar un puente alquil-amina; o cadenas laterales que pueden conectarse para formar un enlace alquilo, alquenilo, alquinilo, éter o tioéster. Las cadenas de alquilo preferidas incluyen grupos alquilo inferiores que tienen desde alrededor de 1 hasta alrededor de 6 átomos de carbono.

60 Como se usa aquí, los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que expresamente se indique lo contrario: El término “alquilo” se refiere tanto a grupos alquilo de cadena lineal como ramificada. El término “alquilo inferior” se refiere tanto a grupos alquilo de cadena lineal como ramificada que tienen un total de 1 a 6 átomos de carbono e incluye grupos alquilo primarios, secundarios y terciarios. Los alquilos inferiores típicos incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, n-hexilo, y similares. El término “arilo” se refiere a grupos aromáticos carbocíclicos de 6 a 14 átomos de carbono tales como fenilo y naftilo, así como

ES 2 316 161 T3

a grupos aromáticos heterocíclicos que contienen de 1 a 3 heteroátomos (nitrógeno, oxígeno, azufre, etc.) tales como piridilo, triazolopirazina, pirimidina y similares. El término “aralquilo” se refiere a un grupo “arilo” de 6 a 10 átomos de carbono directamente unido a un grupo “alquilo” de 1 a 4 átomos de carbono e incluye por ejemplo, bencilo, p-clorobencilo, p-metilbencilo, y 2-feniletilo. El término “cicloalquilo” se refiere a grupos alquilo cíclicos de 5 a 8 átomos de carbono.

También están incluidos derivados biológicamente activos de los análogos agonistas de la fórmula anterior en los que la estereoquímica de los aminoácidos individuales se puede invertir de (L)/S a (D)/R en uno o más sitios específicos. También están incluidos los análogos agonistas modificados mediante glicosilación de residuos de Asn, Ser y/o Thr.

Se incluyen análogos agonistas de amilina biológicamente activos que contienen menos carácter peptídico. Tales péptido miméticos pueden incluir, por ejemplo, una o más de las siguientes sustituciones para enlaces amida -CO-NH-: depsipeptidos (-CO-O-), iminometilenos (-CH₂-NH-), trans-alquenos (-CH=CH-), -enaminonitrilos (-C(=CH-CN)-NH-), tioamidas (-CS-NH-), tiometilenos (-S-CH₂- o -CH₂-S-), metilenos (CH₂-CH₂-) y retro-amidas (NH-CO-).

Los compuestos agonistas de amilina forman sales con varios ácidos y bases inorgánicos y orgánicos. Tales sales incluyen sales preparadas con ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo HCl, HBr, H₂SO₄, H₃PO₄, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico, ácido metanosulfónico, ácido toluensulfónico, ácido maleico, ácido fumárico y ácido camforsulfónico. Las sales preparadas con bases incluyen, por ejemplo, sales de amonio, sales de metales alcalinos (tal como sales de sodio y potasio) y sales de metales alcalinotérreos (tal como sales de calcio y magnesio). Las sales de acetato, clorhidrato y trifluoroacetato son preferidas.

Las sales se pueden formar por medios convencionales, como haciendo reaccionar las formas ácido o base libre del producto con uno o más equivalentes de la base o ácido apropiado en un solvente o medio en el que la sal es insoluble, o en un solvente tal como agua que se elimina después al vacío o mediante liofilización o intercambiando los iones de una sal existente por otro ión en una resina de intercambio iónico adecuada.

Los compuestos agonistas de amilina incluyen varios estereoisómeros. En los compuestos preferidos de esta invención, los centros quirales del esqueleto del péptido son todos S.

Los agonistas de amilina pueden ser preparados por los expertos en la materia, como se describe en “Amylin Agonist Peptides and Uses Therefor,” patente de los EE.UU. No. 5686411.

Mediante “amilina humana” se quiere decir la amilina de 37 aminoácidos mostrada en la patente de EE.UU. No. 5357052.

La nomenclatura de los compuestos de la presente formulación se puede indicar tanto el péptido en el que se basa la secuencia con las modificaciones hechas a cualquier secuencia básica de péptidos de amilina, tal como amilina humana. Un aminoácido precedido por un número superíndice indica que el aminoácido nombrado remplaza al aminoácido normalmente presente en la posición de aminoácido del superíndice en la secuencia básica de aminoácidos. Por ejemplo, “¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina” se refiere a un péptido basado en la secuencia de “h-amilina” o “amilina humana” que tiene las siguientes sustituciones: Arg remplaza a His en el residuo 18, Pro remplaza a Ala en el residuo 25 y Pro remplaza a Ser en el residuo 28. El término “des-¹Lys-h-amilina” se refiere a un péptido basado en la secuencia de la amilina humana, con el primer aminoácido, o N-terminal, delecionado.

Además de la descripción de compuestos conforme a la fórmula anterior, se pueden identificar ciertos compuestos preferidos, incluyendo ^{25,28,29}Pro-h-amilina, ¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, des-¹Lys-h-amilina y ²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina. Estos péptidos preferiblemente tienen una tendencia reducida a formar agregados o a precipitar bajo presión comparados con la amilina humana.

Los compuestos descritos aquí que son especialmente preferidos incluyen ¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, ¹⁸Arg^{25,28,29}Pro-h-amilina, des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28,29}Pro-h-amilina, ^{25,28,29}Pro-h-amilina, des-¹Lys^{25,28,29}Pro-h-amilina, y ²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina. Aún más compuestos peptídicos agonistas de amilina incluyen:

55 ²³Leu²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina;

60 ²³Leu²⁵Pro²⁶Val²⁸Pro-h-amilina;

65 des-¹Lys²³Leu²⁵Pro²⁶Val²⁸Pro-h-amilina;

70 ¹⁸Arg²³Leu²⁵Pro²⁶Val²⁸Pro-h-amilina;

75 ¹⁸Arg²³Leu^{25,28,29}Pro-h-amilina;

80 ¹⁸Arg²³Leu^{25,28}Pro-h-amilina;

85 ¹⁷Ile²³Leu^{25,28,29}Pro-h-amilina

ES 2 316 161 T3

¹⁷Ile^{25,28,29}Pro-h-amilina;
des-¹Lys¹⁷Ile²³Leu^{25,28,29}Pro-h-amilina;

5 ¹⁷Ile¹⁸Arg²³Leu-h-amilina;
¹⁷Ile¹⁸Arg²³Leu²⁶Val²⁹Pro-h-amilina;
10 ¹⁷Ile¹⁸Arg²³Leu²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina
¹³Thr²¹His²³Leu²⁶Ala²⁸Leu²⁹Pro³¹Asp-h-amilina;
¹³Thr²¹His²³Leu²⁶Ala²⁹Pro³¹Asp-h-amilina;
15 des-¹Lys¹³Thr²¹His²³Leu²⁶Ala²⁸Pro³¹Asp-h- amilina;
¹³Thr¹⁸Arg²¹His²³Leu²⁶Ala²⁹Pro³¹Asp-h-amilina;
20 ¹³Thr¹⁸Arg²¹His²³Leu^{28,29}Pro³¹Asp-h-amilina; y,
¹³Thr¹⁸Arg²¹His²³Leu²⁵Pro²⁶Ala^{28,29}Pro³¹Asp-h-amilina.

25,28,29 Pro-h-amilina a la que también se hace referencia como “pramlintida,” es el agonista más preferido de la amilina humana. ^{25,28,29}Pro-h-amilina se denominará “pramlintida” de aquí en adelante. La pramlintida es sustancialmente diferente y mejor que la amilina humana, manteniendo las propiedades biológicas deseadas de la amilina humana con atributos superiores, incluyendo propiedades farmacéuticas superiores (L.S.L. Gaeta y T.J. Rink, *Medicinal Chemistry Research*, 1994). La pramlintida y otros agonistas de amilina mostrados aquí se describen y reivindican en la patente de los Estados Unidos No. 5686411, publicada el 11 de noviembre de 1997.

30 Los agonistas de amilina se deben formular en una composición farmacéutica estable, segura para la administración a un paciente. Se usa una cantidad suficiente de agua para inyección para obtener la concentración deseada de solución. También pueden estar presentes agentes tonificantes adicionales tal como cloruro de sodio, así como otros excipientes, si se desea. Tales excipientes, sin embargo, deben mantener la tonicidad global del agonista de amilina, o amilina, y generalmente no son preferidos para esta formulación excepto si se pueden necesitar.

40 Los términos tampón, solución tampón y solución tamponada, cuando se usan con referencia a concentración de iones de hidrógeno o pH, se refiere a la capacidad de un sistema, particularmente una solución acuosa, a resistir un cambio de pH al añadir ácido o álcali, o al diluir con un solvente. Característica de las soluciones tamponadas, que sufren pequeños cambios de pH al añadir ácido o base, es la presencia de bien un ácido débil y una sal del ácido débil, o una base débil y una sal de la base débil. Un ejemplo del anterior sistema es ácido acético y acetato de sodio. El cambio de pH es ligero mientras la cantidad de ión hidronio o hidroxilo no supere la capacidad del sistema de tampón de neutralizarlo.

45 La estabilidad de la formulación del péptido agonista de amilina aumenta manteniendo el pH de la formulación en el intervalo de 3,8 a 4,2. Un pH especialmente preferido es 4,0. Se entiende presentemente que cuando el pH de la formulación farmacéutica supera 5,5, la degradación química del péptido se puede acelerar de modo que la vida útil es menor de alrededor de dos años.

50 El tampón usado en la práctica de la presente invención es un tampón acetato (preferiblemente a una concentración final en la formulación de desde alrededor de 1-5 hasta alrededor de 60 mM), tampón fosfato (preferiblemente a una concentración final en la formulación de desde alrededor de 1-5 hasta alrededor de 30 mM) o tampón glutamato (preferiblemente a una concentración final en la formulación de desde alrededor de 1-5 hasta alrededor de 60 mM). El tampón más preferido es acetato (preferiblemente a una concentración final de la formulación de desde alrededor de 5 hasta alrededor de 30 mM).

60 Se puede incluir un estabilizador en la presente formulación pero, y de forma importante, no es necesario. Si se incluye, sin embargo, un estabilizador útil en la práctica de la presente invención es un hidrato de carbono o un alcohol polihídrico. Los presentes inventores han descubierto que un estabilizador adecuado útil en la práctica de la presente invención es aproximadamente del 1,0 al 10% (peso/volumen) de un hidrato de carbono o alcohol polihídrico. Los alcoholes polihídricos y los hidratos de carbono comparten el mismo rasgo distintivo en sus esqueletos, es decir -CHOH-CHOH-, que es responsable de la estabilización de las proteínas. Los alcoholes polihídricos incluyen tales compuestos como sorbitol, manitol, glicerol, y polietilenglicoles (PEGs). Estos compuestos son moléculas de cadena lineal. Los hidratos de carbono, tal como manosa, ribosa, trehalosa, maltosa, inositol, y lactosa, por otra parte, son moléculas cíclicas que pueden contener un grupo ceto o aldehído. Se ha demostrado que estas dos clases de compuestos son eficaces en estabilizar proteínas contra la desnaturalización producida por temperaturas elevadas y mediante procesos de congelación-descongelación o liofilización. Los hidratos de carbono adecuados incluyen: galactosa, arabinosa, lactosa o cualquier otro hidrato de carbono que no tenga un efecto adverso en un paciente diabético, es decir, el hidrato de

ES 2 316 161 T3

carbono no se metaboliza para formar grandes concentraciones de glucosa en la sangre. Tales hidratos de carbono son bien conocidos en la técnica como adecuados para diabéticos.

Preferiblemente, si se incluye un estabilizador, el péptido de la presente invención se estabiliza con un alcohol

- 5 polihídrico tal como sorbitol, manitol, inositol, glicerol, xilitol, y copolímeros de polipropilen/etilenglicoles así como varios polietilenglicoles (PEG) de peso molecular 200, 400, 1450, 3350, 4000, 6000, y 8000). El manitol es el alcohol polihídrico preferido. Otra característica útil de las formulaciones liofilizadas de la presente invención es el mantenimiento de la tonicidad de las formulaciones liofilizadas descritas aquí con el mismo componente de formulación que sirve para mantener su estabilidad. El manitol es el alcohol polihídrico preferido usado para este fin.

10

La farmacopea de los Estados Unidos (USP) establece que se deben añadir agentes antimicrobianos a concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones contenidas en envases de dosis múltiples. Deben estar presentes a una concentración adecuada al tiempo de uso para prevenir la multiplicación de microorganismos introducidos de forma inadvertida en la preparación al retirar una parte del contenido con una aguja y jeringuilla hipodérmicas, o usando otros medios invasores para la administración, tal como inyectores de pluma. Los agentes antimicrobianos se deben evaluar para asegurar la compatibilidad con todos los otros componentes de la fórmula, y su actividad debe ser evaluada en la fórmula total para asegurar que un agente particular que es eficaz en una formulación no es ineficaz en otra. No es extraño encontrar que un agente particular será eficaz en una formulación pero no eficaz en otra formulación.

20

Un conservante es, en el sentido farmacéutico común, una sustancia que previene o inhibe el crecimiento microbiano y se puede añadir a la formulación farmacéutica con este fin para evitar el consiguiente deterioro de la formulación por microorganismos. Aunque la cantidad de conservante no es grande, puede afectar sin embargo a la estabilidad global del péptido. De esta manera, incluso la selección de conservantes puede ser difícil.

25

El intervalo para cada conservante, solo o en combinación con otros, es: alcohol bencílico (0,1-1,0%), o m-cresol (0,1-0,6%) o fenol (0,1-0,8%) o combinación de metil (0,05-0,25%) y etil o propil o butil (0,005-0,03%) parabenos. Los parabenos son ésteres alquilos inferiores de ácido para-hidroxibenzoico.

30

Se expone una descripción detallada de cada conservante en "Remington's Pharmaceutical Sciences" así como en *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Vol. 1, 1992, Avis *et al.*

La pramlintida (previamente referida como "AC-137") no tiene tendencia a adsorberse al vidrio en un envase de vidrio cuando está en forma líquida, por lo tanto, no se requiere un agente tensoactivo para estabilizar adicionalmente la formulación farmacéutica. Sin embargo, con respecto a los agonistas de amilina o amilinas que tienen tal tendencia, se debe usar un agente tensoactivo en su formulación, formulaciones que deben ser entonces liofilizadas. Los agentes tensoactivos frecuentemente producen desnaturalización de proteínas, tanto de rompimiento hidrofóbico como por separación de puentes de sales. Concentraciones relativamente bajas de agente tensoactivo ejercen un actividad desnaturizante potente, debido a las fuertes interacciones entre los grupos tensoactivos y los sitios reactivos en las proteínas. Sin embargo, el uso prudente de esta interacción puede estabilizar proteínas contra desnaturalización interfacial o de superficie. Los agentes tensoactivos que podrían estabilizar adicionalmente el péptido pueden estar presentes opcionalmente en el intervalo desde alrededor del 0,001 al 0,3% (peso/volumen) de la formulación total e incluyen polisorbato 80 (es decir, monooleato polioxietileno(20) sorbitano), CHAPS® (es decir, 1-propanosulfonato de 3-[3-colamidopropil]-dimetilamonio), Brij® (por ejemplo, Brij 35, que es (éter polioxietileno (23) laurilo), poloxámero, u otro agente tensoactivo no iónico.

45

También puede ser deseable añadir cloruro de sodio u otra sal para ajustar la tonicidad de la formulación farmacéutica, dependiendo del tonificante seleccionado. Sin embargo, esto es opcional y depende de la formulación particular seleccionada. Las formulaciones parenterales deben ser isotónicas o sustancialmente isotónicas de otra manera pueden producirse irritación y dolor significativos en el sitio de la administración.

50

El vehículo de la mayor importancia para los productos parenterales es agua. Se debe preparar agua de calidad adecuada para administración parenteral bien mediante destilación o mediante ósmosis inversa. Sólo por estos medios es posible separar de forma adecuada las varias sustancias contaminantes líquidas, gases y sólidas del agua. El agua para inyección es el vehículo acuoso preferido para su uso en la formulación farmacéutica de la presente invención.

55

Es posible que puedan estar presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica del péptido de la presente invención. Tales ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo seroalbúmina humana, gelatina o proteínas) y un ión dipolar (por ejemplo, un aminoácido tal como betaina, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar de forma adversa a la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente invención.

Los envases también son una parte integral de la formulación de una inyección y se pueden considerar un componente, puesto que no hay envase que sea totalmente insoluble o no afecte de alguna manera al líquido que contiene, particularmente si el líquido es acuoso. Por lo tanto, la selección de un envase para una inyección particular se debe basar en una consideración de la composición del envase, así como de la solución, y el tratamiento al que se someterá. La adsorción del péptido a la superficie de vidrio del vial también se puede minimizar, si es necesario, mediante el uso de vidrio de borosilicato #33 (Tipo Wheaton I-33) o su equivalente (Wheaton Glass Co.). Otros vendedores de viales

ES 2 316 161 T3

y cartuchos similares de vidrio de borosilicato aceptables para producción clínica incluyen Kimbel Glass Co., West Co., Bünder Glas GMBH y Forma Vitrum. Las propiedades biológicas y químicas de amilina se pueden estabilizar mediante formulación y liofilización en un vial de suero de borosilicato tipo I-33 de Wheaton a una concentración final de 1,0 mg/ml y 10 mg/ml de amilina en presencia de manitol al 5% y Tween 80 al 0,02%.

5

Para permitir la introducción de una aguja de una jeringuilla hipodérmica en un vial multidosis y proporcionar un resellado tan pronto como se retire la aguja, cada vial está sellado con un cierre de goma que se sujetó en su lugar por una tira de aluminio.

10 Se pueden usar tapones para viales de vidrio, tales como West 4416/50, 4416/50 (con lado de Teflon) y 4406/40, Abbott 5139 o cualquier tapón equivalente como cierre para productos farmacéuticos para inyección. Estos tapones son compatibles con el péptido así como los otros componentes de la formulación. Los inventores también han descubierto que estos tapones pasan la prueba de integridad de tapones cuando se prueban usando los patrones de uso de pacientes, por ejemplo, el tapón puede soportar al menos alrededor de 100 inyecciones.

15

Cada uno de los componentes de la formulación farmacéutica descrita anteriormente se conoce en la técnica y se describen en *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Vol. 1, 2^a ed., Avis *et al.* Ed., Marcel Dekker, Nueva York, N.Y. 1992, que se incorpora por referencia en su totalidad aquí.

20 El proceso de producción para la formulación anterior implica pasos de composición, esterilización por filtración y llenado. El procedimiento de componer implica disolución de ingredientes en un orden específico (conservante seguido por estabilizante/agentes de tonicidad, tampones y pramlintida) o disolverlos al mismo tiempo.

25 Cualquier proceso de esterilización se puede usar al desarrollar la formulación farmacéutica del péptido de la presente invención. Los procesos de esterilización típicos incluyen filtración, vapor (calor húmedo), calor seco, gases (por ejemplo, óxido de etileno, formaldehído, dióxido de cloro, óxido de propileno, beta-propiolactona, ozono, cloropicrina, ácido peracético, bromuro de metilo y similares), exposición a radiación y manejo aseptico. La filtración es el método preferido de esterilización en la práctica de la presente invención. La esterilización por filtración implica filtración a través de 0,45 µm y 0,22 µm (1 ó 2) conectados en serie. Después de la filtración, la solución se introduce en viales apropiados como se describe anteriormente.

30 Se pretende que la formulación farmacéutica de la presente invención sea para administración parenteral. Las vías adecuadas de administración incluyen intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intraarticular, intratecal y similares. La vía subcutánea de administración es preferida. La distribución en mucosa también es permisible.

35

Las formulaciones usadas en la presente invención son especialmente ventajosas porque mantienen la compatibilidad de mezcla a corto plazo con insulina. Actualmente, hay más de treinta productos de insulina disponibles en los Estados Unidos. Todas las preparaciones de insulina regular en los Estados Unidos se suministran ahora a pH neutro. Esto ha producido una mejora en la estabilidad de la hormona, y los pacientes ya no necesitan refrigerar más el vial de insulina en uso. Además, la insulina regular neutra se puede mezclar en cualquier proporción deseada con otras preparaciones de insulina modificada ya que todas las preparaciones comercializadas de insulina estarán al mismo pH. Las preparaciones de insulina se han dividido en tres categorías generales según la rapidez, duración e intensidad de acción tras la administración subcutánea. Se clasifican como insulinas de acción rápida, intermedia y larga. También hay varios tipos de insulinas en estas categorías. Incluyen insulinas regulares, insulinas zinc protamina, insulinas NPH, insulina semilenta (suspensiones rápidas de insulina y zinc), insulinas lentas (suspensiones de insulina zinc), e insulinas ultralentas (suspensiones extendidas de insulina y zinc).

40 La insulina cristalina se prepara mediante la precipitación de la hormona en presencia de zinc (como cloruro de zinc) en un medio tampón adecuado. Cuando la insulina cristalina se disuelve en agua también se conoce como *insulina regular*. Tras la inyección subcutánea se absorbe rápidamente (15-60 minutos). Su acción es rápida de inicio y relativamente corta de duración, es decir, alcanza su efecto pico en alrededor de 1,5 a 4 horas, y dura alrededor de 5-9 horas.

45 Al permitir que la insulina y zinc reaccionen con la proteína básica protamina, Hagedorn y asociados prepararon un complejo proteico, protamina zinc insulina. Cuando este complejo se inyecta de forma subcutánea en una suspensión acuosa, se disuelve sólo lentamente en el sitio de deposición, y la insulina se absorbe a velocidad retardada pero estable. La insulina en suspensión con zinc y protamina se ha cambiado en su mayor parte por una suspensión de insulina isófana, también conocida como insulina NPH; la N indica una solución neutra (pH 7,2), la P se refiere al contenido en insulina zinc protamina, y la H significa el origen en el laboratorio de Hagedorn. Es una solución modificada de insulina zinc protamina que es cristalina. Las concentraciones de insulina, protamina y zinc están dispuestas de tal modo que la preparación tiene un inicio y una duración de acción intermedia entre aquellas de la insulina regular y la suspensión de insulina zinc protamina. Sus efectos sobre el azúcar en sangre son indistinguibles de los de una mezcla extemporánea de 2 a 3 unidades de insulina regular y 1 unidad de suspensión de insulina zinc protamina.

55 Estudios químicos han revelado que la solubilidad de la insulina se determina en medida importante por su estado físico (amorfo, cristalino, tamaño de los cristales) y por el contenido en zinc y la naturaleza del tampón en el que está resuspendida. La insulina puede de esta manera estar preparada en una forma de absorción lenta, de acción lenta sin el uso de otras proteínas, tal como protamina, que se unan. Los cristales grandes de insulina con alto contenido

ES 2 316 161 T3

en zinc, cuando se recogen y resuspenden en una solución de acetato de sodio-cloruro de sodio (pH 7,2 a 7,5), se absorben lentamente tras la inyección subcutánea y ejercen una acción de larga duración. Esta preparación cristalina se denomina suspensión extendida de insulina zinc (insulina ultralenta). La insulina amorfa precipitada a pH alto es casi tan rápida en el inicio como la insulina regular, pero de alguna manera tiene una mayor duración de acción. Esta

5 preparación amorfa se denomina suspensión rápida de insulina zinc (insulina semilenta). Estas dos formas de insulina se pueden mezclar para dar una mezcla estable de insulina cristalina (7 partes) y amorfa (3 partes) - denominada suspensión insulina zinc (insulina lenta) - que es intermedia en el inicio y duración de acción entre las preparaciones semilenta y ultralenta y es similar a la insulina NPH.

10 En resumen, las insulinas de acción rápida incluyen las insulinas regulares y las suspensiones rápidas de insulina zinc (insulinas semilentas). Las insulinas de acción intermedia incluyen suspensiones de insulina isófana (insulinas NPH, insulina isófana) y las suspensiones de insulina zinc (insulinas lentas). Las insulinas de acción larga incluyen las suspensiones de insulina zinc protamina, y las suspensiones extendidas de insulina zinc (insulinas ultralentas). La mayoría de estas preparaciones están disponibles como insulinas porcina o bovina. Las insulinas humanas de 15 origen de ADN recombinante están disponibles como insulinas regulares e isófana y como suspensiones de insulina zinc. Recientemente, se ha introducido un análogo de insulina modificada (Lys(B28), Pro(B29)) de insulina humana, creando invirtiendo el orden de los aminoácidos en las posiciones 28 y 29 de la cadena B de la insulina). Es una insulina de acción rápida, con un inicio más rápido de acción de disminución de glucosa, un pico de acción más temprano, y una duración de la acción más corta que la insulina humana regular.

20 Muchas insulinas están disponibles de un número de compañías. Estas incluyen Eli Lilly & Company y Novo Nordisk, dos de los mayores suministradores de insulina en el mundo. Las insulinas de acción rápida disponibles de Eli Lilly incluyen (1) Iletin® I (Regular); (2) Regular Iletin® II (cerdo, 100 Unidades); (3) Regular Iletin® II (Concentrada, cerdo, 500 Unidades); (4) Humalog® Injection (insulina lyspro, origen ADN recombinante); y (5) Humulin® R (insulina regular, origen ADN recombinante, 100 Unidades). Las insulinas de acción rápida de Novo Nordisk incluyen 25 (1) Novolin® R (Regular, Inyección de Insulina Humana (origen ADN recombinante) 100 Unidades); (2) Novolin® R PenFill Cartuchos de 1.5 ml (Regular, Inyección de Insulina Humana (origen ADN recombinante) 100 Unidades); (3) Novolin® R Prefilled™ (Regular, Inyección de Insulina Humana (origen ADN recombinante) en una jeringuilla precargada de 1.5 ml, 100 unidades/ml); (4) Insulina Regular Purificada de cerdo (100 Unidades/ml); y (5) Velosulin® BR 30 (Inyección de Insulina Regular Humana tamponada, 100 Unidades/ml). Las insulinas de acción intermedia disponibles de Eli Lilly incluyen (1) Humulin® 50/50 (50% de suspensión de insulina humana isófana y 50% de inyección de insulina humana (origen ADNr), 100 Unidades); (2) Humulin® 70/30 (70% de suspensión de insulina humana isófana y 30% de inyección de insulina humana (origen ADNr), 100 Unidades); (3) Humulin® L (lenta; insulina humana (origen ADNr) suspensión con zinc, 100 Unidades); (4) Humulin® N (NPH; insulina humana (origen ADNr) suspensión 35 isófana, 100 Unidades); (5) Lente® Iletin® I, (suspensión de insulina zinc, vaca-cerdo); (6) NPH Iletin® I (suspensión de insulina isófana, vaca-cerdo); (7) Lente Iletin® II NPH (suspensión de insulina zinc, purificada de cerdo); y (8) NPH Iletin® II, (suspensión de insulina isófana, purificada de cerdo). Las insulinas de acción intermedia disponibles de Novo Nordisk incluyen (1) Novolin® L (Lenta, suspensión de insulina humana zinc (origen ADN recombinante), 100 Unidades/ml); (2) Novolin® N (NPH, suspensión de insulina humana isófana (origen ADN recombinante), 100 40 Unidades/ml); (3) Novolin® N PenFill® Cartuchos de 1.5 ml; (4) Novolin® N Prefilled™ (NPH, suspensión de insulina humana isófana (origen ADN recombinante) en una jeringuilla precargada de 1.5 ml, 100 Unidades/ml); (5) Novolin® 70/30 (70% NPH, suspensión de insulina humana isófana y 30% Regular, inyección de insulina humana (origen ADN recombinante), 100 Unidades/ml); (6) Novolin® 70/30 PenFill® Cartuchos de 1.5 ml; (7) Novolin® 70/30 Prefilled™ (70% NPH, suspensión de insulina humana isófana y 30% Regular, inyección de insulina humana 45 (origen ADN recombinante), en una jeringuilla precargada de 1.5 ml, 100 Unidades/ml); (8) Insulina lenta purificada de cerdo (Suspensión de Zinc, USP 100 Unidades/ml); y (9) Suspensión de Insulina NPH Isófana Purificada de cerdo (100 Unidades/ml). Las insulinas de acción larga incluyen Humulin® U (Ultralente® suspensión extendida de insulina humana (origen ADN recombinante) y zinc) de Eli Lilly.

50 Esta invención usa formulaciones de péptidos, preferiblemente formulaciones del péptido pramlintida, que facilitan la compatibilidad de mezcla a corto plazo de todos los tipos de productos de insulina incluyendo productos de insulina regular (por ejemplo, Humulin® R y Novolin® R), productos de insulina de acción intermedia (por ejemplo, Humulin® 70/30 y Novolin® 70/30) y productos de insulina de acción larga (por ejemplo, Humulin® U) con la formulación de péptido antes de la inyección. La biodisponibilidad deseada de la insulina y el péptido agonista de amilina o amilina 55 se mantiene. Esto produce una reducción significativa en el número de inyecciones por día en pacientes que están sometidos a tratamiento con insulina y un agonista de amilina (por ejemplo, pramlintida) o amilina.

La insulina así como los análogos de insulina son útiles en la práctica de la presente invención. Se han desarrollado 60 análogos monoméricos de insulina, por ejemplo Lys^{B28}Pro^{B29}-insulina humana, a la que también se hace referencia como "LysPro insulina" o "insulina lispro". Se dice que estos análogos son ventajosos ya que se pueden estabilizar por ligandos que inducen al de otra manera análogo monomérico a asociarse en condiciones farmacéuticamente útiles. Este análogo estabilizado permanece de acción rápida en un estado asociado.

De esta manera, cualquier tipo de insulina se puede introducir en una jeringuilla junto a la formulación de péptido 65 de la presente invención. También es posible cualquier orden de mezcla o introducción de péptido e insulina en una jeringuilla, pero el orden preferido es colocar la insulina en la jeringuilla primero, seguida por el péptido para reducir el potencial de contaminación cruzada y precipitación.

ES 2 316 161 T3

La cantidad de insulina y formulación de péptido en la jeringuilla depende de las necesidades individuales de un paciente particular. De acuerdo con esto, la cantidad presente en una jeringuilla es una cantidad suficiente para mantener un nivel de insulina adecuado para un paciente. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar a cualquier ser humano o animal en necesidad de tal tratamiento.

5 Como se ha demostrado con la pramlintida, y dependiendo del tipo de insulina y de la relación en volumen de la mezcla, la insulina y la formulación de péptido pueden permanecer en la misma jeringuilla durante al menos alrededor de 24 horas y la insulina y el péptido mantendrán su actividad y estabilidad.

10 Por ejemplo, los productos de insulina regular se pueden mezclar con un péptido, por ejemplo, pramlintida, a un pH de aproximadamente 4,0 con tampón acetato 20 ó 30 mM para mantener la solubilidad de la insulina. El pH de la mezcla sería entonces menos de 4,5. Una formulación de péptido preferida de pramlintida con una mayor capacidad de tamponar (acetato 30 mM) y a baja concentración marcada, por ejemplo, 0,1 mg/ml, forma una solución transparente de forma instantánea (menos de un minuto) cuando se mezcla con productos de insulina regular en el intervalo de
15 cinco a 20 unidades. Esta concentración marcada baja de la pramlintida produce un volumen de dosis mayor, 300 μ L. Este aumento de volumen puede ser conveniente para bajar el pH a menos de 4,5 casi inmediatamente aumentando el factor de dilución de la insulina y facilitando la transición de insulina de hexámero a monómero antes de la inyección. Se cree que esta modulación de la insulina es conveniente al permitir velocidades aumentadas de absorción y producir
20 acción rápida en el tiempo sin afectar la biodisponibilidad de la insulina. Este efecto se puede aproximar la acción rápida en el tiempo observada en la Lys^{B28}Pro^{B29} insulina humana.

Las formulaciones de péptidos, por ejemplo, pramlintida, a un pH desde 4,0 a 5,5, concentración de tampón de 2 a 30 mM y alta potencia, se pueden mezclar con productos de insulina regular antes de la inyección para dar soluciones con un pH mayor de 6,8 de modo que las propiedades de la insulina no estén afectadas. Estas mezclas no afectarían la
25 velocidad de absorción o biodisponibilidad de la insulina ni la biodisponibilidad del péptido.

Las formulaciones de la invención se describen anteriormente en general. A continuación se proporcionan ejemplos de varias formulaciones útiles en la invención. Estos ejemplos no son limitantes de la invención y los expertos en la materia pueden construir fácilmente otras formulaciones dentro del ámbito de las reivindicaciones.

30 La invención se describirá ahora en más detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

35 Formulación líquida de pramlintida

Este ejemplo describe dos formulaciones líquidas preferidas para pramlintida. Las vías mayoritarias de degradación para el péptido son la desamidación y la hidrólisis del enlace peptídico. Por lo tanto, se investigó la estabilidad del péptido en la región de pH de 4,0-5,5 a 45°C. Se muestra el perfil de velocidad con el pH para el péptido en tampón
40 acetato 60 mM, manitol al 4,1%, m-cresol al 0,3% en la Figura 1. Se puede observar a partir de esta figura que Pro^{25,28,29}-h-amilina a lo largo del intervalo de pH estudiado es más estable a pH 4,0. Se desarrolló la siguiente formulación:

TABLA A

45	INGREDIENTE	Peso (%) / Intervalo
	Pramlintida	0,01-0,2
50	Acetato (30 mM, pH 4,0±0,1): acetato de sodio trihidrato ácido acético glacial	0,061 0,153
55	Manitol	4,3
	m-cresol	0,225
	Agua para inyección (cs)	100 mL

60 La formulación anterior con un 0,01% de fármaco mostró una irritación aceptablemente baja en un estudio de irritación subcutánea en conejo. El placebo de esta formulación cuando se probó en seres humanos también mostró un nivel aceptablemente alto de tolerabilidad y baja irritación. El conservante usado en la formulación cumple los criterios de BP para eficacia de conservantes a niveles de m-cresol tan bajos como 0,15%.

65 Se evaluó la estabilidad de la formulación anterior con péptido al 0,01% a 4°C y condiciones aceleradas, 30°C, 40°C y 50°C. Basados en un fuerte intercambio de cationes y análisis de HPLC para la pureza y potencia, se construyeron gráficas semilogarítmicas del % inicial de pureza o potencia frente al tiempo para el péptido como se muestra en la

ES 2 316 161 T3

figuras 2, 3 y 4. Se puede observar de esta gráfica que la degradación del péptido sigue una cinética de primer orden y que la velocidad de degradación (representada por la inclinación en estas curvas), aumenta significativamente con un aumento en la temperatura. La figura 5 muestra la gráfica de $\ln(k_{obs})$ frente a $1/\text{temperatura}$, construida basada en la relación de Arrhenius. Se puede observar a partir de esta gráfica que la degradación de la pramlintida en la formulación 5 sigue la cinética de Arrhenius. Mediante extrapolación de la gráfica a 5°C se calculó la constante de velocidad y se predijo una vida útil de hasta cuatro años para el péptido usando esta constante de velocidad. Se consideró aceptable aproximadamente un 10% de pérdida de potencia y/o un 5% a un 7% de degradación. La vida útil de la formulación farmacéutica a 30°C basada en medidas directas es de al menos 60 días.

10 Ejemplo 2

Formulación líquida de pramlintida

La tabla B describe la segunda formulación de péptido con una vida útil de más de 4 años a 4°C y de más de 15 60 días a 30°C. Esta formulación se diferencia de la de la Tabla A en la concentración de tampón acetato. Esta formulación tampoco muestra irritación en un estudio de irritación subcutánea en conejo. Además, el placebo no mostró irritación significativa en seres humanos. Las vidas útiles de esta formulación son al menos tan buenas como las de la formulación dada en la Tabla A, siendo ambas formulaciones nuevas formas posológicas parenterales de péptidos con vidas útiles sustanciales.

20

TABLA B

INGREDIENTE	Peso (%) / Intervalo
Pramlintida	0,01-0,2
Acetato (20 mM, pH 4,0±0,1):	
acetato de sodio trihidrato	0,049
ácido acético glacial	0,0985
Manitol	4,3
m-cresol	0,225
Agua para inyección (cs)	100 mL

40 Ejemplo 3

Formulación líquida de pramlintida e insulina

Las formulaciones descritas en las Tablas A y B también son compatibles cuando se mezclan en una jeringuilla con 45 productos de insulina comercialmente disponibles. La tabla C proporciona los resultados del estudio de compatibilidad de insulina con Humulin® R. Los resultados indican el tiempo para formar una solución transparente y criterios para compatibilidad, cuando la formulación de péptido se mezcla con Humulin R en una relación específica en una jeringuilla. Como se explica en Brange *et al.*, "Insulin Structure and Stability," en *Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs: Case Histories*, 1993, Wang *et al.* (Ed), Plenum Press, NY, la insulina tiene un intervalo 50 de pH de zona de precipitación isoelectrónica de 4,5-6,5, a 1 unidad de pH de su punto isoelectrónico. Por lo tanto, si el pH del producto de insulina cae desde $7,2 \pm 0,2$ al pH en el intervalo de precipitación isoelectrónica puede producir que la insulina precipite. De esta manera, se usó la transparencia de la mezcla de solución como un criterio para estudios de compatibilidad. Los volúmenes de insulina usados en este estudio (Tabla C) cubren los intervalos máximo y mínimo típicos para pacientes diabéticos de tipo I. La formulación con mayor capacidad tamponante (Tabla C) forma una solución transparente más rápido que la formulación de menor capacidad tamponante. Sin embargo, al 55 0,01% de la concentración marcada del péptido ambas formulaciones forman una solución transparente con insulina en aproximadamente un minuto. En una jeringuilla, se puede considerar que un minuto es una mezcla instantánea. Concentraciones marcadas del péptido mayores (0,015% o mayor) producen menores volúmenes de dosis y ocasionan que se forme una solución transparente en más de un minuto. El pH final de todas las mezclas de soluciones está fuera 60 del intervalo de precipitación isoelectrónica de la insulina (pH 4,5-6,5).

65

ES 2 316 161 T3

TABLA C

Variantes de formulación de pramlintida	Relación de volumen de mezcla insulina: Pramlintida ($\mu\text{L}:\mu\text{L}$)	pH de la mezcla	Tiempo para formar una solución transparente (seg)
Concentración marcada (%)	Acetato (mM)		
0,01	30	50 (5 unidades) : 300	4,03
		150:300	4,10
		200:300	4,13
	20	50:300	4,09
		150:300	4,15
		200:300	4,20
0,015	30	50:200	4,05
		150:200	4,12
		200:200	4,24
	20	50:200	4,13
		150:200	4,27
		200:200	4,30

La formulación con una concentración marcada del 0,03% (Tabla A) se sometió a un estudio de compatibilidad *in vivo* en ratas. La figura 6 muestra la concentración en plasma frente al tiempo para insulina. El estudio no indicó diferencias significativas en la biodisponibilidad de insulina o péptido cuando se inyectaron juntas tras mezclar o de forma separada como inyecciones individuales. Por lo tanto, estas formulaciones no son sólo estables sino también compatibles con productos de insulina regular tal como Humulin® R y Novolin® R.

Las formulaciones preferidas (Tablas A y B) también se probaron para compatibilidad con productos de insulina de acción intermedia (Humulin® 70/30) y acción larga (Humulin® N). Estos dos productos de insulina son suspensiones y ambos contienen partes de insulina soluble e insoluble en proporciones específicas, y estas proporciones se requieren para alcanzar la biodisponibilidad señalada. Por lo tanto, cuando se mezclan con la formulación de péptido la proporción de insulina soluble a insoluble se debe mantener. La preparación de la muestra para separar las partes solubles de las insolubles de las mezclas péptido/insulina se adoptó de Arakawa *et al.*, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 1989. Se analizaron muestras usando un ensayo de HPLC de fase reversa. La tabla D resume los resultados del estudio. Ambas formulaciones mantienen las proporciones de soluble a insoluble como en las formulaciones control cuando se mezclan formulaciones Humulin® 70/30 y Pro^{25,28,29}-h-amilina en una proporción 3:1. Por lo tanto, en una formulación preferida el volumen de dosis se debe mantener eligiendo una concentración marcada del péptido adecuada. Por ejemplo, usando una formulación con concentración marcada de 0,6 mg/mL o del 0,06% para mezclar con 15 unidades de Humulin 70/30.

ES 2 316 161 T3

TABLA D

Variantes de formulación de pramlintida (concentración marcada: 0,3 mg/ml ó 0,03%)	Relación Insulina: Pramlintida ($\mu\text{L}:\mu\text{L}$)	pH de la mezcla	Porcentaje de insulina soluble	% de pramlintida soluble
pH	Acetato (mM)			
4,0	20	300 (30 unidades):100	6,77	12
		150:100	5,74	4
4,0	30	300:100	6,41	10
		150:100	5,15	4
Humulin N:Humulin R (70:30) (control)	N/A	7,12	11	N/A
Humulin 70/30 premezclada (control)	100:0	7,46	16	N/A

La Tabla E muestra los datos de compatibilidad para formulaciones del producto de insulina de acción larga, Humulin® N. Humulin® N cubre un intervalo de dosis normal para pacientes diabéticos de tipo I. Las proporciones de soluble a insoluble no cambian significativamente comparados con el control cuando se mezclan las formulaciones preferidas (Tablas A y B) con Humulin® N. El volumen de dosis de péptido preferido es 100 μL .

Las formulaciones descritas en las Tablas A y B del ejemplo 1 son formulaciones preferidas con los requerimientos de estabilidad necesaria y compatibilidad de insulina.

TABLA E

Variantes de formulación de pramlintida (concentración marcada: 0,3 mg/ml ó 0,03%)	Relación Insulina: Pramlintida ($\mu\text{L}:\mu\text{L}$)	pH de la mezcla	Porcentaje de insulina soluble	% de pramlintida soluble
pH	Acetato (mM)			
4,0	20	160 (16 unidades):100	5,51	2
		120:100	5,10	4
4,0	30	160:100	5,06	3
		120:100	4,82	4
Humulin N (control)	100:0	7,20	2	N/A

ES 2 316 161 T3

Ejemplo 4

Formulación líquida de péptido e insulina

- 5 La formulación en este ejemplo es la formulación preferida para mezclar con productos de insulina de acción intermedia (Humulin® 70/30 & Novolin® 70/30) y de acción larga (Humulin® N y Novolin® N).

TABLA F

10	INGREDIENTE	Peso (%) / Intervalo
15	Pramlintida	0,03
20	Acetato (12 mM, pH 4,4): acetato de sodio trihidrato ácido acético glacial	0,0555 0,0476
25	Manitol	4,4
30	m-cresol	0,225
	Agua para inyección (cs)	100 mL

La estabilidad de esta formulación es de 3,3 años a 5°C, calculada mediante extrapolación usando datos de estabilidad acelerada, y se determinó que era de 33 días a 30°C usando datos a tiempo real. Los estudios de compatibilidad con Humulin® 70/30 y Humulin® N se realizaron siguiendo el procedimiento explicado en el ejemplo 3. La formulación mantiene las proporciones de insulina soluble a insoluble en el intervalo de los controles cuando se mezcla con Humulin® 70/30 (Tabla G) o Humulin® N (Tabla H). El pH de la muestra no se desvía de las muestras control.

TABLA G

35	Variantes de formulación de pramlintida (concentración marcada: 0,3 mg/ml ó 0,03%)	Relación Insulina: Pramlintida (μ L: μ L)	pH de la mezcla	Porcentaje de insulina soluble	% de pramlintida soluble				
40									
45									
50	4,4	12	300:100	7,02	13	88			
			150:100	6,82	11	92			
55	Humulin® N:Humulin® R (70:30) (control)	N/A	7,12	11	N/A				
60	Humulin® 70/30 premezclada (control)	100:0	7,46	16	N/A				

ES 2 316 161 T3

TABLA H

Variantes de formulación de pramlintida (concentración marcada: 0,3 mg/ml ó 0,03%)	Relación Insulina: Pramlintida (μ L: μ L)	pH de la mezcla	Porcentaje de insulina soluble	% de pramlintida soluble
pH	Acetato (mM)			
4,4	12	160:100	6,54	3
		120:100	6,26	1
Humulin® N (control)	100:0	7,20	2	N/A

Ejemplo 5

Formulación líquida de pramlintida

Esta es una formulación con baja concentración de tampón, 10 mM de tampón acetato y un pH más cercano al pH fisiológico comparado con las formulaciones en los ejemplos 1-4. La estabilidad de esta formulación se calculó mediante extrapolación que era de 2,76 años a 5°C basado en datos de estabilidad acelerada y se determinó que era de 32 días a 30°C usando datos de tiempo real.

TABLA I

INGREDIENTE	Peso (%) / Intervalo
Pramlintida	0,01-0,4
Acetato (10 mM, pH 4,7):	
acetato de sodio trihidrato	0,066
ácido acético glacial	0,0309
Manitol	4,5
m-cresol	0,225-0,3
Agua para inyección (cs)	100 mL

Ejemplo de referencia 1

Formulación liofilizada de péptido

Los agonistas de amilina se pueden estabilizar mediante liofilización de la formulación enumerada en la Tabla J. Se pretende que esta formulación sea para agonistas de amilina o amilinas que tienen características fisicoquímicas que incluyen menor solubilidad y/o mayor inestabilidad.

ES 2 316 161 T3

La pramlintida, sin embargo, un péptido agonista de amilina superior, también se puede liofilizar en la formulación enumerada en la Tabla J.

TABLA J

5

INGREDIENTE	PESO (%) / INTERVALO
Agonista de amilina	0,03-1,0
Manitol	5,0
Polisorbato 80	0,02
Agua para inyección (cs)	100 ml

10

15

Ejemplo de referencia 2

20 *Formulación líquida de péptido*

25

Los agonistas de amilina tal como pramlintida se pueden formular mínimamente con tampón acetato 30 mM como se describe en la Tabla K.

TABLA K

30

35

INGREDIENTE	PESO (%) / INTERVALO
Pramlintida	0,01-0,5
Ácido acético glacial	0,153
Acetato de sodio trihidrato	0,061

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una mezcla obtenible mezclando insulina y una formulación farmacéutica líquida, en donde la formulación farmacéutica comprende del 0,01% al 0,5% (peso/volumen) de un agonista de amilina, en donde dicho agonista de amilina es un análogo peptídico de la amilina humana, mezclado con un agente de tonicidad hidrato de carbono o alcohol polihídrico, estando suministrado dicho agente de tonicidad en una cantidad de entre el 1,0% y el 10% (peso/volumen), y del 0,02% al 0,5% (peso/volumen) de un tampón acetato, fosfato, citrato o glutamato, teniendo dicha formulación un pH de 3,8 a 4,2, y un conservante seleccionado del grupo que consiste en m-cresol, alcohol bencílico, metil, etil, propil y butil parabenos, y fenol, estando suministrado dicho conservante a una concentración del 0,1% al 0,6% (peso/volumen) para m-cresol, del 0,1% al 1,0% (peso/volumen) para alcohol bencílico, del 0,05% al 0,25% (peso/volumen) para metil y del 0,005% al 0,03% (peso/volumen) para etil o propil o butil parabenos, y del 0,1% al 0,8% para fenol.

15 2. La mezcla de la reivindicación 1, en donde dicho agonista de amilina es un agonista de amilina que tiene la secuencia de aminoácidos:

20 **¹A₁-X-Asn-Thr-⁵Ala-Thr-Y-Ala-Thr-¹⁰Gln-Arg-Leu-**

B₁-Asn-¹⁵Phe-Leu-C₁-D₁-E₁-²⁰F₁-G₁-Asn-H₁-Gly-²⁵I₁-

25 **J₁-Leu-K₁-L₁-³⁰Thr-M₁-Val-Gly-Ser-³⁵Asn-Thr-Tyr-Z**

en donde

30 A₁ es hidrogeno Lys, Ser, Ala, des-alfa-amino Lys, o Lys acetilada;

B₁ es Ala, Ser o Thr;

C₁ es Val, Leu o Ile;

35 D₁ es His o Arg;

E₁ es Ser o Thr;

40 F₁ es Ser, Thr, Gln o Asn;

G₁ es Asn, Gln o His;

H₁ es Phe, Leu o Tyr;

45 I₁ es Ala o Pro;

J₁ es Ile, Val, Ala o Leu;

50 K₁ es Ser, Pro, Leu, Ile o Thr;

L₁ es Ser, Pro o Thr;

M₁ es Asn, Asp o Gln;

55 X e Y son residuos independientemente seleccionados que tienen cadenas laterales que están químicamente unidas entre sí para formar un enlace intramolecular; y

60 Z es hidroxi, amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquiloglioxi, ariloglioxi o aralquiloglioxi;

siempre que cuando

65 (a) A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es His, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Phe, I₁ es Ala, J₁ es Ile, K₁ es Ser, L₁ es Ser, y M₁ es Asn;

(b) A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Ile, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Ala, J₁ es Ile, K₁ es Ser, L₁ es Pro, y M₁ es Asn;

ES 2 316 161 T3

- (c) A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Thr, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Ala, J₁ es Ile, K₁ es Ser, L₁ es Pro, y M₁ es Asn;
- 5 (d) A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Pro, J₁ es Val, K₁ es Pro, L₁ es Pro, y M₁ es Asn;
- 10 (e) A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es His, E₁ es Ser, F₁ es Asn, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Pro, J₁ es Val, K₁ es Ser, L₁ es Pro y M₁ es Asn; o
- (f) A₁ es Lys, B₁ es Thr, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es His, H₁ es Leu, I₁ es Ala, J₁ es Ala, K₁ es Leu, L₁ es Pro y M₁ es Asp;

entonces uno o más de cualquiera de A₁ a M₁ no es un L-aminoácido y Z no es amino.

15 3. La mezcla de la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho tampón es un tampón acetato.

4. La mezcla de la reivindicación 1, en donde alcohol polihídrico se selecciona del grupo que consiste en manitol, sorbitol, inositol, glicerol, xilitol, copolímero de propilen/etilenglicol, PEG 8000, PEG 400, PEG 4000, PEG 200, PEG 1450 y PEG 3350.

20 5. La mezcla de la reivindicación 4, en donde dicho alcohol polihídrico es manitol.

6. La mezcla de la reivindicación 1, en donde dicho hidrato de carbono se selecciona del grupo que consiste en manosa, ribosa, trehalosa, maltosa, glicerol, inositol y lactosa.

25 7. La mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que es sustancialmente isotónica.

8. La mezcla de la reivindicación 1, en donde dicho conservante es aproximadamente al menos el 0,15% (peso/volumen) de m-cresol.

30 9. La mezcla de la reivindicación 1, en donde dicho conservante es aproximadamente del 0,1 al 0,3% (peso/volumen) de m-cresol.

10. La mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho agonista de amilina es pramlintida.

35 11. La mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicha formulación comprende además un agente tensoactivo.

12. La mezcla de la reivindicación 11, en donde dicho agente tensoactivo se selecciona del grupo que consiste en monooleato polioxietileno (20) sorbitano, 1-propanosulfonato de 3[(3-colamidopropil)-dimetilamonio], éter polioxietileno (23) laurilo, poloxámero y un agente tensoactivo no iónico.

40 13. La mezcla de la reivindicación 1, en donde dicho agonista de amilina es pramlintida, en donde dicho agente de tonicidad es manitol, y en donde dicho tampón es un tampón acetato.

45 14. La mezcla de la reivindicación 13 en donde dicho conservante es m-cresol del 0,1 al 0,3% (peso/volumen).

50 15. Uso de la mezcla de las reivindicaciones 1 a 14 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes.

55

60

65

FIGURAS

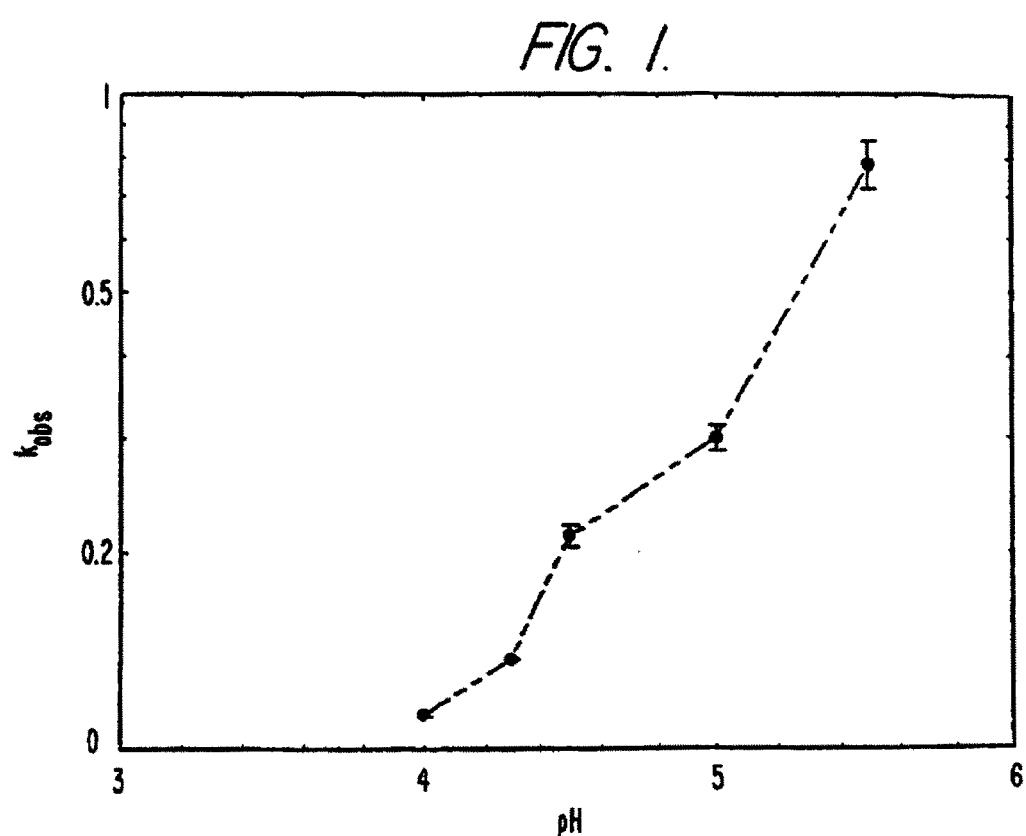


FIG. 2.

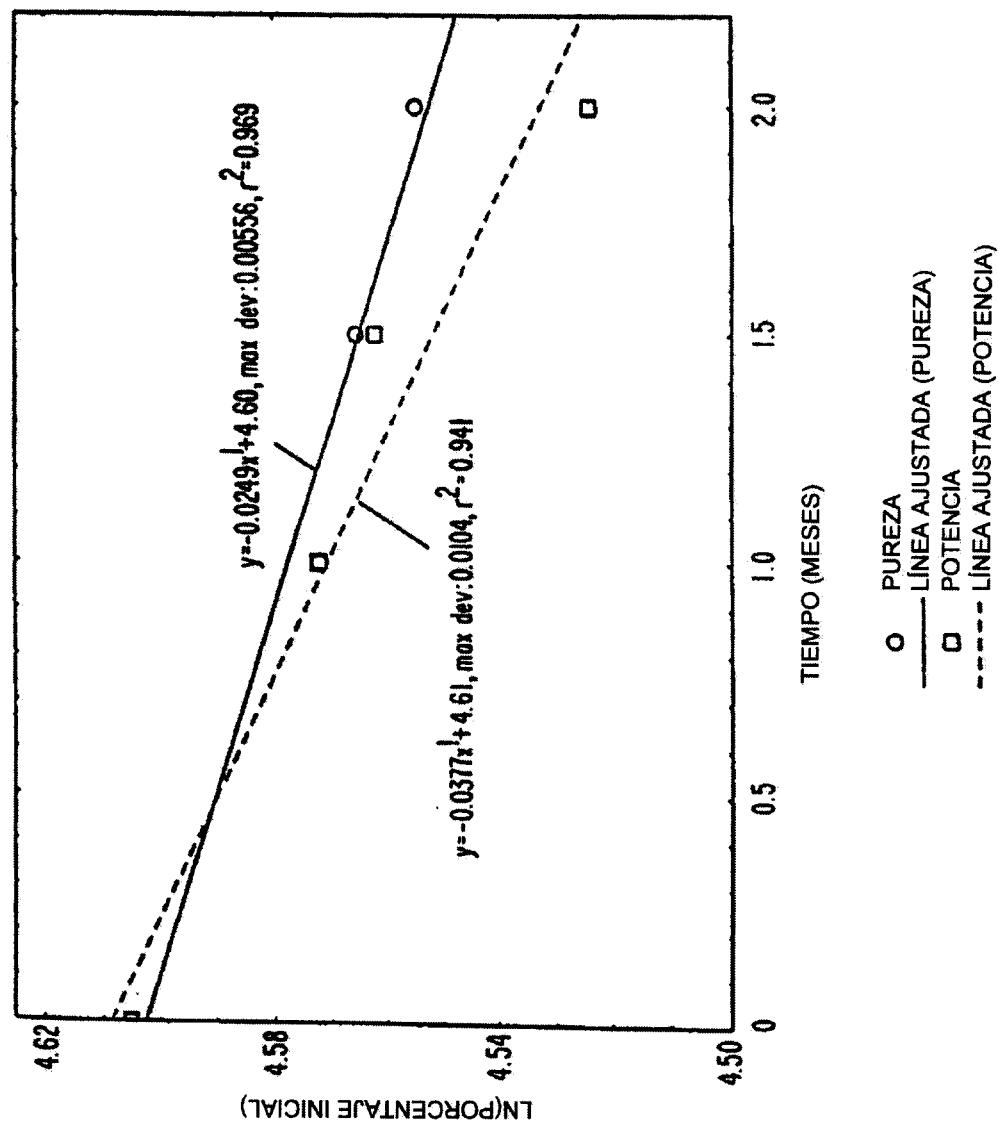


FIG. 3.

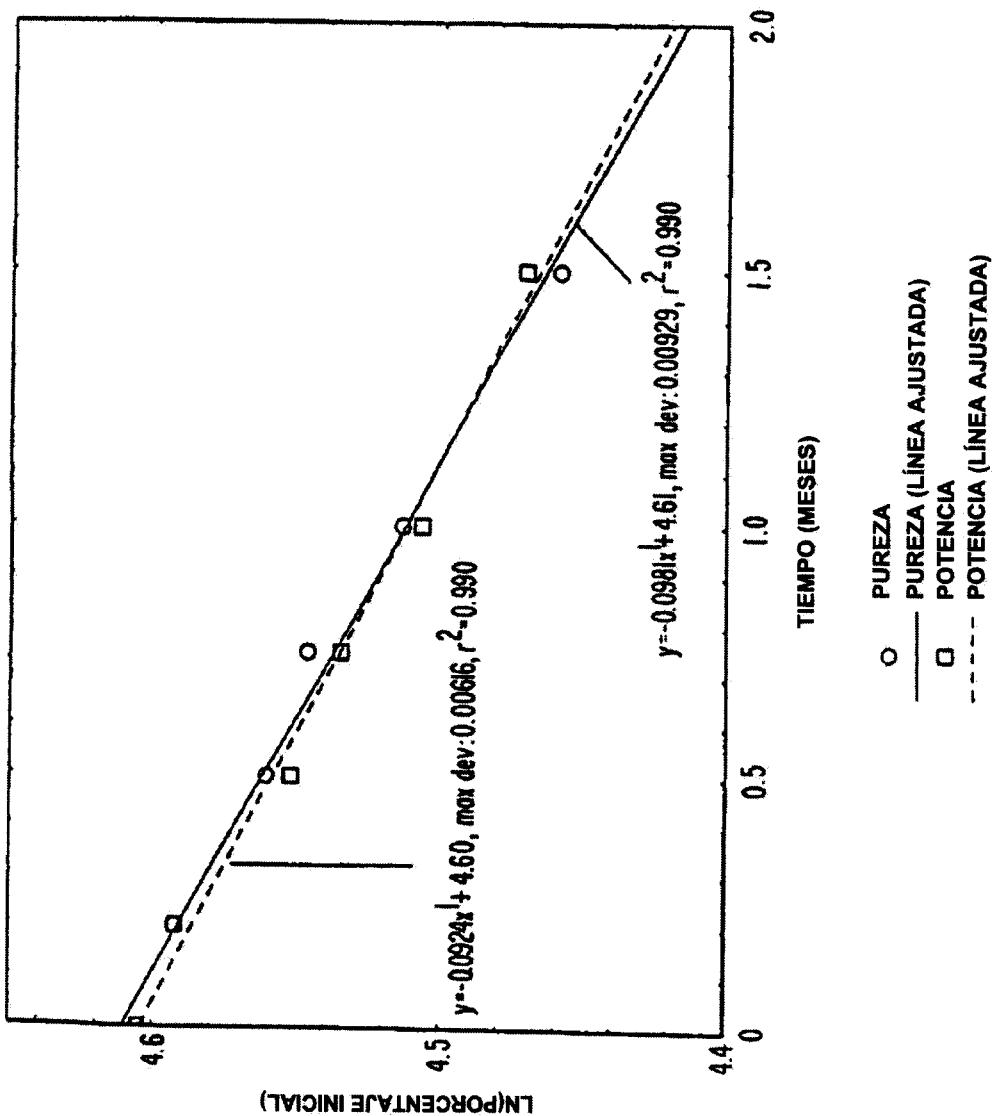
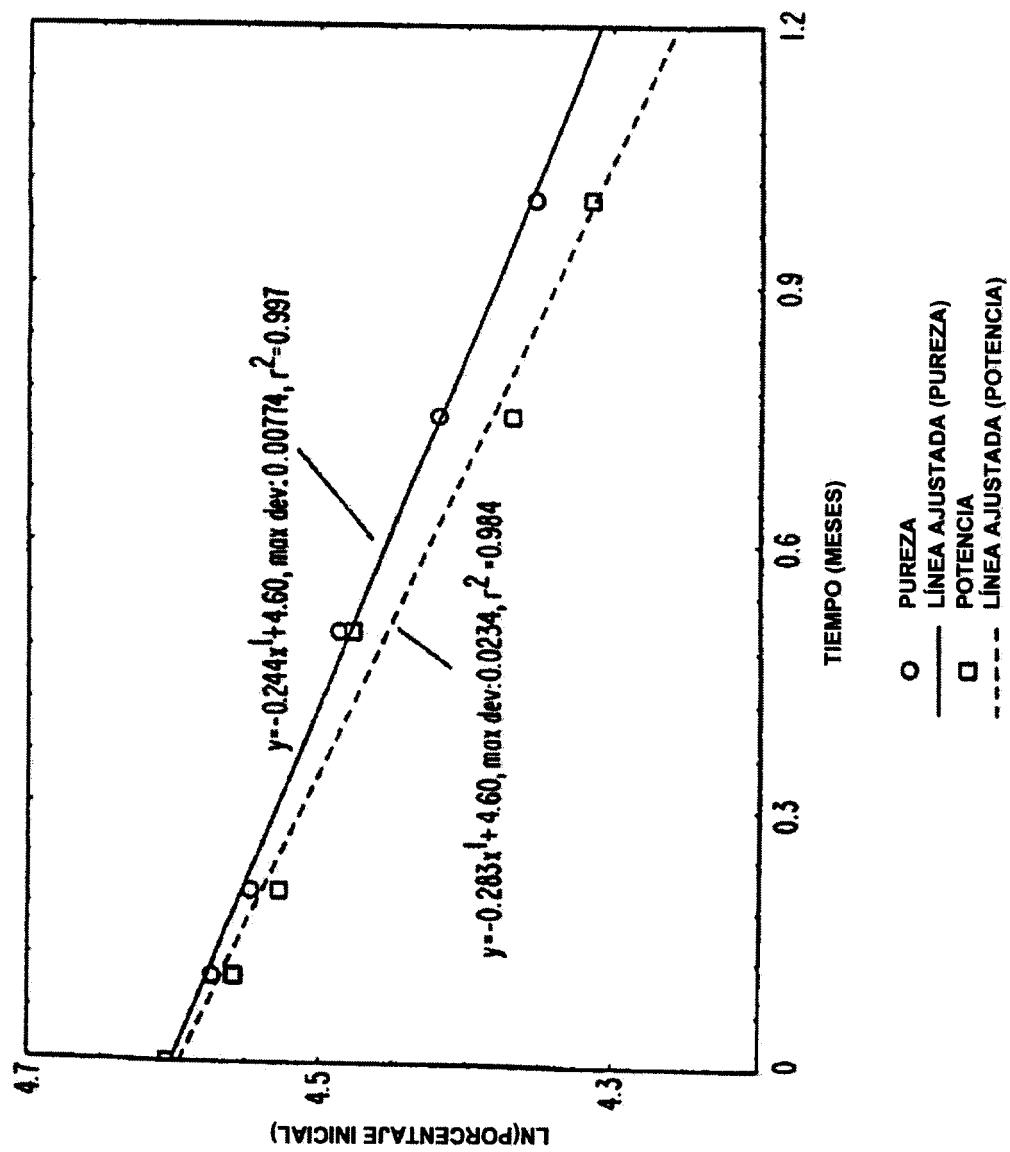


FIG. 4.



ES 2 316 161 T3

FIG. 5.

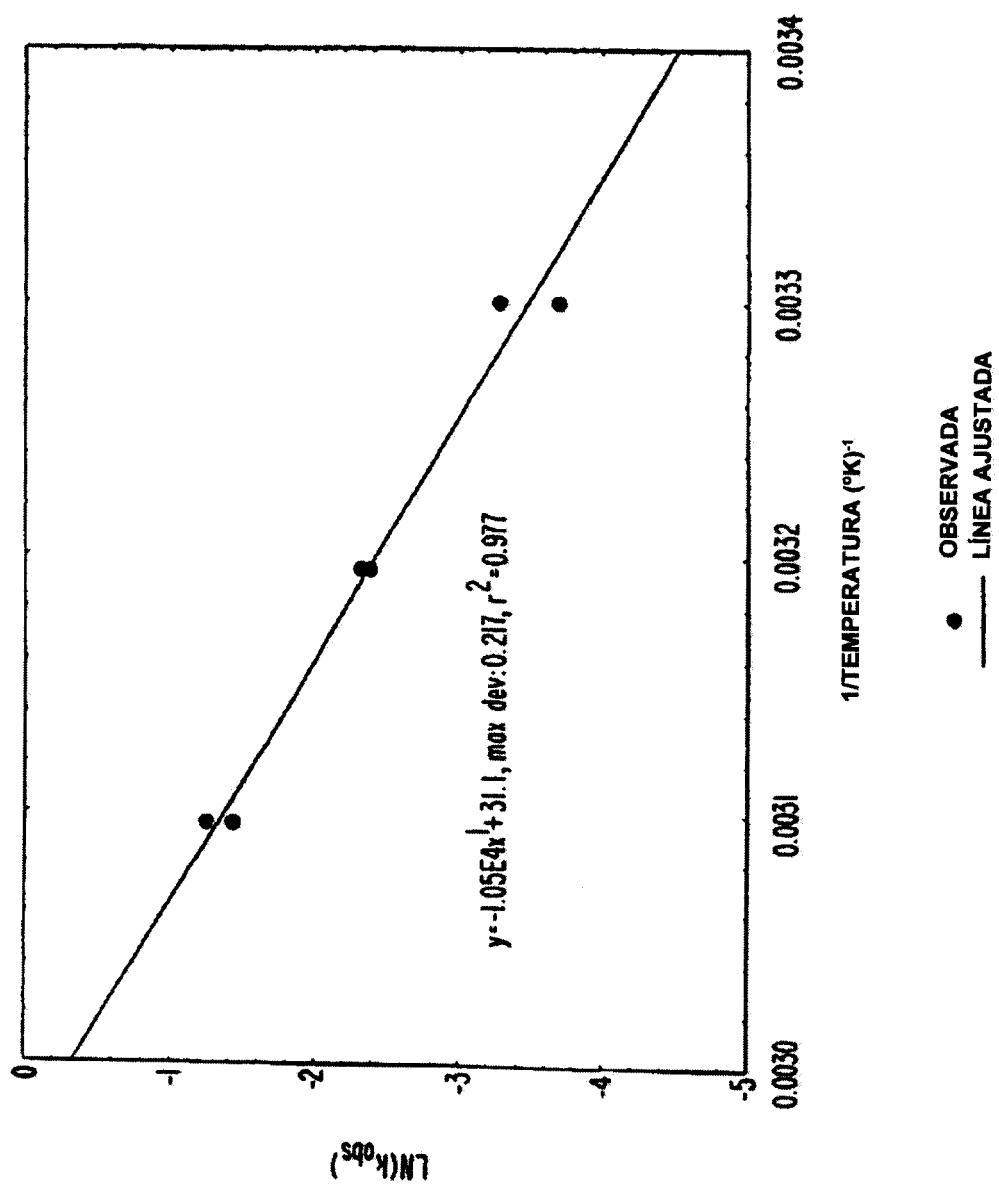


FIG. 6.

