

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 149**

51 Int. Cl.:

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 5/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2017 E 20208962 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2022 EP 3821905**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que contienen insulina**

30 Prioridad:

16.12.2016 EP 16204688

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

07.12.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NORRMAN, MATHIAS;
HOSTRUP, SUSANNE;
STEENSGAARD, DORTE BJERRE;
STRAUSS, HOLGER MARTIN;
HANSEN, ROSA REBECCA ERRITZØE;
HAVELUND, SVEND;
SCHLEIN, MORTEN y
PEDERSEN, JESPER SØNDERGAARD**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 930 149 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

Composiciones farmacéuticas que contienen insulina

5 Campo técnico

La presente invención pertenece al campo de las composiciones farmacéuticas para el tratamiento de las afecciones médicas relacionadas con la diabetes. Más específicamente, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado acilado de acción prolongada de un análogo de insulina humana y semaglutida, y el uso médico de tales composiciones para la terapia de administración de insulina basal.

Antecedentes de la técnica

El objetivo principal de la terapia con insulina en el tratamiento de trastornos metabólicos es producir una glucemia sostenida casi normal mediante la sustitución o el suplemento de la secreción de insulina endógena de la manera más fisiológica posible, postprandialmente así como también entre las comidas y durante la noche. La separación de las necesidades de insulina basal y relacionada con las comidas (bolo) representa un enfoque sistemático para la terapia con insulina subcutánea.

Las características farmacológicas más relevantes de cualquier insulina dada (inicio de acción, perfil de efecto máximo, duración de acción, etcétera) están determinadas en gran medida por su cinética de absorción desde el sitio de la inyección subcutánea hacia la circulación sistémica.

La oligomerización no covalente mediada por zinc es una propiedad bien descrita de los productos de insulina. Bajo pH fisiológico, la insulina humana es soluble pero tiende a autoasociarse en hexámeros bien definidos (es decir, una unidad de seis moléculas de insulina), mediante la coordinación de dos iones de zinc (Zn^{++}) a sitios de unión de alta afinidad (B10His). También es bien conocido que los ligandos fenólicos, especialmente el fenol, se unen específicamente al hexámero de insulina y promueven la formación del hexámero en estado R. Después de la inyección, los ligandos fenólicos difunden rápidamente desde el sitio de la inyección. En ausencia de fenol en el sitio de la inyección, la conformación y el tamaño del oligómero de insulina pueden cambiar, así como también la viscosidad de la solución que contiene insulina, lo que contribuye a un perfil de acción prolongado.

Jonassen y otros, Pharm. Res. 2012 29 2104-2114 describen el mecanismo de prolongación de la insulina degludec, un derivado de la insulina con cadena de diácidos grasos acilados para administración una vez al día, y describen la correlación entre la concentración alta de zinc y la prolongación. El documento WO 2009/115469 describe varios derivados de insulina de acción prolongada con cadenas de diácidos grasos acilados. El documento WO 2013/153000 describe la formulación de aquellos derivados de insulina de acción prolongada para administración subcutánea, que contiene un alto nivel de zinc (no menos de 3,5 Zn^{++} /seis moles de derivados de la insulina). Se diseñó para obtener una duración prolongada de la acción acorde con un perfil de administración una vez a la semana. El alto contenido de Zn^{++} en las formulaciones descritas en el documento WO 2009/115469 conduce a un perfil de PK prolongado.

El documento WO 2009/063072 describe composiciones farmacéuticas para administración parenteral que comprenden un derivado de insulina basal (por ejemplo, degludec) y un derivado de GLP-1 (por ejemplo, liraglutida). Debido a que el monómero de liraglutida se une con zinc para formar un diheptmero, en la formulación combinada es necesario un nivel de zinc más alto que en la monoformulación de degludec, para lograr un perfil de PK comparable de degludec y lograr una estabilidad física aceptable.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se ha desarrollado una nueva formulación de semaglutida y los derivados de insulina de acción prolongada, que es capaz de promover un estado conformacional y un patrón de oligomerización más parecido al de la insulina humana, es decir, hexámeros, especialmente hexámeros R6.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende semaglutida y un derivado de insulina de acción prolongada seleccionado en una combinación única de excipientes formulada cuidadosamente para reducir la formación de oligómeros en el sitio de la inyección, mientras que aún muestra propiedades PK/PD adecuadas para una administración una vez a la semana.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica con una viscosidad reducida después de la inyección y, en consecuencia, una propensión reducida a crear molestias después de la inyección.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica con estabilidad mejorada.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para usar como un medicamento para el tratamiento de un trastorno metabólico.

Otros objetivos de la invención serán evidentes para el experto en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada y los ejemplos.

Descripción detallada de la invención

5

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

10 La semaglutida puede describirse por la estructura Aib8,Lys26(OEG-OEG-gamma-Glu-C18-diácido),Arg34)GLP-1 H(7-37)-OH, que también puede designarse como (N-épsilon26-[2-(2-[2-(2-[2-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino) butirilamino]etoxi} etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)-acetil][Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37), ver la descripción en el documento WO 2006/097537.

Actividad biológica

15 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas útiles como medicamentos para el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones metabólicas y, en particular, enfermedades, trastornos o afecciones relacionadas con la diabetes.

20 En una modalidad, la composición farmacéutica de la invención es para usar en el tratamiento o alivio de una enfermedad, trastorno o afección relacionados con la diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, dislipidemia, obesidad o síndrome metabólico (síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina).

25 En otra modalidad, la composición farmacéutica de la invención es para usar en el tratamiento o alivio de una enfermedad, trastorno o afección relacionados con la diabetes, y en particular, la diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2. La dosis real depende de la naturaleza y gravedad de la enfermedad que se trata y queda a criterio del médico y puede variarse mediante el ajuste de la dosis a las circunstancias particulares de esta invención para producir el efecto terapéutico deseado.

30 Breve descripción de los dibujos

La presente invención se ilustra adicionalmente con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

35 La Figura 1 muestra la oligomerización de las monoformulaciones A, B y C del Compuesto 1 en las condiciones del sitio de inyección simulado:

Figura 1A: Radio hidrodinámico promedio aparente (rH) [nm] medido por DLS;
 Figura 1B: Peso molecular medio aparente medido por CG-MALS;
 Figura 1C: Coeficiente de sedimentación promedio aparente (S) medido por AUC;
 40 Barras blancas: Compuesto 1, Formulación C con 2,2 Zn⁺⁺ por seis insulinas (mol:mol);
 Barras grises: Compuesto 1, Formulación B con 2,4 Zn⁺⁺ por seis insulinas (mol:mol);
 Barras negras: Compuesto 1, Formulación A que contiene 4,5 Zn⁺⁺ por seis insulinas (mol:mol);

45 La Figura 2 muestra la oligomerización de las monoformulaciones 01-06 del Compuesto 1 en las condiciones del sitio de inyección simulado:

Figura 2A: Radio hidrodinámico promedio aparente (Rh, prom) [nm] medido por DLS;
 Figura 2B: Coeficiente de sedimentación promedio aparente (S*) medido por AUC

50 La Figura 3 muestra la viscosidad dinámica aparente [cP] (Figura 3A y Figura 3C) y la viscosidad específica [ηspec] (Figura 3B, Figura 3D) de diferentes formulaciones intercambiadas con tampón del Compuesto 1 y tampón de fluido intersticial (ISF), como una función de la temperatura [°C];

Figura 3A y Figura 3B: Formulación A; Formulación B; Formulación C; Tampón ISF;
 55 Figura 3C y Figura 3D: Formulación 02; Formulación 03; Formulación 04; Tampón ISF;

La Figura 4 muestra el estado conformacional del Compuesto 1 en las formulaciones:

60 Figura 4A: CD de UV cercano [Δε251nm(M-1 cm-1)] que muestra cambios conformacionales (estado T; estado TR mixto; estado R) como una función de Zn⁺⁺ por seis insulinas (mol:mol) para las Formulaciones 01-06;
 Figura 4B: CD de UV cercano [Δε251nm (M-1 cm-1)] que muestra cambios conformacionales (estado T; estado TR mixto; estado R) como una función de Zn⁺⁺ por seis insulinas (mol:mol) para las Formulaciones B1-B6, D1-D7 y las formulaciones de insulina humana con varios niveles de zinc:

65 Círculos sin relleno: Insulina humana (600 nmol/ml de insulina humana, fenol 30 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4);
 Cuadros negros: Compuesto 1 formulado con fenol 25 mM, m-cresol 25 mM y NaCl 20 mM;

Círculos grises: Compuesto 1 formulado con fenol 60 mM, m-cresol 10 mM y NaCl 20 mM;

La Figura 5 muestra la distribución de oligómeros del Compuesto 1 en formulaciones por SEC:

5 La Figura 5A muestra el cromatograma SEC nativo de las Formulaciones 01, 02, 03, 04, 05 y 06;
La Figura 5B muestra el cromatograma SEC nativo de las formulaciones A y B1-B6;

La Figura 6 muestra los datos de dispersión SAXS [Intensidad (a.u.) frente a $s(\text{Å}^{-1})$] del Compuesto 1 e insulina humana en el estado formulado:

10 Figura 6A: Curvas de dispersión de la Formulación A del Compuesto 1 mostrada en negro y de la insulina humana mostrada en gris (Compuesto 1, 4,2 mM, 4,5 Zn/hexámero; insulina humana 0,6 mM, 2,2 Zn/hexámero);
Figura 6B: Curvas de dispersión de la Formulación C del Compuesto 1 mostrada en negro y de la insulina humana mostrada en gris (Compuesto 1, 4,2 mM, 2,2 Zn/hexámero; insulina humana 0,6 mM, 2,2 Zn/hexámero (R6-hexámero));

La Figura 7 muestra la pureza del Compuesto 1 en las formulaciones:

20 La Figura 7A muestra la pureza (% del péptido total) a 30 °C de almacenamiento [Punto de tiempo (mes)] para el Compuesto 1 Formulación A (línea negra), Formulación B (línea gris) y Formulación C (línea de puntos);
La Figura 7B muestra la pureza (% del péptido total) a 37 °C de almacenamiento [Punto de tiempo (semanas)] para el Compuesto 1 para las Formulaciones 01, 04, 05 y 06;
Círculos blancos: Formulación 01, círculos negros: Formulación 04, cuadrados blancos: Formulación 05, cuadrados negros: Formulación 06;

25 La Figura 8 muestra la pureza del Compuesto 1 (% del Compuesto 1 total) a 37 °C de almacenamiento [Punto de tiempo (semanas)] en las formulaciones combinadas con semaglutida:
Círculos blancos: Formulación I combinada, Círculos negros: Formulación II combinada, Triángulos blancos: Formulación III combinada, Triángulos negros: Formulación IV combinada, Cuadrados blancos: Formulación V combinada, Cuadrados negros: Formulación VI combinada;

La Figura 9 muestra la oligomerización de formulaciones combinadas en condiciones del sitio de inyección simulado:

35 Figura 9A: Radio hidrodinámico promedio aparente (rH) [nm] medido por DLS;
Figura 9B: muestra el tamaño de oligómero de las formulaciones combinadas después del intercambio de tampón como se observa por AUC (S*).

Ejemplos

40 La invención se ilustra adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la invención reivindicada.

Ejemplo 1

45 Propiedades biofísicas mejoradas en condiciones del sitio de inyección simulado

Las modalidades en el Ejemplo 1 no están cubiertas por la invención reivindicada.

Protocolo

50 El API de las formulaciones es insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-Eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil)), desB30 (Compuesto 1), que se obtiene como se describe en, por ejemplo, el documento WO 2009/115469, ver el Ejemplo 33.

55 La oligomerización del Compuesto 1 se determinó en las condiciones del sitio de inyección simulado. Las condiciones del sitio de inyección simulado se lograron mediante el agotamiento de fenol y/o metacresol, respectivamente, y el intercambio de tampón en tampón de fluido intersticial simulado. Este procedimiento eliminó virtualmente todos los ligandos fenólicos pero mantuvo la relación zinc/insulina de la formulación original.

60 Las formulaciones se intercambian con tampón en tampón de fluido intersticial (ISF-) a través de la columna PD-MidiTrap G-25 de acuerdo con el protocolo del fabricante.

65 Las columnas se equilibran con el tampón diana mediante el lavado de la columna con un volumen suficiente de tampón diana, y la formulación se aplica en un volumen adecuado y se eluye con tampón diana. El tampón ISF consiste en NaCl 140 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4.

A menos que se indique de cualquier otra manera, el procedimiento fue el siguiente:

Intercambio de tampón a 22 °C;

Incubación posterior a 37 °C durante 14-18 horas; y

Medición posterior a 22 °C (a menos que se indique de cualquier otra manera).

5 Típicamente, las mediciones se realizaron aproximadamente 1 h después de la terminación de la incubación a 37 °C. Si esto no es posible, las muestras se almacenan a 22 °C hasta la medición.

10 A menos que se indique de cualquier otra manera, las muestras se miden sin diluir. Debe notarse que el tamaño del oligómero resultante del procedimiento de agotamiento de fenol descrito depende del proceso y, para una formulación dada, puede variar con factores tales como el tiempo, la temperatura y el lote de la columna. Por lo tanto, es conveniente que las mediciones para un conjunto dado de formulaciones se comparen dentro del mismo experimento y no entre experimentos. Por lo tanto, para la misma formulación de referencia se evaluó junto con varias formulaciones de la invención en diferentes experimentos. Por ejemplo, la Formulación A frente a la Formulación B y C; la Formulación 01 frente a la Formulaciones 02-06.

15 El radio hidrodinámico promedio aparente (r_H) se midió por Dispersión Dinámica de la Luz (DLS), mediante el uso de un DynaPro PR™ (Wyatt technology, Santa Bárbara, CA, EE. UU.). Antes del análisis, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm para eliminar las partículas de polvo de la solución. Las mediciones se realizaron a 25 °C mediante el uso de 40 adquisiciones y un tiempo de adquisición de 2 segundos.

20 El peso molecular promedio aparente (kDa) se midió por dispersión de luz estática de múltiples ángulos y gradiente de composición (CG-MALS) mediante el uso de un sistema que consiste de una unidad de valoración Calypso II de Wyatt Technology Corporation (WTC) acoplada a un detector de dispersión de luz WTC DAWN8+ (en funcionamiento a 664 nm) y un refractómetro WTC Optilab T-rEX (que funciona a 660 nm) a 25 °C. Las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm seguido de un filtro de 0,22 µm antes de la medición.

25 Los experimentos de velocidad de sedimentación (SV) se realizaron con una ultracentrífuga analítica XL-I (BeckmanCoulter, Brea, CA) en centros de mesa de doble sector de 12 mm o 3 mm cubiertos con ventanas de zafiro. Las muestras se centrifugaron a 40 000 rpm y 20 °C hasta que se completó la sedimentación y se controló con la óptica de interferencia del instrumento. Las distribuciones del coeficiente de sedimentación (SCD) se calcularon con SedFit, versión 11.8 (www.analyticalultracentrifugation.com) mediante el uso del modelo c(s) con una cuadrícula de valores de 100 s en un rango suficiente para describir todo el material sedimentado, a juzgar por el rmsd y el patrón de ejecución residual. La relación de fricción f/f_0 se trató como una variable a optimizar durante el ajuste (P Schuck, MA Perugini, NR Gonzales, GJ Howlett and D Schubert: Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems; (Biophys. J. 2002 82:1096). Los valores medios del coeficiente de sedimentación se obtuvieron mediante la integración de las distribuciones c(s) resultantes.

30 Las viscosidades dinámicas dependientes de la temperatura se midieron con un viscosímetro de tipo bola rodante Lovis2000 (Anton Paar, Graz, Austria). La temperatura se redujo de 40 °C a 4 °C en etapas de 2 °C, permitiendo 5 minutos de equilibrio de temperatura entre las etapas. La densidad del tampón se midió simultáneamente con un densitómetro DMA5000, también de Anton Paar.

35 Se prepararon tres monoformulaciones, es decir, la Formulación A representativa de la técnica anterior (ver, por ejemplo, el documento WO 2013/153000) y las Formulaciones B, C (fenol 60 mM/m-cresol 10 mM).

Tabla 1A: Monoformulaciones comparativas A, B y C

Ingrediente	Formulación A Representativa de la técnica anterior	Formulación B*	Formulación C*
Compuesto 1	4200 nmol/ml (4,2 mM)	4200 nmol/ml (4,2 mM)	4200 nmol/ml (4,2 mM)
Zinc (como acetato de zinc)	206 µg/ml (~4,5 Zn ⁺⁺ /hexámero)	110 µg/ml (~2,4 Zn ⁺⁺ /hexámero)	101 µg/ml (~2,2 Zn ⁺⁺ /hexámero)
Glicerol	16 mg/ml (1,6 %)	15 mg/ml (1,5 %)	15 mg/ml (1,5 %)
Fenol	2,35 mg/ml (25 mM)	5,65 mg/ml (60 mM)	5,65 mg/ml (60 mM)
Metacresol	2,70 mg/ml (25 mM)	1,08 mg/ml (10 mM)	1,08 mg/ml (10 mM)
Cloruro de sodio	1,17 mg/ml (20 mM)	1,17 mg/ml (20 mM)	1,17 mg/ml (20 mM)
pH	7,4	7,4	7,4

*Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada

40 Se prepararon otras seis monoformulaciones, es decir, la Formulación 01 (igual que la Formulación A) y las Formulaciones 02, 03, 04, 05 y 06 (Tabla 1B). El contenido de zinc se ha variado de 4,5 Zn⁺⁺/seis insulinas a 2,4, 2,2

y 2,0 Zn⁺⁺/seis insulinas. Además, se han evaluados sistemas conservantes de fenol/m-cresol 25/25 mM o fenol/m-cresol 60/0 mM.

Tabla 1B: Formulaciones comparativas

Ingrediente	Formulación					
	01*	02**	03**	04**	05**	06**
Compuesto 1(mM)	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
Zn(acetato)2 (µg/ml)	206	206	101	101	110	92
n Zn/6 insulinas (mol/mol)	~4,5	~4,5	~2,2	~2,2	~2,4	~2,0
Fenol	25 mM	60 mM	25 mM	60 mM	60 mM	60 mM
m-cresol	25 mM	0	25 mM	0	0	0
glicerol	1,6 %	1,5 %	1,6 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %
Vehículo (todas las formulaciones)	NaCl 20 mM pH 7,4					
*Igual que la formulación A						
**Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada						

Tamaño de oligómero mejorado de monoformulaciones intercambiadas con tampón que tienen fenol 60 mM y m-cresol 10 (Tabla 2A; Figura, 1A, 1B y 1C)

Tabla 2A: Tamaño del oligómero en el sitio de inyección simulado

	A	B	C
Rh(prom) [nm]	37,31	9,21	8,37
S*(prom) [S]	17,32	10,53	9,41
Mw (prom) [kDa]	1059,8	190,5	184,7

Tamaño de oligómero mejorado de monoformulaciones intercambiadas con tampón que tienen fenol 60 mM y m-cresol 0 (Tabla 2B; Figuras 2A y 2B)

Tabla 2B Tamaño del oligómero en el sitio de inyección simulado

	01	02	03	04	05	06
Rh(prom) [nm]	19,42	14,20	5,83	4,51	5,20	3,98
S*(prom) [S]	8,46	11,00	5,39	4,78	5,33	4,32

Conclusión

El contenido de zinc se redujo de 4,5 Zn⁺⁺/seis insulinas en la Formulación A a 2,4 y 2,2 Zn⁺⁺/seis insulinas en las formulaciones B y C (con aumento de fenol y disminución de metacresol), respectivamente. Esta disminución de zinc se acompañó por una reducción del tamaño del oligómero (ver Figuras 1A, 1B y 1C) como se determinó en las condiciones del sitio de inyección simulado por el método descrito anteriormente.

Los resultados de la formulación 01-06 confirman, además, que el tamaño del oligómero se reduce cuando el Zn se reduce de 4,5 Zn⁺⁺/seis insulinas a 2,2 ± 0,2 Zn⁺⁺/seis insulinas. Para 2,2 ± 0,2 Zn⁺⁺/seis insulinas, el tamaño del oligómero se reduce aún más cuando el fenol/cresol se reduce de 25 mM/25 mM a 60 mM / 0 mM. Ver las Figuras 2A y 2B.

Viscosidad mejorada de monoformulaciones intercambiadas con tampón que tienen fenol 60 mM y m-cresol 10 mM (ver Tabla 3A; Figuras 3A y 3B)

Tabla 3A: Viscosidad de las Formulaciones A, B, C intercambiadas con tampón

	Viscosidad dinámica (cP)				Viscosidad específica		
	Formulación				Formulación		
temp (C)	A	B	C	Tampón ISF	A	B	C
40	1,194	0,633	0,628	0,605	0,97355	0,04628	0,03802
38	1,359	0,659	0,653	0,627	1,16746	0,05104	0,04147

ES 2 930 149 T3

36	1,548	0,687	0,68	0,651	1,37788	0,0553	0,04455
34	1,758	0,718	0,709	0,677	1,59675	0,06056	0,04727
32	1,989	0,751	0,74	0,704	1,82528	0,06676	0,05114
30	2,237	0,787	0,773	0,733	2,05184	0,07367	0,05457
28	2,506	0,825	0,809	0,765	2,27582	0,07843	0,05752
26	2,792	0,866	0,847	0,798	2,49875	0,08521	0,0614
24	3,098	0,91	0,889	0,835	2,71018	0,08982	0,06467
22	3,409	0,958	0,934	0,874	2,90046	0,09611	0,06865
20	3,729	1,01	0,982	0,916	3,07096	0,10262	0,07205
18	4,051	1,066	1,035	0,962	3,21102	0,10811	0,07588
16	4,321	1,126	1,092	1,012	3,26976	0,11265	0,07905
14	4,597	1,191	1,153	1,066	3,31238	0,11726	0,08161
12	4,865	1,262	1,22	1,125	3,32444	0,12178	0,08444
10	5,131	1,338	1,293	1,19	3,31176	0,12437	0,08655
8	5,369	1,421	1,372	1,26	3,26111	0,12778	0,08889
6	5,593	1,514	1,458	1,338	3,18012	0,13154	0,08969
4	5,795	1,612	1,556	1,424	3,06952	0,13202	0,0927

Viscosidad mejorada de monoformulaciones intercambiadas con tampón que tienen fenol 60 mM y m-cresol 0 (ver Tabla 3B; Figura 3C y 3D)

Tabla 3B: Viscosidad de las Formulaciones 02, 03 y 04 intercambiadas con tampón

	Viscosidad dinámica (cP)				Viscosidad específica		
	Formulación				Formulación		
	ISF	_02	_03	_04	_02	_03	_04
3,99	1,5447	2,7441	1,9996	1,6278	0,77646	0,29449	0,0538
6	1,4513	2,5087	1,8529	1,5296	0,72859	0,27672	0,05395
8	1,3668	2,3492	1,7355	1,4414	0,71876	0,26975	0,05458
10	1,2917	2,2389	1,6335	1,3615	0,7333	0,26461	0,05404
12	1,2209	2,1624	1,5448	1,2894	0,77115	0,2653	0,05611
14	1,1555	2,1078	1,4678	1,2215	0,82415	0,27027	0,05712
16	1,095	2,06	1,4063	1,1575	0,88128	0,28429	0,05708
18	1,04	2,0041	1,3516	1,0984	0,92702	0,29962	0,05615
20	0,9893	1,927	1,3014	1,043	0,94784	0,31548	0,05428
22	0,9423	1,8351	1,247	0,9916	0,94747	0,32336	0,05232
24	0,8991	1,7221	1,1941	0,9447	0,91536	0,32811	0,05072
26	0,8588	1,597	1,1404	0,9003	0,85957	0,3279	0,04832
28	0,8216	1,4748	1,085	0,8594	0,79503	0,32059	0,04601
30	0,7869	1,3608	1,0249	0,8219	0,72932	0,30245	0,04448
32	0,7544	1,2594	0,9713	0,7867	0,66941	0,28751	0,04282
34	0,7239	1,1654	0,9215	0,754	0,60989	0,27297	0,04158
36	0,7004	1,0795	0,8749	0,7236	0,54126	0,24914	0,03312
38	0,6951	1,0027	0,8321	0,6948	0,44253	0,19709	-4,32E-04
40	0,7107	0,9345	0,7927	0,6682	0,3149	0,11538	-0,0598

Conclusión

Estos experimentos muestran que la viscosidad de la formulación en las condiciones del sitio de inyección simulado de acuerdo con este método depende en gran medida del contenido de zinc, de manera que la disminución de la proporción de zinc conduce a una viscosidad más baja.

Ejemplo 2

$t_{\text{máx}}$ y $t_{1/2}$ de eliminación

Las modalidades en el Ejemplo 2 no están cubiertas por la invención reivindicada.

$t_{m\acute{a}x}$ representa el tiempo hasta la concentración máxima (exposición plasmática máxima), y $t_{1/2}$ representa la vida media de eliminación en la que la mitad del compuesto desaparece del plasma después de la administración.

Las propiedades biofísicas alteradas descritas en el Ejemplo 1 son consistentes con un perfil de PK que exhibe anteriormente $t_{m\acute{a}x}$ en cerdos (ver Tabla 3). Esto indica que el tiempo de residencia del Compuesto 1 en la subcutis se reduce cuando se formula de acuerdo con la invención, y en contraste con el mismo compuesto que se proporciona en una formulación de acuerdo con la técnica anterior.

Sorprendentemente, el nivel reducido de zinc casi no tiene ningún impacto en la duración de la acción (es decir, el $t_{1/2}$ de eliminación no se ve afectado), lo que hace que la formulación de acuerdo con la invención y la formulación del estado de la técnica anterior sean igualmente adecuadas para la administración una vez a la semana.

Tabla 4

Formulación	Especies	$t_{m\acute{a}x}$ (horas)	$t_{1/2}$ (horas)
Compuesto 1, Formulación A*	Cerdo	20	47
4,5 zinc/hexámero, fenol 25 mM, m-cresol 25 mM	Humano	42	185
Compuesto 1, Formulación C*	Cerdo	8	45
2,2 zinc/hexámero, fenol 60 mM, m-cresol 10 mM, NaCl 20 mM			
*Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada			

Conclusión

Estos experimentos muestran que el tiempo de residencia en el subcutis ($t_{m\acute{a}x}$) del Compuesto 1 se redujo significativamente como resultado de la reducción de Zn⁺⁺/hexámero. La observación es consistente con los datos presentados en el Ejemplo 1, que muestran una reducción de el tamaño de los oligómeros formados en las condiciones del sitio de inyección simulado.

Por lo tanto, cuando se formula de acuerdo con la invención, el Compuesto 1 forma oligómeros más pequeños en el sitio de la inyección, lo que resulta en un perfil de PK/PD con un tiempo de residencia más corto en el subcutis ($t_{m\acute{a}x}$ disminuido).

Pero sorprendentemente, aunque el tiempo de residencia en el subcutis ($t_{m\acute{a}x}$) del Compuesto 1 se redujo significativamente, las formaciones de la invención mantuvieron la misma vida media de eliminación (eliminación $t_{1/2}$ no se afecta). Esto significa que las formulaciones podrían facilitar que los derivados de insulina de acción prolongada alcancen más rápidamente la concentración máxima en circulación, mientras que aún mantienen la concentración máxima con una duración más larga.

Este hallazgo inesperado también hace posible limitar la formación de oligómeros grandes en el sitio de la inyección, al tiempo que se conserva una acción de larga duración acorde con un perfil de administración una vez a la semana. La formación de oligómeros grandes con alta viscosidad en el sitio de la inyección puede generar molestias durante la inyección.

Ejemplo 3

Estado conformacional mejorado en la formulación

Las modalidades en el Ejemplo 3 no están cubiertas por la invención reivindicada.

Con presencia de zinc, la insulina humana existe como hexámeros en la formulación. Los hexámeros de insulina humana pueden adoptar dos estados conformacionales diferentes en dependencia de la conformación de los monómeros. Los ocho residuos de aminoácidos N-terminales de la cadena B del monómero de insulina pueden estar en una conformación extendida (estado T) o en una conformación α -helicoidal (estado R). En presencia de fenol y NaCl, la insulina humana adopta la conformación R, que es la conformación favorable con respecto a la estabilidad física y química (Dunn MF. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer: A review. Biometals 2005; 18; 295-303).

Protocolo

Los cambios conformacionales del hexámero de insulina se siguieron por la firma de CD de 251 nm (Krüger P, Gilge G, Cabuk Y and Wollmer A; Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1990 371 669-673). Las muestras se midieron mediante el uso de un instrumento Jasco 815 y una longitud de trayectoria de 0,02 cm. Se restaron las valoraciones en blanco y se representó gráficamente el $\Delta\epsilon$ 251nm resultante frente a Zn/6Ins (mol/mol).

Estado de conformación de monoformulaciones que tienen fenol 60 mM/m-cresol 0

El estado conformacional de las Formulaciones 01-06 se muestra en la Tabla 5A y en la Figura 4A.

5 Tabla 5A: Propensión al estado conformacional en la formulación 01-06 con fenol 60 mM/m-cresol 0

Formulación	01	02	03	04	05	06
Propensión al estado R $\Delta\epsilon$ (M-1cm-1) @251 nm	-6,15	-6,65	-7,63	-8,12	-7,98	-8,19

La Figura 4A muestra los cambios conformacionales (estado T; estado TR mixto; estado R) en función de Zn⁺⁺ por seis insulinas (mol:mol) para las formulaciones 01-06.

15 Estado conformacional de monoformulaciones que tienen fenol 60 mM y m-cresol 10 mM

Se prepararon dos series de formulaciones. Todas las formulaciones comprendían 4,2 mM del Compuesto 1, glicerol 16 mg/ml (1,6 %), NaCl 20 mM, con un pH de 7,4. Las formulaciones de la Serie B comprendían fenol 60 mM y m-cresol 10 mM, con niveles de zinc variados como 1,5 (B1), 2,0 (B2), 2,3 (B3), 2,5 (B4), 3,0 (B5) y 4,0 (B6) por 6 insulinas. La serie D comprendía fenol 25 mM y m-cresol 25 mM, con niveles de zinc variados como 1,5, 2,0, 2,3, 2,5, 3,0, 4,0 y 4,5 por 6 insulinas. También se prepararon una serie de formulaciones de insulina humana, con varios niveles de zinc. El estado conformacional se muestra en la Tabla 5B y en la Figura 4B.

25 Tabla 5B Propensión al estado conformacional en las formulaciones B1-B6 con fenol 60 mM y m-cresol 10, y formulaciones D1-D7 con fenol 25 mM y m-cresol 25

Propensión al estado R $\Delta\epsilon$ (M-1cm-1) @251 nm	Serie B**	Serie D**
Zn/6Ins	60/10 fen/cre	25/25 fen/cre
*1,5	-6,83 (B1)	-6,58 (D1)
2,0	-7,67 (B2)	-7,06 (D2)
2,3	-7,42 (B3)	-6,88 (D3)
2,5	-7,23 (B4)	-6,67 (D4)
3,0	-7,54 (B5)	-6,45 (D5)
35 4,0	-6,72 (B6)	-5,58 (D6)
4,5	n.a.	-5,03 (D7)
* No incluido en la Figura 4B		
**Estas modalidades no están cubiertas por la invención reivindicada		

40 La Figura 4B muestra cambios conformacionales (estado T; estado TR mixto; estado R) en función de Zn⁺⁺ por seis insulinas (mol:mol) para formulaciones de la Serie B y Serie D, y formulaciones de insulina humana.

Conclusión

45 Los datos de CD de UV cercano muestran que la conformación T/R del Compuesto 1 depende de la concentración de zinc. Una disminución de zinc se acompañó por un cambio en el estado conformacional del Compuesto 1 en la formulación de un estado T/R mixto al estado R, que también se acompañó por un nivel más alto de hexámero formado en las formulaciones (ver Ejemplo 4 más abajo). El estado R y el nivel de hexámero se mejoraron aún más mediante un cambio en la relación fenol/metacresol de 25/25 mM a 60/10 mM (Figura 4B).

50 Los datos de las formulaciones 01-06 muestran que el estado R del Compuesto 1 en las formulaciones se enriquece aún más mediante la disminución del Zn de 4,5 a 2,2 Zn \pm 0,2Zn /6 del Compuesto 1 y mediante la omisión del m-cresol (Figura 4A).

55 Ejemplo 4

Distribución de oligómeros mejorada en la formulación

Las modalidades en el Ejemplo 4 no están cubiertas por la invención reivindicada.

60 Protocolo

La cromatografía de exclusión por tamaño es un método sensible para cuantificar la distribución de oligómeros no covalentes de las formulaciones de insulina. La SEC se realizó mediante el uso de una columna BEH200, 1,7 μ m 4,6 x 150 mm con un tampón de funcionamiento que consiste en fenol 8,0 mM, NaCl 140 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. La cromatografía se realizó a 22 C mediante el uso de un volumen de inyección de 2 μ l y un flujo de 0,3 ml/min. Como

patrones de peso molecular se usaron albúmina, un hexámero de insulina covalente y una insulina monomérica. Los cromatogramas se analizaron mediante integración para representar especies más grandes que el hexámero (3,0-3,8 min), hexámero (3,8-4,3 min) y especies más pequeñas que el hexámero (4,3-5,5 min). Tenga en cuenta que los límites de integración exactos para cada conjunto de datos variarán ligeramente debido a las variaciones en el rendimiento de la columna.

Los datos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) se recolectaron mediante el uso de un instrumento BioSAXS-2000 equipado con una celda de flujo y un detector Dectris 100K que cubre un rango q de 0,008-0,661 Å⁻¹. Las medidas del tampón se restaron de las medidas de la muestra para obtener los perfiles de dispersión de proteínas. Se recolectaron datos de una muestra de referencia de insulina humana en estado hexamérico con conformación R de acuerdo con el mismo procedimiento, de una muestra de insulina humana 0,6 mM, 3 Zn⁺⁺/seis insulinas, fenol 16 mM, NaCl 20 mM y tampón fosfato 7 mM pH 7,4.

Distribución de oligómeros para formulaciones que comprenden fenol 60 mM y m-cresol 0

Se generó un cromatograma SEC nativo que compara las formulaciones 01, 02, 03, 04, 05 y 06 (ver Tabla 6 y Figura 5A).

Tabla 6: Distribución de especies obtenida por SEC nativo mediante integración de cromatogramas

	Asignación pico	Formulación					
		01*	02*	03*	04*	05*	06*
		% de especies en la formulación					
(3,0-3,8 min)	Más grande que el hexámero	8,8	9,4	1,1	0,6	0,7	0,2
(3,8-4,3 min)	Hexámero	34,5	48,9	95,1	98,1	95,9	98,9
(4,3-5,5 min)	más pequeño que el hexámero	56,8	41,7	3,8	1,3	3,5	0,9
*Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada							

Distribución de oligómeros para formulaciones que comprenden fenol 60 mM y m-cresol 10 mM

Se generó un cromatograma SEC nativo que compara las formulaciones B1-B6 y la formulación A (ver Tabla 6 y Figura 5B). El área bajo la curva es similar para todos los cromatogramas. Los cromatogramas se analizaron mediante integración para representar especies más grandes que el hexámero (3,0-3,8 min), hexámero (3,8-4,3 min) y especies más pequeñas que el hexámero (4,3-5,5 min). Tenga en cuenta que los límites de integración exactos para cada conjunto de datos variarán ligeramente debido a las variaciones en el rendimiento de la columna.

Tabla 7: Distribución de oligómeros por SEC

Asignación pico	Formulación						
	B1*	B2*	B3*	B4*	B5*	B6*	A
	% de especies en la formulación						
Más grande que el hexámero	0,2	0,5	0,8	0,7	2,2	4,9	18,2
Hexámero	80,3	94,8	86,7	82,1	65,5	41,8	22,0
más pequeño que el hexámero	19,5	4,8	12,5	17,2	32,3	53,3	59,8
*Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada							

Conclusión

Los datos de SEC de las Formulaciones 01-06 (Tabla 6, Figura 5A) muestran que la distribución de oligómeros de la Formulación 01 del Compuesto 1 se caracteriza por bandas anchas sin especies de oligómeros dominantes claras. La distribución de oligómeros del Compuesto 1 en las Formulaciones 03-06 es más estrecha en comparación con las Formulaciones 01 y 02. El tiempo de retención del pico principal de las Formulaciones 03-06 es consistente con un hexámero y el pico pequeño con un tiempo de retención de 5 minutos es consistente con un monómero o dímero.

Los datos de SEC de las Formulaciones B1-B6 y A (Tabla 7, Figura 5B) también muestran que con 2,0-2,5 zinc/6 insulinas, el pico de hexámero está enriquecido, en comparación con 4,0 o 4,5 Zn.

Por lo tanto, el pico de hexámero se enriquece con un bajo contenido de zinc (por ejemplo, 2,0 Zn a 2,5 Zn) en comparación con un alto contenido de zinc (por ejemplo, 4,0 o 4,5 Zn). Tanto para 4,5 Zn como para 2,2 Zn, el hexámero se enriquece en fenol/m-cresol 60 mM/0 o 10 mM en relación con fenol/m-cresol 25/25 mM. Cuando se formula de acuerdo con la invención, el contenido de hexámero aumenta y la oligomerización se vuelve más definida.

Los datos de SAXS también confirman que el patrón de oligomerización de la Formulación A del Compuesto 1 con 4,5 Zn⁺⁺/hexámero no se parece al hexámero de insulina humana clásico mientras que una estructura basada en

hexámero del Compuesto 1 es dominante en la Formulación C (Figura 6). Cuando se formula de acuerdo con la invención (Formulación C), el patrón de oligomerización se vuelve más bien definido y consistente con una estructura basada en hexámeros similar a la insulina humana.

5 Ejemplo 5

Estabilidad química y estabilidad física mejorada

Las modalidades en el Ejemplo 5 no están cubiertas por la invención reivindicada.

10 Los resultados experimentales en este ejemplo mostraron que tanto la estabilidad química como la estabilidad física del Compuesto 1 de las nuevas formulaciones se mejoran en comparación con la Formulación A de referencia. En particular, con un alto nivel de fenol y un bajo nivel de m-cresol, tanto la estabilidad química como la estabilidad física del Compuesto 1 aumentan cuando disminuye la concentración de zinc.

15 Protocolo

La pureza se determinó mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución en fase reversa (RP-UHPLC) donde las muestras se analizaron mediante el uso de una columna Acquity CSH Fluoro Phenyl, 130Å, 1,7 µm, 2,1x150mm, gradiente de elución por acetonitrilo en una fase móvil de acetonitrilo y fosfórico tampón en agua con posterior detección UV (215 nm) bajo un flujo de 0,30 ml/min con un volumen de inyección de muestra de 2-3 µl. La pureza se evaluó como el área del pico principal dividida por el área de todos los picos x 100 %.

25 Estabilidad química de la formulación del Compuesto 1 con fenol 60 mM y m-cresol 10 mM

La estabilidad medida como % de pureza del péptido total con RP-UHPLC muestra una estabilidad significativamente aumentada del Compuesto 1 en la Formulación B y la Formulación C, que comprendía Fenol 60 mM y m-cresol 10 mM, en comparación con la Formulación A del Compuesto 1, que comprendía Fenol 25 mM y m-cresol 25 mM. Ver Tabla 8 y la Figura 7A.

30 Tabla 8: % de pureza del Compuesto 1

Formulación	Tiempo de almacenamiento a 30 °C (meses)			
	0	1	2	3
A	95,4	93,8	93,3	91,3
B	95,3	94,3	95,0	94,3
C	95,7	94,7	95,0	94,6

40 Estabilidad química de Formulaciones del Compuesto 1 con fenol 60 mM y cresol 0 m

La estabilidad de las formulaciones presentadas en la Tabla 9 medida como % de pureza del péptido total con RP-UHPLC confirma, además, que la estabilidad química del Compuesto 1 aumenta en función de la concentración de zinc en formulaciones con un nivel relativamente alto de fenol y un nivel bajo de m-cresol. Los resultados muestran una mayor estabilidad del Compuesto 1 cuando el zinc se redujo de 4,5 Zn⁺⁺/seis insulinas a 2,4, 2,2 y 2,0 Zn⁺⁺/seis insulinas en formulaciones con un cambio en el sistema conservante de fenol/m-cresol 25/25 mM a fenol 60 mM y m-cresol 0. Ver la Tabla 9 y la Figura 7B.

50 Tabla 9: % de pureza del Compuesto 1

Formulación	Tiempo de almacenamiento a 37 °C (semanas)			
	0	2	4	6
01	97,5	96,1	94,3	92,8
04	97,4	96,7	96,0	95,3
05	97,6	96,7	96,0	95,3
06	97,3	96,7	96,0	95,2

60 Conclusión

Cuando se formula de acuerdo con la invención (ver Formulaciones B, C, 04, 05 y 06; Tablas 8 y 9, y Figura 7A y Figura 7B) la estabilidad química aumenta en comparación con la técnica anterior (Formulaciones A y Formulación 01).

Estabilidad física

65 Protocolo:

Las formulaciones del Compuesto 1 se evaluaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos con 4 réplicas de 200 µl. A 1,0 ml de cada formulación, se añadió ThT (tioflavina T) a 1 µM. El ensayo de tioflavina T (ThT) para determinar la propensión a formar fibrillas amiloides se realizó en Thermo Fluoroskan, agitación de 960 rpm, 37°C, durante 45 horas. La emisión de ThT se escaneó antes y después del ensayo. El tiempo de espera hasta el inicio de la emisión de fluorescencia de ThT es una medida de la estabilidad física. Los tiempos de retardo se determinaron a partir de curvas de fluorescencia promediadas sobre 4 réplicas. Un retardo más largo es indicativo de una mayor estabilidad física.

Cabe señalar que los resultados de ThT obtenidos del protocolo descrito pueden variar entre experimentos. Por lo tanto, es conveniente que las mediciones para un conjunto dado de formulaciones se comparen dentro del mismo experimento y no entre experimentos. En este ejemplo, se evaluó la misma formulación de referencia junto con varias formulaciones de la invención en diferentes experimentos. Por ejemplo, Formulación A frente a Formulación C; Formulación 01 vs. Formulaciones 04-06.

Los tiempos de espera se muestran en la Tabla 10 más abajo. Formulación A o Formulación 01 como formulación de referencia para la comparación.

Los resultados se muestran en la Tabla 10A y en la Tabla 10B.

Estabilidad física del Compuesto 1 en formulaciones con fenol 60 mM y cresol 10 m

Tabla 10A: Tiempos de retardo Tht (1)

	Formulación C	Formulación A
Tiempo de retardo (horas)	11,3	10,0

Tabla 10B: Tiempos de retardo Tht (2)

	01	04	05	06
Tiempo de retardo (horas)	9,7	29,3	13,3	>45

Conclusión

Los tiempos de retardo que se obtienen en el ensayo ThT indican que la estabilidad física del Compuesto 1 mejora en las formulaciones con bajo nivel de zinc, alto nivel de fenol y bajo nivel de m-cresol. Los datos mostraron que cuando se reduce el zinc de 4,5Zn/6Ins a 2,2 ± 0,2Zn/6Ins y el aumento concomitante de fenol de 25 mM a 60 mM y la disminución de m-cresol de 25 mM a 10 mM conducen a un tiempo de retardo más largo y, por lo tanto, mejoran la estabilidad física. Con la eliminación del m-cresol, la estabilidad física del Compuesto 1 mejoró aún más en las formulaciones con bajo nivel de zinc (ver Tabla 10B).

Ejemplo 6

Formulaciones combinadas y estabilidad química y física de estas

El compuesto 1 puede formularse conjuntamente con el análogo de GLP-1 semaglutida una vez a la semana para una combinación de relación fija.

Se prepararon las siguientes formulaciones combinadas 1 a 6 del Compuesto 1 y semaglutida. La monoformulación del Compuesto 1 también se preparó como referencia 1 de monoformulación. Los valores objetivo previstos se muestran en la Tabla 11, más abajo.

Tabla 11: Formulaciones combinadas del Compuesto 1 y semaglutida

	Mono Referencia 1*	Combo 1	Combo 2	Combo 3	Combo 4	Combo 5	Combo 6
Compuesto 1 (mM)	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
Semaglutida (mM)/(mg/ml)	n.a.	0,49/2,0	0,4/1,6	0,6/2,4	0,3/1,25	0,49/2,0	0,49/2,0
Zn(acetato) ₂ (mM)	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54	1,4	1,75
n Zn/6 insulinas	~2,2	~2,2	~2,2	~2,2	~2,2	~2,0	~2,5

(continuación)

	Mono Referencia 1*	Combo 1	Combo 2	Combo 3	Combo 4	Combo 5	Combo 6
5 Vehículo (todas las formulaciones)	fenol 60 mM M-cresol 10 mM glicerol 1,5 % NaCl 20 mM pH 7,4						
*Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada							

Las concentraciones del Compuesto 1 y semaglutida en las formulaciones producidas se midieron mediante el uso de RP-HPLC y materiales de referencia. Estas concentraciones se indican en la Tabla 12A y 12B, más abajo.

Tabla 12A: Concentraciones medidas del Compuesto 1 y semaglutida

	Mono Referencia-1*	Combo 1	Combo 2	Combo 3	Combo 4
20 Compuesto 1 (mM) Medido	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
Semaglutida (mM) Medido	n.a.	0,5	0,4	0,6	0,3
*Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada					

Tabla 12B: Concentraciones medidas del Compuesto 1 y semaglutida (un lote separado de la Tabla 12A)

	Mono referencia-1*	Combo 5	Combo 6
30 Compuesto 1 (mM) Medido	4,2	4,3	4,3
Semaglutida (mM) Medido	n.a.	0,49	0,49
*Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada			

Por lo tanto, las concentraciones medidas se desviaron menos del 3 % de los valores objetivo previstos.

Las siguientes formulaciones combinadas I-VI del Compuesto 1 y semaglutida también se prepararon posteriormente. La monoformulación del Compuesto 1 se preparó como referencia 2 de monoformulación. Los valores objetivo previstos se muestran en la Tabla 13, más abajo.

Tabla 13

	Mono Referencia 2*	Combo I	Combo II	Combo III	Combo IV	Combo V	Combo VI
40 Compuesto 1 (mM)	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
45 Semaglutida (mM)/(mg/ml)	n.a.	0,49/2,0	0,49/2,0	0,3/1,25	0,49/2,0	0,49/2,0	0,3/1,25
Zn(acetato)2 (µg/ml)	101	206	101	101	101	110	110
n Zn/6 insulinas	~2,2	~4,5	~2,2	~2,2	~2,2	~2,4	~2,4
50 Fenol	60 mM	25 mM	60 mM	60 mM	25 mM	60 mM	60 mM
m-cresol	0	25 mM	0	0	25 mM	0	0
55 Vehículo (todas las formulaciones)	glicerol 1,5 % NaCl 20 mM pH 7,4						
*Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada							

Estabilidad física

60 Protocolo:

Las formulaciones se evaluaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos con 8 réplicas de 200 µl. A 1,0 ml de cada formulación, se añadió ThT (tioflavina T) a 1 µM. El ensayo de tioflavina T (ThT) para determinar la propensión a formar fibrillas amiloides se realizó en Thermo Fluoroskan, agitación de 960 rpm, 37°C, durante 45 horas. La emisión de ThT se escaneó antes y después del ensayo. El tiempo de retardo hasta el inicio de la emisión de fluorescencia ThT (formación de fibrillas amiloides) es una medida de la estabilidad física. Los tiempos de retardo se determinaron

a partir de curvas de fluorescencia promediadas sobre 8 réplicas. Los tiempos de retardo se evaluaron dos veces para las formulaciones combinadas 1-4 y las formulaciones combinadas 5 y 6, respectivamente; y cada uno con una monoformulación evaluada como una referencia, para hacer los resultados comparables. Un retardo más largo es indicativo de una mayor estabilidad física.

La monoformulación de referencia del Compuesto 1 y las formulaciones combinadas se evaluaron en un ensayo de tioflavina T (ThT) en placa de microtitulación de 96 pocillos para determinar la propensión a formar fibrillas amiloides.

Los tiempos de retardo se muestran en la Tabla 14A, 14B, 14C más abajo.

Tabla 14A: Tiempos de retardo de la formulación combinada

	Mono Referencia 1*	Combo 1	Combo 2	Combo 3	Combo 4
Tiempo de retardo (horas)	11,0	19,3	18,0	21,6	23
*Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada					

Tabla 14B: Tiempos de retardo de la formulación combinada

	Mono Referencia 1*	Combo 5	Combo 6
Tiempo de retardo (horas)	9,9	20,6	45
*Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada			

Tabla 14C: Tiempos de retardo de la formulación combinada

	Mono referencia 2*	Combo I	Combo II	Combo III	Combo IV	Combo V	Combo VI
Tiempo de retardo (horas)	29,3	44,3	45	45	28,6	45	45
*Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada							

Conclusión:

El ensayo ThT indicó que sin aumentar el nivel de zinc, las formulaciones combinadas del Compuesto 1 y semaglutida no comprometían la estabilidad física del Compuesto 1 en comparación con la de la monoformulación del Compuesto 1. De hecho, los tiempos de retardo de las formulaciones combinadas fueron mucho más largos que los de la monoformulación del Compuesto 1, lo que demuestra que la formulación conjunta del Compuesto 1 con semaglutida estabiliza de hecho la formulación hacia la formación de fibrillas de amiloide no conveniente. En comparación con la formulación combinada de otro derivado de insulina de acción prolongada y derivado de GLP-1 (por ejemplo, degludec y liraglutida), este hallazgo es inesperado y sorprendente.

Los resultados de la Tabla 14C muestran que la reducción del nivel de m-cresol puede mejorar adicionalmente la estabilidad física de la formulación combinada del Compuesto 1 y semaglutida; y el aumento del nivel de fenol también mejora la estabilidad física de la formulación combinada del Compuesto 1 y semaglutida.

Los resultados de la Tabla 14C también muestran que cuando se formula conjuntamente el Compuesto 1 con semaglutida en una formulación de acuerdo con la invención, la estabilidad física del Compuesto 1 aumenta, en comparación con el uso de la formulación de la técnica anterior (Formulación I) para la formulación combinada del Compuesto 1 y semaglutida.

Estabilidad química

Protocolo

La pureza se determinó mediante cromatografía líquida de fase reversa de ultra alta resolución (RP-UHPLC) donde las muestras se analizaron mediante el uso de una columna Acquity CSH Fluoro Phenyl, 130Å, 1,7 um, 2,1x150mm, gradiente de elución por acetonitrilo en una fase móvil de acetonitrilo y tampón fosfórico en agua con posterior detección UV (215 nm) bajo un flujo de 0,30 ml/min con un volumen de inyección de muestra de 2-3 µl. La pureza se evaluó como el área del pico principal dividida por el área de todos los picos x 100 %.

La estabilidad de las formulaciones presentadas en la tabla 15 se midió como el % de pureza del Compuesto 1 total con RP-UHPLC.

Los resultados confirman una estabilidad química incrementada del Compuesto 1 en las formulaciones combinadas cuando el zinc se reduce de 4,5 Zn ++/seis insulinas a 2,4, 2,2 y 2,0 Zn ++/seis insulinas (Tabla 15, Figura 8). Un cambio en el sistema conservante de fenol 25/25 mM/m-cresol a fenol 60 mM y 0 m-cresol resulta en una mejora adicional en la estabilidad química del Compuesto 1 en la formulación combinada.

5

Tabla 15: Pureza del Compuesto 1 en la formulación combinada

10

15

20

Formulación combinada	Pureza con tiempo de almacenamiento a 37 °C (semanas)			
	0	2	4	6
I	97,5 %	96,1 %	94,4 %	92,9 %
II	97,6 %	96,6 %	95,8 %	95,0 %
III	97,6 %	96,7 %	95,9 %	95,2 %
IV	97,2 %	96,4 %	95,4 %	94,4 %
V	97,3 %	96,6 %	95,9 %	95,1 %
VI	97,3 %	96,6 %	95,9 %	95,2 %

Conclusión

25

Cuando se formula conjuntamente el Compuesto 1 con semaglutida en una formulación de acuerdo con la invención, la estabilidad química del Compuesto 1 aumenta, en comparación con el uso de la formulación de la técnica anterior (Formulación I) para la formulación combinada del Compuesto 1 y semaglutida.

Ejemplo 7

30

Propiedades PK de las formulaciones conjuntas con semaglutida en el modelo PK de cerdo LYD

35

De las formulaciones producidas en el Ejemplo 6, la monoformulación de referencia del Compuesto 1 y el Combo 1 y el Combo 2 se caracterizaron en el modelo animal de PK de cerdo LYD. Es importante que los parámetros PK t_{\max} y $T_{1/2}$ del Compuesto 1, así como también el tiempo de residencia medio (MRT) del Compuesto 1 no se alteraron significativamente después de la formulación conjunta con semaglutida.

Se realizó un estudio cruzado con 16 animales (n=8 para cada formulación).

40

Tabla 16: Parámetros PK del Compuesto 1

	Mono referencia 1*	Combo 1	Combo 2
t_{\max} (h)	13,0 ± 7,0	9,0 ± 2,0	8,0 ± 2,0
$t_{1/2}$ (h)	48,0 ± 4,1	48,6 ± 3,2	47,9 ± 5,3
MRT (h)	71 ± 6	69,0 ± 4,0	68,0 ± 4,0

*Esta modalidad no está cubierta por la invención reivindicada

45

Se muestran los valores medios ± desviación estándar.

50

Los parámetros PK para el Compuesto 1 cuando se formuló conjuntamente con semaglutida en Combo 1 y Combo 2 no cambiaron significativamente en comparación con el Compuesto 1 administrado como una monoformulación. Los valores de t_{\max} fueron ligeramente más bajos para las formulaciones conjuntas, pero con la desviación estándar para la referencia del Compuesto 1, los valores se superponen. La $t_{1/2}$ y MRT fueron muy similares para el Compuesto 1 en las formulaciones conjuntas en comparación con la monoformulación de referencia. En conclusión, las propiedades PK del Compuesto 1 no se vieron afectadas significativamente por la formulación conjunta con semaglutida.

55

Ejemplo 8

60

Tamaño de oligómero mejorado de las formulaciones conjuntas intercambiadas con tampón 60/0

La oligomerización de las formulaciones combinadas I-VI formadas en las condiciones del sitio de inyección simulado del Compuesto 1 se determinó de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 17 y en la Figura 9A y Figura 9B.

65

Tabla 17: Tamaño de oligómero de las formulaciones combinadas

	Combo I	Combo II	Combo III	Combo IV	Combo V	Combo VI
Rh(prom) [nm]	13,7	4,1	4,0	4,6	4,5	4,7
S*(prom) [S]	8,32	4,30	4,40	4,72	4,67	4,96

5

Conclusión

10 Estos experimentos muestran que el tamaño de los oligómeros formados en las condiciones del sitio de inyección simulado depende en gran medida del contenido de zinc.

15 El tamaño medio de los oligómeros formados a partir de formulaciones combinadas en las condiciones del sitio de inyección simulado se reduce significativamente en formulaciones con bajo nivel de zinc (por ejemplo, 2,4 y 2,2 Zn⁺⁺/seis insulinas) en comparación con las formulaciones con alto nivel de zinc (por ejemplo, 4,5 Zn⁺⁺/seis insulinas). El aumento del nivel de fenol y la disminución del nivel de m-cresol reducen aún más el tamaño medio de los oligómeros formados a partir de formulaciones combinadas en las condiciones del sitio de inyección simulado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-Eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetil-amino)etoxi]etoxi]-acetil)), desB30 (Compuesto 1); y semaglutida;
- 10 y que comprende además
de desde 1 a 2 % (peso/peso) de glicerol; de desde 45 a 75 mM de fenol; de desde 0 a 19 mM de m-cresol; de desde 1,5 a 2,5 moles de iones zinc por seis moles de Compuesto 1;
de 5 a 50 mM de cloruro de sodio; y que tiene un valor de pH en el intervalo de desde 7,2 a 8,0.
- 15 2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cantidad de compuesto 1 está en el intervalo de desde 3,5 a 5,0 mM.
3. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la cantidad de semaglutida está en el intervalo de desde 0,30 a 0,70 mM.
- 20 4. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende de desde 45 a 75 mM de fenol, tal como desde 55 mM a 65 mM de fenol; o que comprende de 50 mM, 51 mM, 52 mM, 53 mM, 54 mM, 55 mM, 56 mM, 57 mM, 58 mM, 59 mM, 60 mM, 61 mM, 62 mM, 63 mM, 64 mM, 65 mM, 66 mM, 67 mM, 68 mM, 69 mM o 70 mM de fenol.
- 25 5. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende de desde 0 a 19 mM de m-cresol, tal como desde 0 mM a 15 mM de m-cresol; o que comprende de 0 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM o 15 mM de m-cresol.
- 30 6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende menos de 25 mM de cloruro de sodio.
- 35 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
de desde 4,0 a 4,5 mM de Compuesto 1;
de desde 1 a 2 % (peso/peso) de glicerol;
de desde 50 a 70 mM de fenol;
de desde 0 a 15 mM de m-cresol; de desde 2,0 a 2,5 moles de iones zinc por seis moles de Compuesto 1;
no más de 25 mM de cloruro de sodio; y
que tiene un valor de pH en el intervalo de desde 7,2 a 7,6.
- 40 8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
de 4,2 mM de Compuesto 1;
de 1,5 % (peso/peso) de glicerol;
de 60 mM de fenol;
de 0 mM de m-cresol;
de 2,2 moles de iones zinc por seis moles de Compuesto 1;
de 20 mM de cloruro de sodio; y
que tiene un valor de pH de 7,4.
- 45 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
de 4,2 mM de Compuesto 1;
de 1,5 % (peso/peso) de glicerol;
de 60 mM de fenol;
de 10 mM de m-cresol;
de 2,2 moles de iones zinc por seis moles de Compuesto 1;
de 20 mM de cloruro de sodio; y
que tiene un valor de pH de 7,4.
- 50 10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-Eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetil-amino)etoxi]etoxi]acetil)), desB30 (Compuesto 1); y semaglutida; y que comprende, además, 1,5 % (peso/peso) de glicerol; 60 mM de fenol; 10 mM de m-cresol; 2,2 moles de iones zinc por seis moles de Compuesto 1; 20 mM de cloruro de sodio; y que tiene un valor de pH de 7,4.
- 55 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
- 60
- 65

4,2 mM de insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-Eicosanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil)), desB30 (Compuesto 1);
 0,49 mM de semaglutida;
 1,5 % (peso/peso) de glicerol;
 60 mM de fenol;
 10 mM de m-cresol;
 2,2 moles de iones zinc por seis moles de Compuesto 1;
 20 mM de cloruro de sodio; y
 que tiene un valor de pH de 7,4.

12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende

4,2 mM de insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K((N^ε-Eicosanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil)), desB30 (Compuesto 1);
 0,3 mM de semaglutida;
 1,5 % (peso/peso) de glicerol;
 60 mM de fenol;
 10 mM de m-cresol;
 2,2 moles de iones zinc por seis moles de Compuesto 1;
 20 mM de cloruro de sodio; y
 que tiene un valor de pH de 7,4.

13. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para usar como un medicamento para el tratamiento de un trastorno metabólico.

14. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para usar como un medicamento para el tratamiento o alivio de una enfermedad, trastorno o afección relacionados con la diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, dislipidemia, obesidad o síndrome metabólico (síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina).

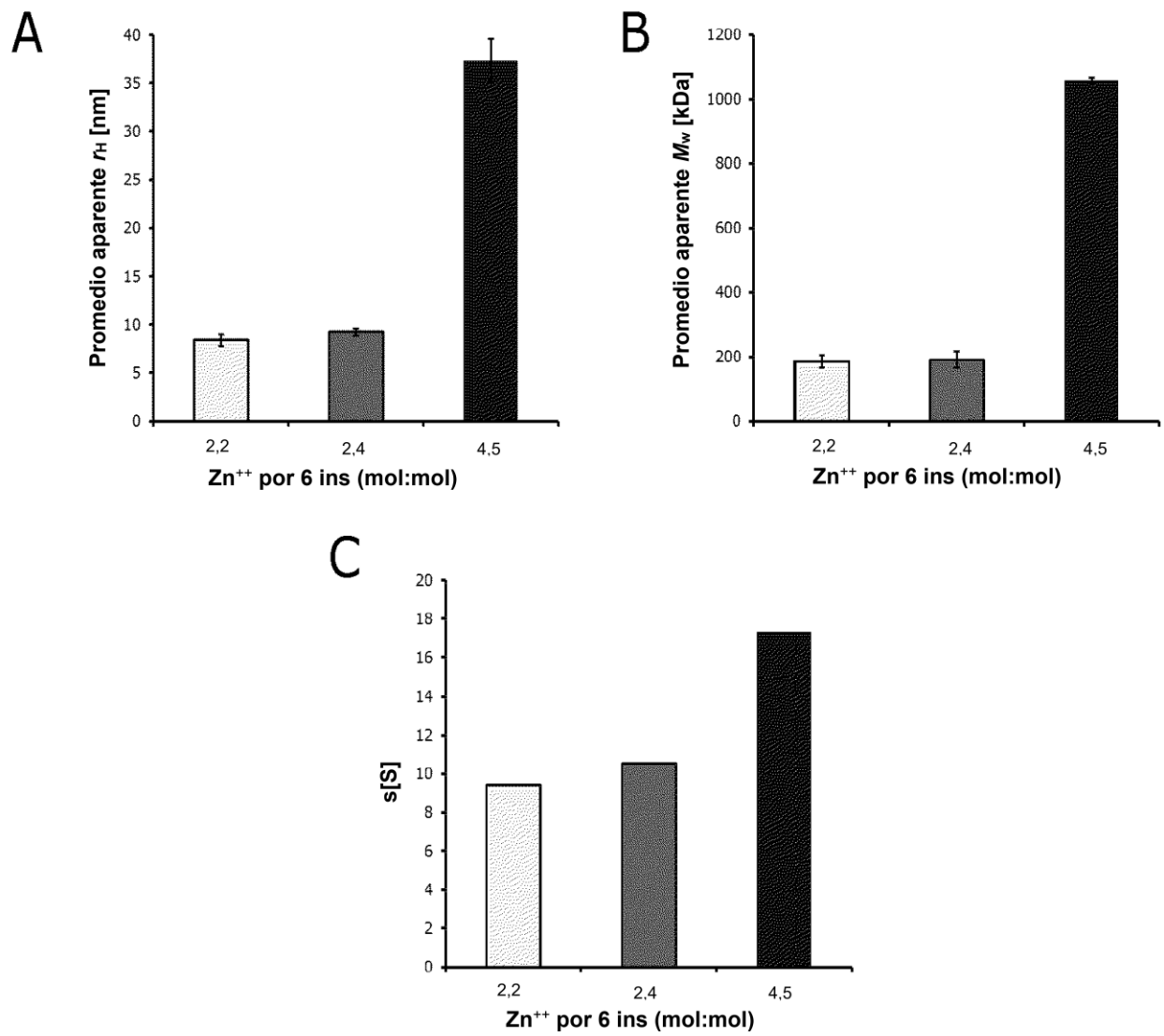


Figura 1

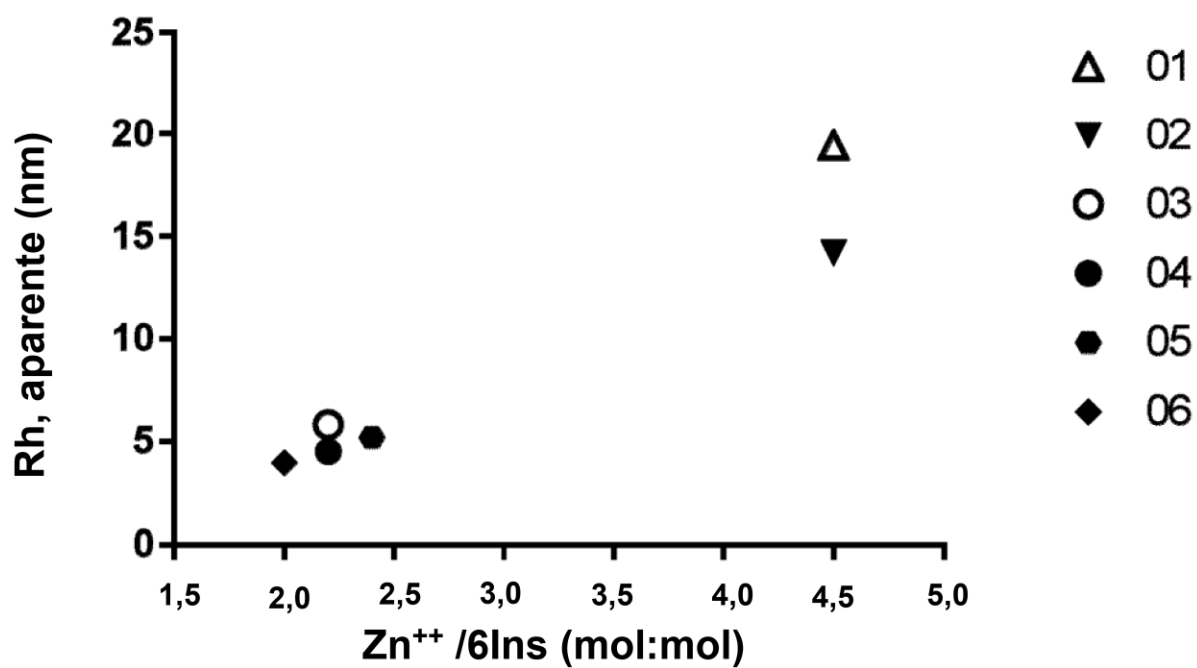


Figura 2A

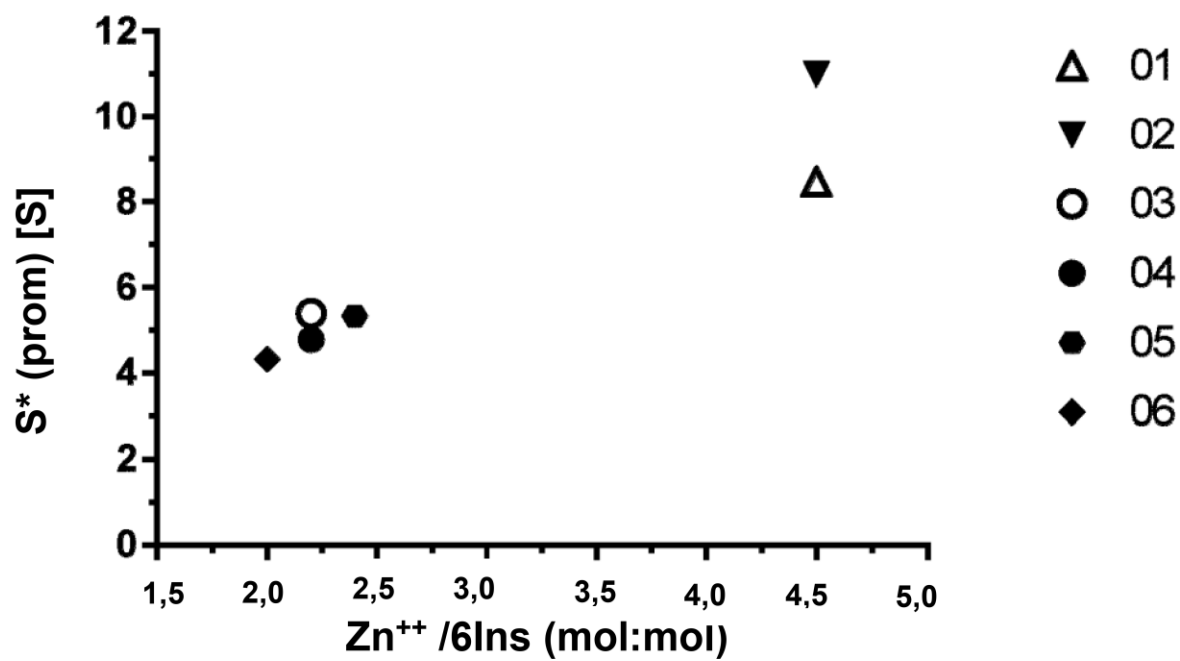


Figura 2B

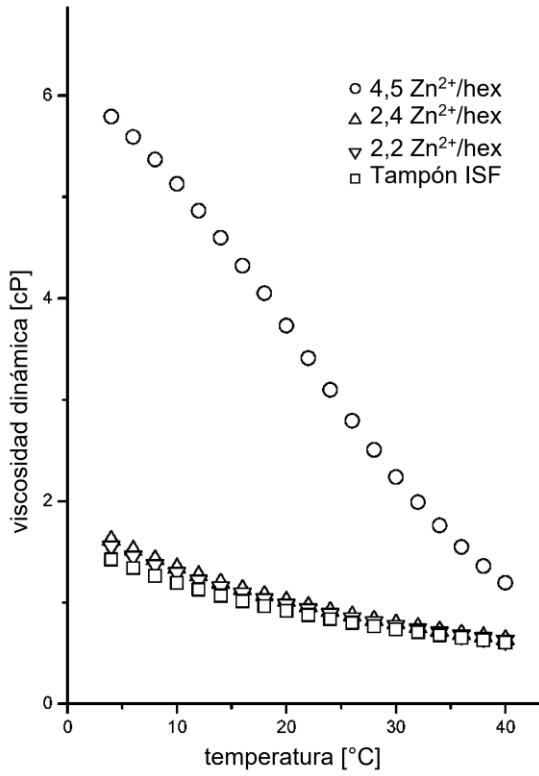


Figura 3A

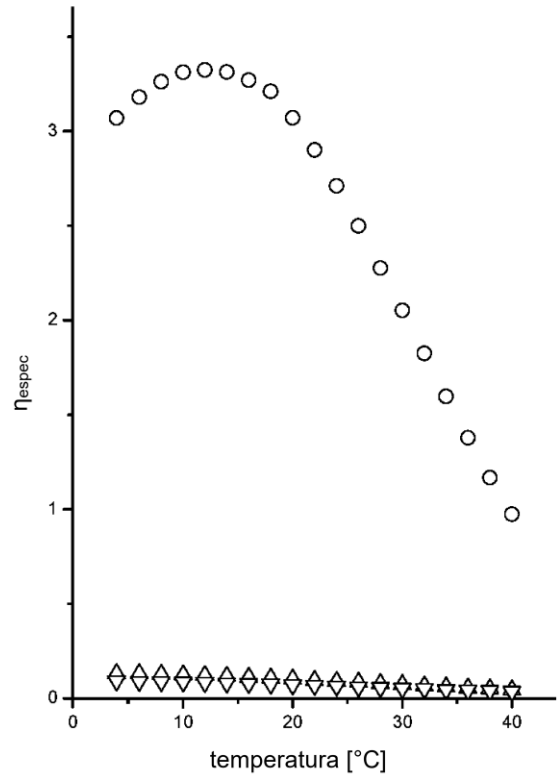


Figura 3B

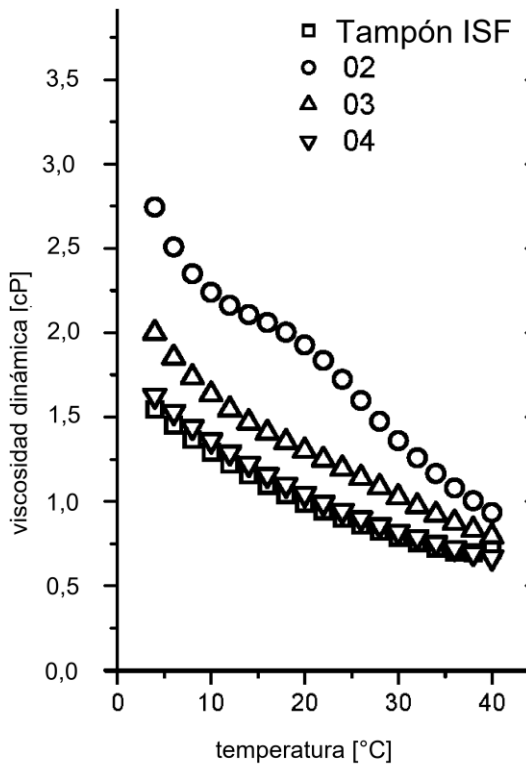


Figura 3C

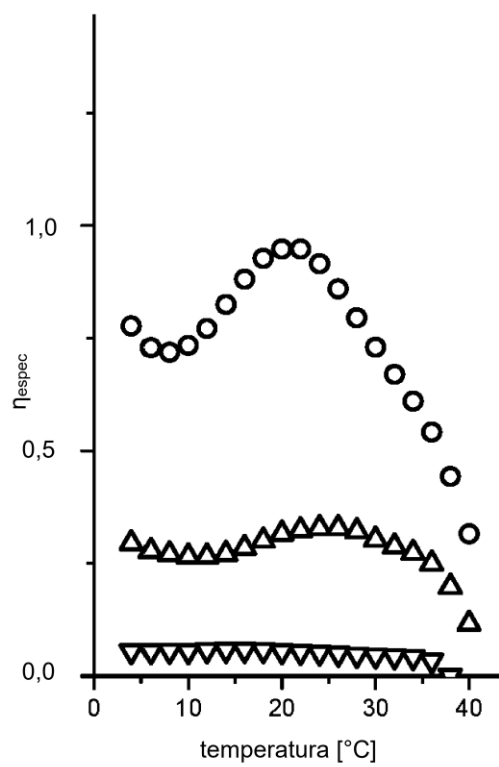


Figura 3D

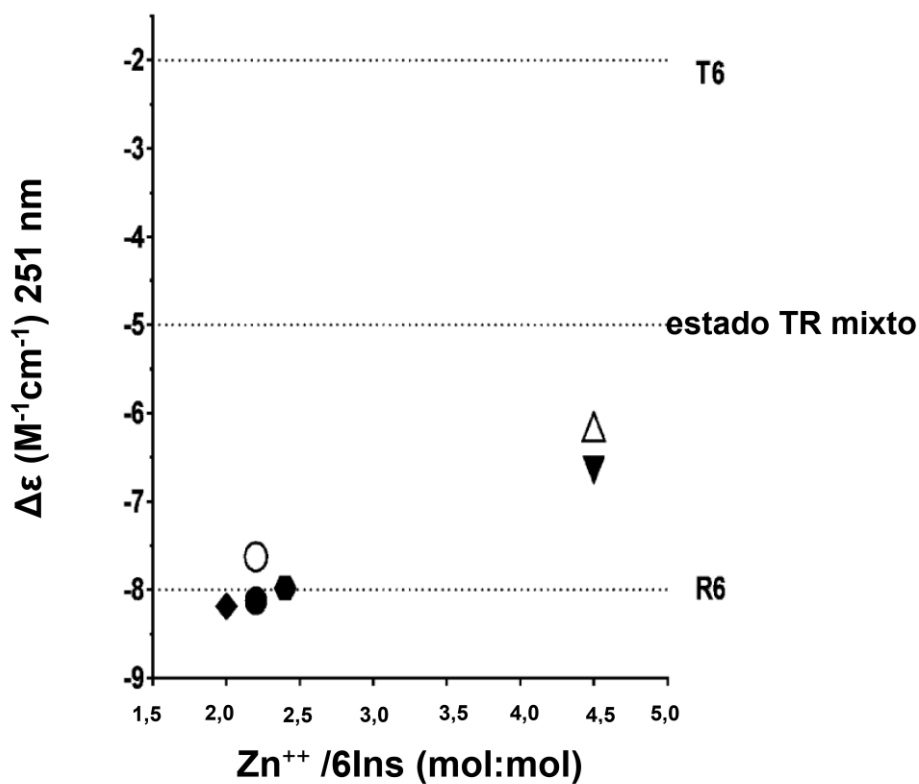


Figura 4A

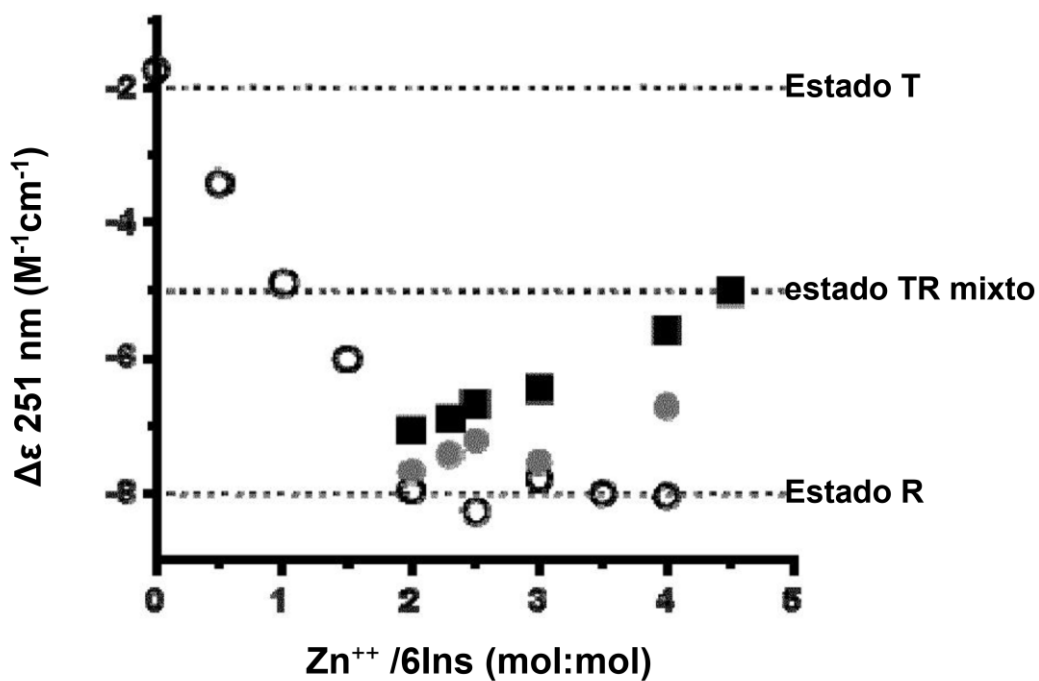


Figura 4B

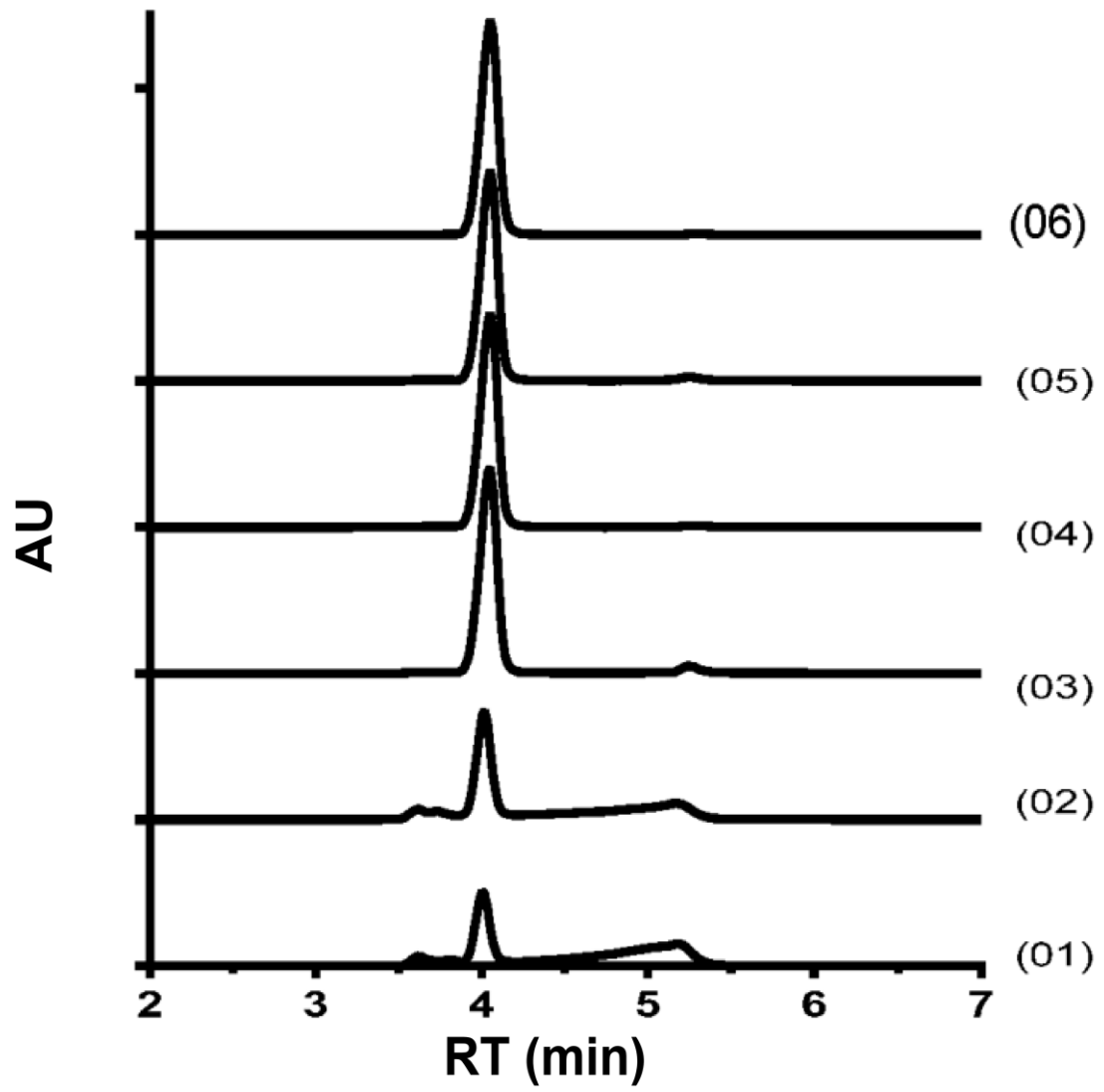


Figura 5A

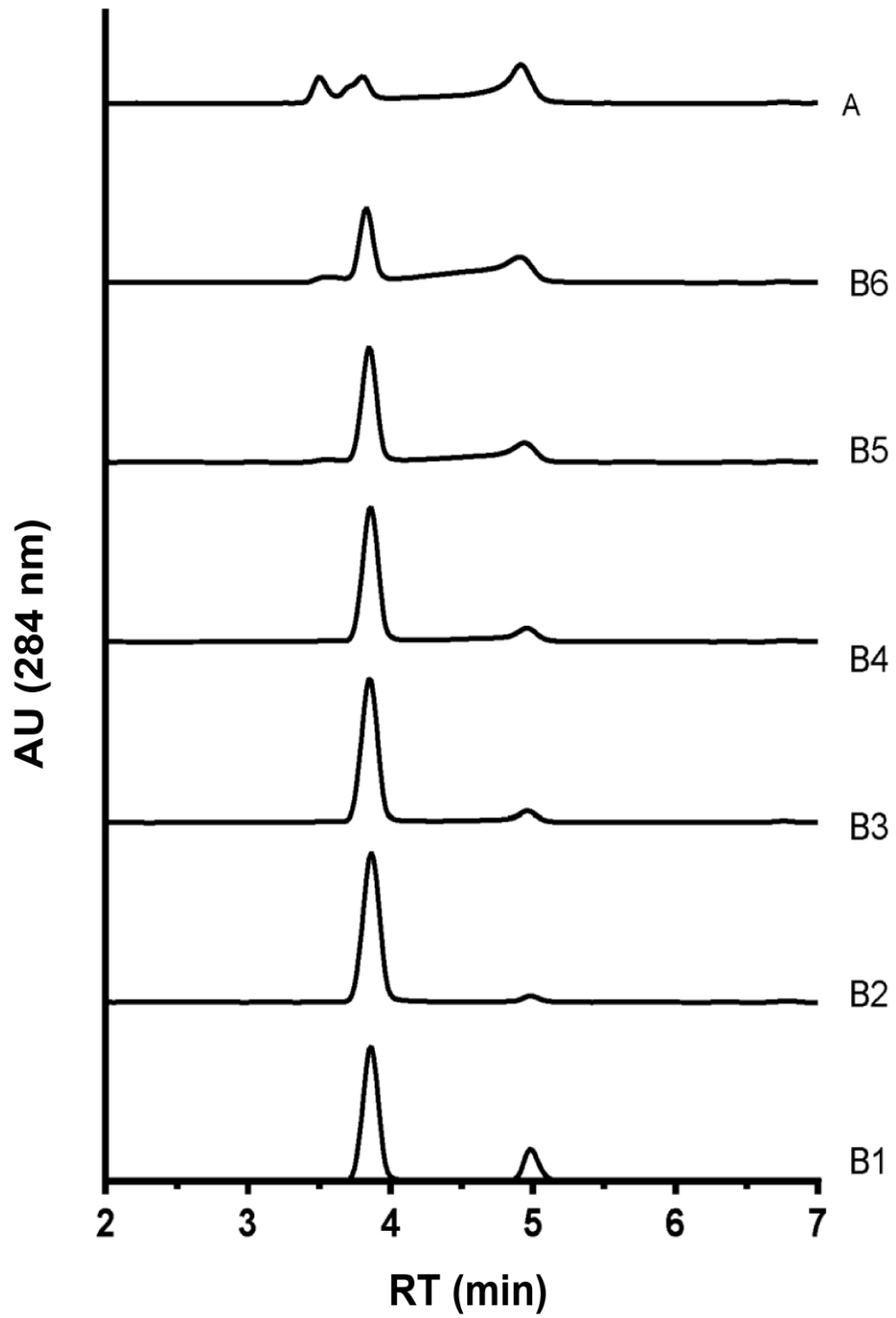


Figura 5B

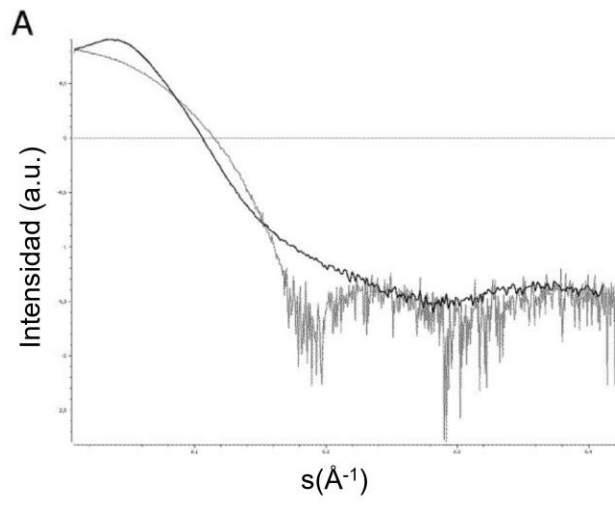


Figura 6A

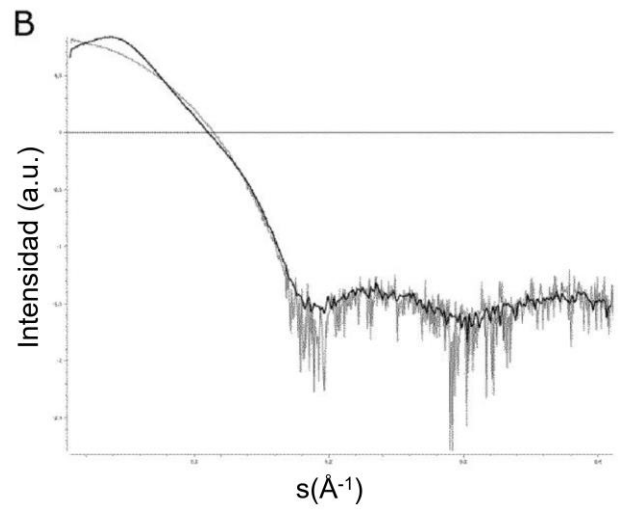


Figura 6B

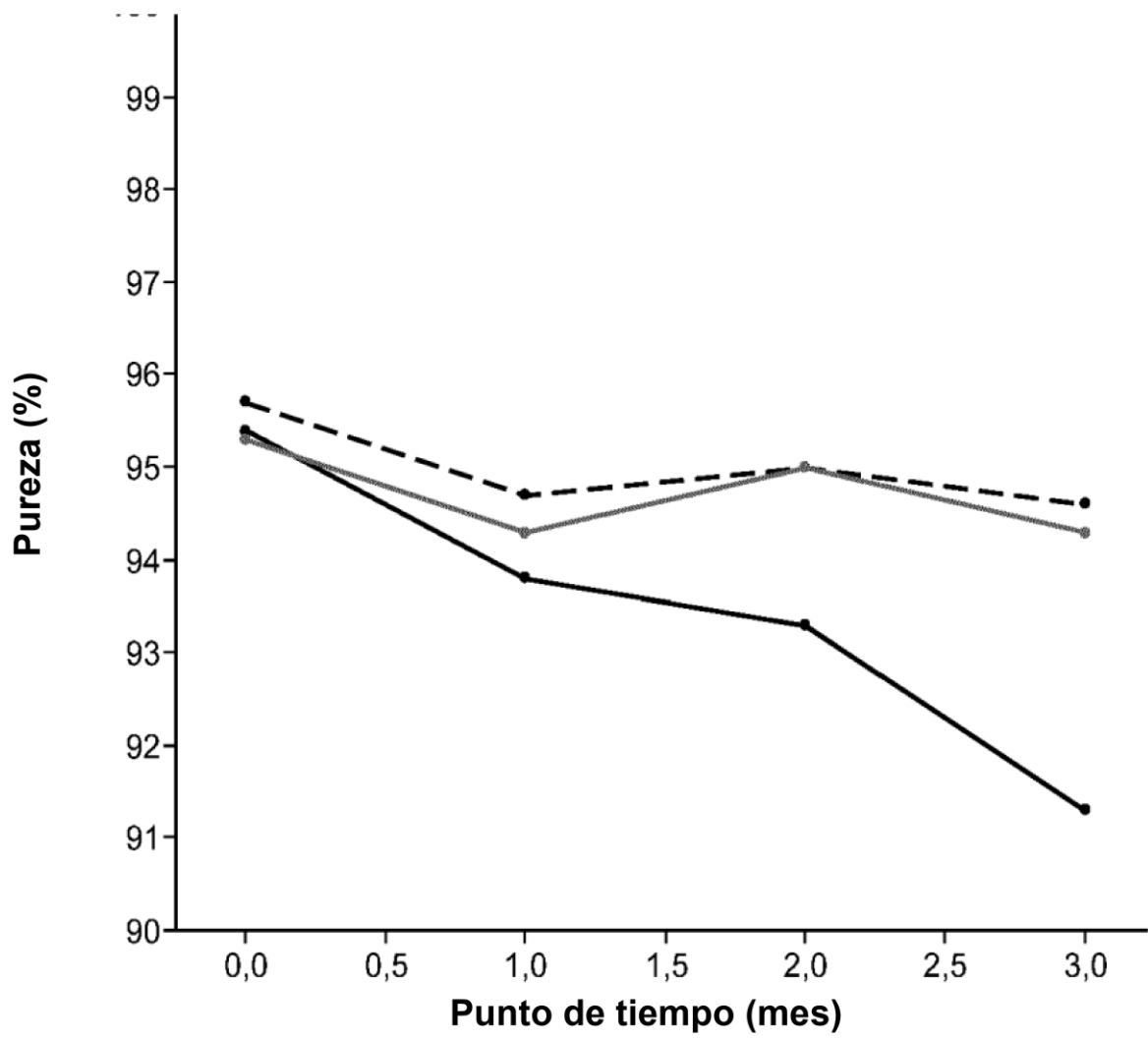


Figura 7A

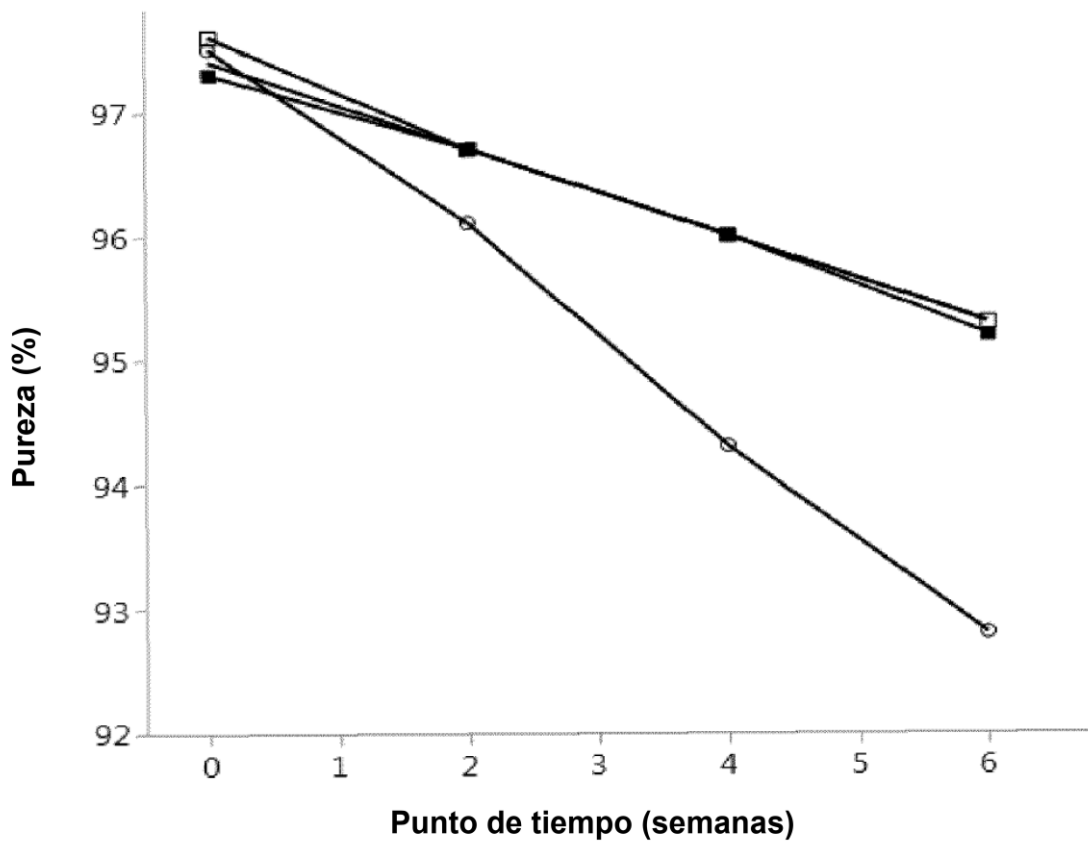


Figura 7B

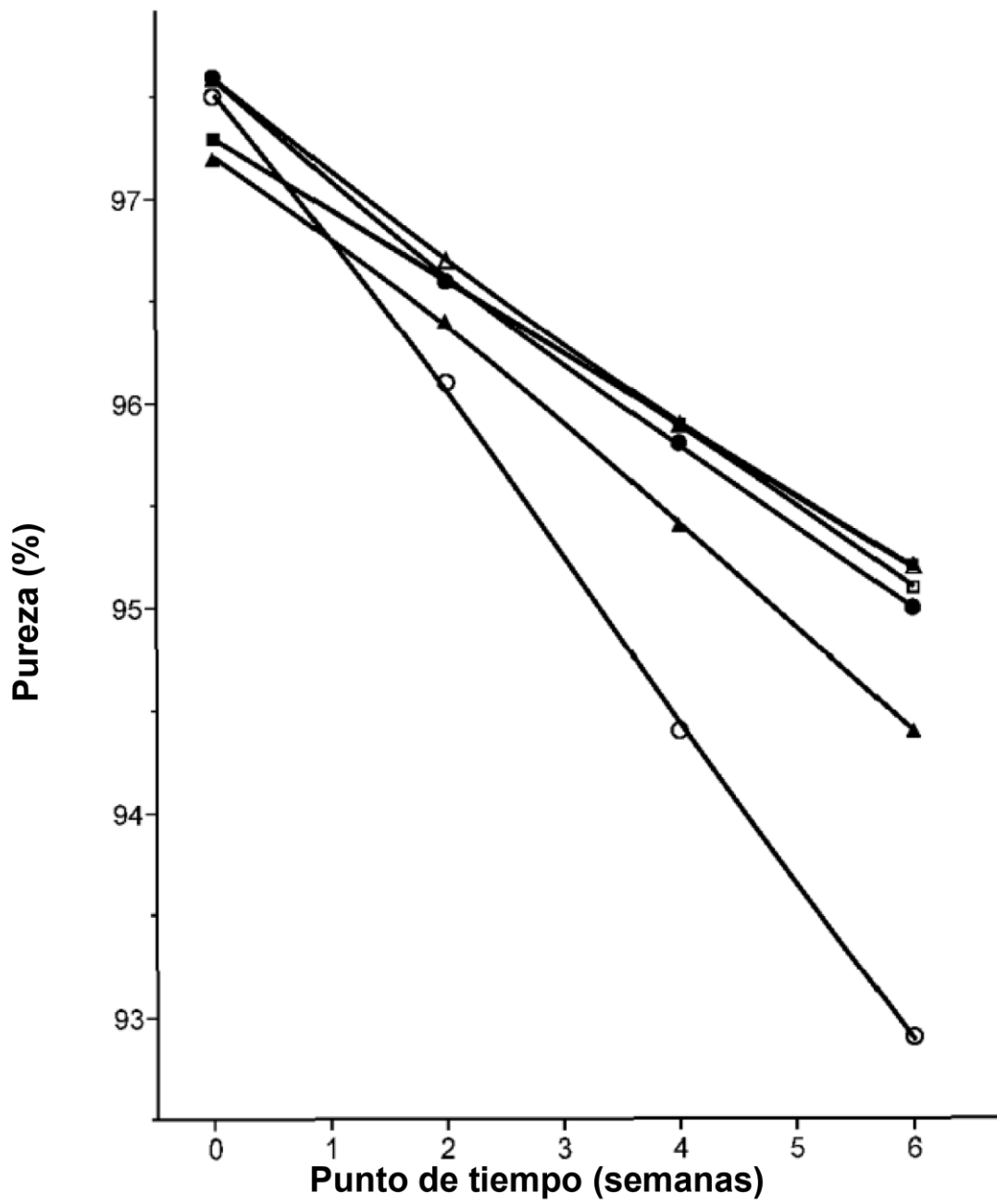


Figura 8

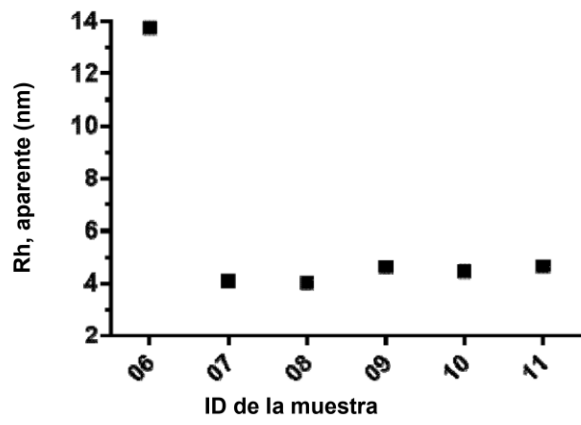


Figura 9A

I II III IV V VI

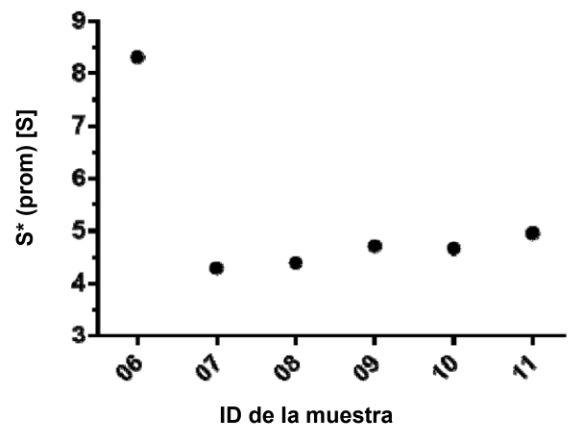


Figura 9B

I II III IV V VI