



INPI
INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0208210-1

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0208210-1

(22) Data do Depósito: 09/03/2002

(43) Data da Publicação do Pedido: 03/10/2002

(51) Classificação Internacional: A61K 38/28; A61K 47/00

(30) Prioridade Unionista: DE 101 14 178.5 de 23/03/2001

(54) Título: PREPARAÇÃO DE INSULINA POBRE EM ZINCO E ISENTA DE ZINCO COM ESTABILIDADE APERFEIÇOADA

(73) Titular: SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH, Sociedade Alemã. Endereço: Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt Am Main, ALEMANHA(DE)

(72) Inventor: PETER BODERKE

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 02/05/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 02/05/2018

Assinado digitalmente por:

Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patente

15 de Novembro

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

de 1889

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PREPARAÇÃO DE INSULINA POBRE EM ZINCO E ISENTA DE ZINCO COM ESTABILIDADE APERFEIÇADA**".

A invenção refere-se a formulações farmacêuticas estabilizadas
 5 contendo um polipeptídeo escolhido de um grupo contendo insulina (por exemplo insulina humana, insulina de boi ou de porco), um análogo de insulina, um derivado de insulina, metabólitos de insulina ativos ou combinações destes; um tensoativo ou combinações de vários tensoativos e opcionalmente um agente de conservação ou combinação de vários agentes de con-
 10 servação bem como opcionalmente um agente isotonizante, tampão ou outras substâncias auxiliares ou combinações destas, sendo que a formulação farmacêutica é pobre em zinco ou é isenta de zinco. Estas formulações podem ser empregadas para o tratamento de diabetes e são particularmente empregáveis em bombas de insulina, "Pens", injetores, inaladores ou para
 15 preparações nas quais é necessária uma elevada estabilidade física. A invenção refere-se igualmente a preparações parenterais, que contêm tais formulações e que podem ser empregadas na diabetes, bem como métodos para produzir os preparados e aperfeiçoar a estabilidade dos preparados de insulina.

20 Pelo mundo, aproximadamente 120 milhões de pessoas sofrem de diabetes. Dentre estas, aproximadamente 12 milhões são diabéticos do tipo I, para os quais a substituição da secreção de insulina endócrina ausente representa a única terapia possível no momento. Os acometidos precisam durante toda a vida, via de regra, várias vezes diariamente, de inje-
 25 ções de insulina. Ao contrário do tipo I de diabetes, no tipo II de diabetes não existe em princípio a falta de insulina, no entanto, em inúmeros casos, sobretudo no estágio progressivo, o tratamento com insulina, eventualmente em combinação com um antidiabético oral, é visto como forma de terapia favorável.

30 Em pessoas saudáveis, a liberação de insulina pelo pâncreas é estritamente ligada à concentração de glicose no sangue. Taxas elevadas de glicose no sangue, tal como aparecem após as refeições, são rapidamente

compensadas por um aumento correspondente da secreção de insulina. Em jejum a taxa de insulina no plasma baixa para um valor basal, que é suficiente para garantir um abastecimento dos órgãos e tecidos sensíveis à insulina com glicose e manter baixa a produção de hepática de glicose durante a noite. A substituição da secreção de insulina do próprio corpo pela aplicação exógena, na maioria subcutânea de insulina, via de regra, não alcança nem de longe a qualidade descrita acima da regulação fisiológica da glicose no sangue. Frequentemente chega a haver disparates da glicose no sangue para cima ou para baixo, que podem ser perigosos para vida em suas piores formas. Além disso, no entanto, taxas elevadas de glicose no sangue durante anos, sem sintomas iniciais, representam também um elevado risco para a saúde. Os estudos DCCT de grande interesse nos EUA (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993), N. Engl. J. Med. 329, 977-986) mostra que taxas de glicose no sangue cronicamente elevadas são responsáveis essencialmente pelo desenvolvimento de doenças diabéticas posteriores. Doenças diabéticas posteriores são danos micro- e macrovasculares que se manifestam, entre outros, como retinopatias, nefropatias ou neuropatias e que levam a cegueira, colapso renal bem como à perda de extremidades e além disso são um elevado risco para doenças do coração/circulação. Daqui pode-se deduzir que uma terapia aperfeiçoada do diabetes precisa, em primeira linha, manter a glicose no sangue o mais próximo possível da faixa fisiológica. Segundo o conceito de terapia intensiva de insulina isto deve ser alcançado por várias injeções diárias de preparados de insulina ativos rápida e lentamente. Formulações de efeito rápido são aplicadas nas refeições, para equilibrar o aumento pós-prandial da glicose no sangue. Insulinas basais lentamente ativas devem garantir o abastecimento básico com insulina principalmente durante a noite, sem levar a uma hipoglicemia.

Insulina é um polipeptídeo de 51 aminoácidos que se dividem em 2 cadeias de aminoácidos: a cadeia A com 21 aminoácidos e a cadeia B com 30 aminoácidos. As cadeias são ligadas entre si por 2 pontes de dissulfeto. Preparações de insulina são empregadas há anos para a terapia de

diabetes. Para isto são empregas não só insulinas de origem natural, mas recentemente também derivados e análogos de insulina.

Análogos de insulina são análogos de insulinas de origem natural, a saber insulina humana ou insulinas animais, que se distinguem pela substituição de pelo menos um radical aminoácido que aparece naturalmente, com outros radicais aminoácidos e/ou adição/remoção de pelo menos um radical aminoácido da correspondente insulina natural, no mais, idêntica. Nos radicais aminoácidos a serem adicionados e/ou substituídos pode tratar-se também daqueles que não aparecem naturalmente.

Derivados de insulina são derivados oriundos de insulina natural ou de um análogo de insulina, que são obtidos por meio de modificações químicas. A modificação química pode consistir, por exemplo, na adição de um ou mais grupos químicos determinados a um ou mais aminoácidos.

Via de regra, os derivados de insulina e análogos de insulina apresentam, em relação à insulina humana, um efeito um pouco modificado.

Análogos de insulina com início de efeito acelerado são descritos nas patentes EP 0 214 826, EP 0 375 437 e EP 0 678 522. A patente EP 0 124 826 refere-se, entre outros, a substituições de B27 e B28. A patente EP 0 678 522 descreve análogos de insulina que na posição B29 apresentam diferentes aminoácidos, de preferência prolina, porém não ácido glutâmico.

A patente EP 0 375 437 abrange análogos de insulina com lisina ou arginina em B28 que, opcionalmente, podem estar adicionalmente modificados em B3 e/ou A21.

Na patente EP 0 419 504 são descritos análogos de insulina que são protegidos contra modificações químicas, nos quais asparagina em B3 e pelo menos um outro aminoácido nas posições A5, A15, A18 ou A21 são modificados.

Na patente WO 92/00321 são descritos análogos de insulina em que pelo menos um aminoácido da posição B1 - B6 está substituído com lisina ou arginina. Insulinas deste tipo apresentam, de acordo com a patente WO 92/00321, um efeito mais prolongado.

Os preparados de insulina comercializados, oriundos de insulinas naturais para substituição de insulina distinguem-se pela procedência da insulina (por exemplo insulina de boi, de porco, insulina humana), bem como pela composição, o que pode influenciar o perfil da ação (início do efeito e duração do efeito). Pela combinação de diferentes preparados de insulina são obtidos diferentes perfis de efeito e possíveis regulagens de valores fisiológicos de glicemia. Há algum tempo estão disponíveis no comércio não somente as chamadas insulinas oriundas de fonte natural, mas também preparações de derivados de insulina ou análogos de insulina que mostram uma cinética modificada. A tecnologia recombinante do DNA possibilita atualmente a preparação de tais insulinas modificadas. A estas pertencem os chamados análogos de insulina monômeros, tais como insulina lispro, insulina aspart e HMR1964 (Lys(B3), insulina humana Glu(B29)) com um rápido início de efeito, bem como insulina glargin com um efeito prolongado.

Além da duração do efeito, a estabilidade do preparado é muito importante para o paciente. Formulações de insulina estabilizadas com aumentada estabilidade física de longo prazo, são necessárias particularmente para preparados que são expostos a cargas mecânicas especiais ou temperaturas elevadas. Entre estas estão, por exemplo, insulinas em sistemas de aplicação como "Pens", sistemas de inalação, sistemas injetáveis sem agulhas ou bombas de insulina. Bombas de insulina são ou portadas ou implantadas no corpo dos pacientes. Em ambos os casos, o preparado depende do calor e dos movimentos do corpo bem como do movimento de transporte da bomba e, assim, está sujeito a uma carga termomecânica muito elevada. Como também "pens" de insulina ("pens" descartáveis ou "pens" reutilizáveis) são, normalmente levados junto ao corpo, aplica-se aqui o mesmo. Preparados até agora conhecidos possuem somente estabilidade limitada sob estas condições. Insulina está presente em solução neutra em concentração farmacêutica em forma de hexâmeros estabilizados contendo zinco, estruturados de 3 unidades idênticas de dímeros (Brange et al., "Diabetes Care" 13: 923 - 954 (1990)). Pela modificação da seqüência de aminoácidos, a associação de insulina pode ser diminuída. Assim, por exemplo,

o análogo de insulina lispro está predominantemente presente como monômero e é, por isso, absorvido com maior rapidez e apresenta um efeito menos prolongado (HPT Ammon e C. Werning; Antidiabetika; 2ª edição; Wiss. Verl.- Ges. Stuttgart; 2000; páginas 94 e seguintes). Justamente os análogos de insulina de rápido efeito, presentes em formas monômeras ou dímeras mostram, no entanto, estabilidade reduzida e tendência de agregação elevada sob carga térmica e mecânica. Ela é observada freqüentemente em turvações e precipitações de agregados insolúveis. (Bakaysa et al; Patente U.S. nº 5474978). Estes produtos de transformação de elevado peso molecular (dímeros, trímeros, polímeros) e agregados diminuem não somente a dose de insulina aplicada, mas também podem minorar irritações ou reações imunológicas em pacientes. Além disso, tais agregados insolúveis podem aderir e obstruir as cânulas e os tubos da bomba. Uma vez que zinco leva a uma estabilização adicional da insulina, preparados pobres ou isentos de zinco de insulina e análogos de insulina são particularmente susceptíveis a instabilidades. Em particular, análogos de insulina monoméricos com um início rápido do efeito tendem, muito rapidamente, à agregação e instabilidades físicas, uma vez que a formação de agregados insolúveis decorre através dos monômeros da insulina. A fim de garantir a qualidade de um preparado de insulina é necessário evitar a formação de agregados.

Existem várias preparações para estabilizar formulações de insulina. No pedido de patente internacional WO 98/56406 foram descritas formulações estabilizadas por TRIS ou tampões de arginina. A patente US 5866538 descreve um preparado de insulina que contém glicerol e cloreto de sódio em concentrações de 5 – 100 mM e que deve apresentar elevada estabilidade. A patente US 5948751 descreve preparados de insulina com elevada estabilidade física, alcançada pela adição de manitol ou açúcares semelhantes. A adição de zinco em excesso a uma solução de insulina contendo zinco pode elevar igualmente a estabilidade (J. Brange et al., Diabetic Medicine, 3; 532 – 536, 1986). A influência do valor de pH e de diferentes substâncias auxiliares sobre a estabilizada, de preparados de insulina também foram detalhadamente descritos (J. Brange & L. Langkjaer, Acta Pharm.

Nordica 4: 149 – 158).

Muitas vezes estes métodos de estabilização para elevados requisitos (aperfeiçoamento da durabilidade à temperatura ambiente ou corpórea e carga mecânica) ou para os chamados análogos de insulina monoméricos ou insulina de efeito rápido, que são particularmente apropriados para estresse físico, não são suficientes. Além disso, todos os preparados comerciais de insulina contêm zinco, que é adicionado a fim de estabilizar o preparado. Bakaya et al. descreve na patente US 5474978 formulações estabilizadas de complexos de insulina que consistem em 6 monômeros de análogos de insulina, 2 átomos de zinco e pelo menos 3 moléculas de um conservante fenólico. Estas formulações podem conter adicionalmente uma substância-tampão fisiologicamente aceitável e um conservante. Se, ao contrário, a intenção for produzir preparados de insulina isentos ou pobres em zinco, os métodos de estabilização mencionados não são suficientes para uma preparação comerciável. Preparados de insulina lispro isentos de zinco, por exemplo, não puderam ser desenvolvidos em virtude da insuficiente estabilidade física (Bakaysa et al., Protein Science (1996), 5:2521 – 2531). Formulações de insulina isentas ou pobres em zinco com suficiente estabilidade, particularmente estabilidade física, não estão descritas no estado da técnica.

Coube à presente invenção, portanto, a tarefa de encontrar preparados isentos de zinco para insulinas e seus derivados e análogos, que se destaquem por elevada estabilidade.

Verificou-se agora, surpreendentemente, que a adição de tensoativos (emulsificadores) como por exemplo poloxâmeros ou polissorbatos (Tween ®), pode aumentar drasticamente a estabilidade de preparados de insulina e, assim, podem ser produzidos até preparados isentos de zinco que apresentem estabilidade superior, para uso também em bombas de infusão ou outros sistemas de aplicação. Estes preparados apresentam estabilidade elevada particularmente sob condições de estresse. Isto se aplica tanto para insulina, análogos de insulina, derivados de insulina ou misturas dos mesmos.

A insulina, em preparados neutros, forma complexos com íons

de zinco. Aqui, com suficiente concentração de zinco formam-se de 6 moléculas de insulina e 2 íons de zinco, hexâmeros estáveis. Para a formação desta estrutura é necessário uma concentração de zinco de pelo menos 0,4% (peso/peso) em relação à insulina. Isto corresponde, em um preparado de 100 IU/ml insulina, a uma concentração de cerca de 13 µg/ml de zinco. Um excesso de zinco (por exemplo 4 íons de zinco por hexâmero) estabiliza outra vez nitidamente o preparado em relação ao estresse físico (J. Brange et al., Neutral insulin solutions physically stabilized by the addition of Zn²⁺. Diabetic Med. 3, 532 - 536 (1986)). Ao contrário disto, no preparado com pequenas concentrações de zinco (< 0,4 % em peso em relação à insulina) a formação de hexâmeros é reduzida. Isto leva a uma estabilidade do preparado drasticamente reduzida (J. Brange e L. Langkjaer; Acta Pharm. Nord, 4: 149 - 158 (1992)). "Isento de zinco" ou "pobre em zinco" no contexto da presente invenção significa a presença de menos que 0,4% em peso de zinco em relação ao teor de insulina do preparado, de preferência menos que 0,2% em peso em relação ao teor de insulina. Para um preparado de insulina vendável com 100 unidades por mililitro (0,6 µmol/ml) isto significa, por exemplo, uma concentração de menos que 13 µg/ml de íons de Zn⁺⁺ (0,2 µmol/ml), de preferência menos que 6,5 µg/ml de íons de Zn⁺⁺ no preparado farmacêutico em relação a uma concentração de insulina de 100 unidades/ml. A isenção de zinco também pode ser alcançada por adição de substâncias complexantes de zinco, como por exemplo citrato ou EDTA, de modo que não estejam disponíveis suficientes íons de zinco para formação do complexo hexâmero de insulina/zinco.

Os preparados farmacêuticos contêm 60 - 6000 nmoles/ml, de preferência 240 - 3000 nmoles/ml de uma insulina, de um metabólito de insulina, de um análogo de insulina ou de um derivado de insulina.

Como tensoativos podem ser empregados, entre outros, tensoativos não-iônicos ou iônicos (aniônicos, catiônicos ou anfóteros). São preferidos particularmente tensoativos farmacêuticos usuais, como por exemplo: sabões de metais alcalinos, de amino e de metais alcalino-terrosos (estearatos, palmitatos, oleatos, ricinolatos), alquilsulfatos e alquilsulfonatos (lau-

rilsulfato de sódio, cetilsulfato de sódio, estearilsulfato de sódio), tensoativos naturais (sais de ácido biliar, saponinas, goma arábica), tensoativos catiônicos (brometo de alcônio, cloreto de cetilpiridínio, cetrimida), álcoois graxos (álcool de cetila, álcool de estearila, colesterol), ésteres parciais e ésteres do ácido graxo de álcoois polivalentes como do glicerol, sorbitol entre outros (Span[®], Tween[®], Myrj[®], Brij[®]), Cremophor[®] ou poloxâmeros.

Os tensoativos estão presentes no preparado farmacêutico em concentração de 0,1 µg/ml - 10000 µg/ml, de preferência 0,1 µg/ml - 1000 µg/ml.

O preparado pode conter ainda conservantes (por exemplo fenol, cresol, parabenos), agentes isotonzantes (por exemplo manitol, sorbitol, lactose, dextrose, trehalose, cloreto de sódio, glicerol) substâncias-tampão, sais, ácidos e lixívias, bem como outros agentes auxiliares. Estas substâncias podem estar presentes, de cada vez, individualmente ou também em misturas.

Glicerol, dextrose, lactose, sorbitol e manitol via de regra, estão presentes no preparado farmacêutico em uma concentração de 100 - 250 mM, NaCl em uma concentração de até 150 mM. Substâncias-tampão como por exemplo tampões de fosfato, acetato, citrato, arginina, glicilglicina ou TRIS (isto é, 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) bem como os sais correspondentes, estão presentes em uma concentração de 5 - 250 mM, de preferência 10 - 100 mM.

Outras substâncias auxiliares podem ser, entre outros, sais, arginina, protamina ou Surfen[®].

Objeto da invenção é, pois, uma formulação farmacêutica contendo um polipeptídeo escolhido de um grupo contendo insulina, um análogo de insulina, um derivado de insulina, um metabólito de insulina ou combinações dos mesmos; um tensoativo ou combinações de mais tensoativos; opcionalmente um conservante ou combinação de vários conservantes; e opcionalmente um isotonzante, substâncias-tampão e/ou outros agentes auxiliares ou combinações dos mesmos, sendo que a formulação farmacêutica é isenta ou pobre em zinco; é preferida aquela formulação farmacêutica na qual o tensoativo é escolhido de um grupo contendo sabões de metal alcali-

no, de amina, de metais alcalino-terrosos, sulfatos de alquila, sulfonatos de alquila, tensoativos naturais, tensoativos catiônicos, álcoois graxos, ésteres parciais e ésteres do ácido graxo de álcoois polivalentes como do glicerol e do sorbitol, polióis; sendo que os sabões mencionados são escolhidos de um grupo contendo estearatos, palmitatos, oleatos, ricinolatos; sendo que os sulfatos de alquila são escolhidos de um grupo contendo laurilsulfato de sódio, cetilsulfato de sódio, estearilsulfato de sódio; sendo que os tensoativos naturais são escolhidos de um grupo contendo sais do ácido biliar, saponinas, goma arábica, lecitinas; sendo que os tensoativos catiônicos são escolhidos de um grupo contendo brometo de alcônio, cloreto de cetilpiridínio, Cetrimid[®]; sendo que os álcoois graxos são escolhidos de um grupo contendo álcool de cetila, álcool de estearila, colesterol; sendo que os ésteres e éteres parciais e ésteres e éteres do ácido graxo do glicerol e sorbitol são escolhidos de um grupo contendo Span[®], Tween[®], Myrj[®], Brij[®], Cremophor[®]; sendo que os polióis são escolhidos do grupo dos polipropilenoglicóis, polietilenoglicóis, poloxâmeros, plurônicos, tetrônicos; sendo que o conservante é escolhido de um grupo contendo fenol, cresol, parabenos; sendo que o isotonzante é escolhido de um grupo contendo manitol, sorbitol, cloreto de sódio, glicerol; sendo que as substâncias auxiliares são escolhidas de um grupo contendo substâncias-tampão, ácidos, lixívias; sendo que a insulina é uma insulina de origem natural, por exemplo humana, insulina de boi ou insulina de porco; sendo que o análogo da insulina é escolhido de um grupo contendo insulina humana Gly(A21) - Arg(B31) - Arg(B32); insulina humana Lys(B3) - Glu(B29); insulina humana Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana B28 Asp, insulina humana, em que prolina na posição B28 foi substituída com Asp, Lys, Leu, Val ou Ala e onde na posição B29 Lys pode estar substituída com Pro; insulina humana AlaB26; insulina humana Des(B28-B30); insulina humana Des(B27) ou insulina humana Des(B30);

sendo que o derivado de insulina é escolhido de um grupo contendo insulina humana B29-N-miristoil-des(B30), insulina humana B29-N-palmitoil-des(B30), insulina humana B29-N-miristoila, insulina humana B29-N-palmitoila, insulina humana B28-N-miristoil Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana

B28-N-palmitoil-Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana B30-N-miristoil Thr^{B29}Lys^{B30},
 insulina humana B30-N-palmitoil- Thr^{B29}Lys^{B30}, insulina humana B29-N-(N-
 palmitoil-γ-glutamil)-des(B30), insulina humana B29-N-(N-litocolil-γ-glutamil)-
 des(B30), insulina humana B29-N-(ω-carboxiheptadecanoíl)-des(B30) e in-
 5 sulina humana B29-N-(ω-carboxiheptadecanoíla).

Outro objeto da invenção é uma formulação farmacêutica como
 acima descrita, na qual a insulina, o análogo da insulina, o metabólito ativo da
 insulina e/ou o derivado da insulina está presente em uma concentração de 60 -
 6000 nm/mol, de preferência em uma concentração de 240 - 3000 nmol/l
 10 (isto corresponde a aproximadamente uma concentração de 1,4 - 35 mg/ml
 ou 40 - 500 unidades/ml); na qual o tensoativo está presente em uma con-
 centração de 0,1 - 10000 µg/ml, de preferência em uma concentração de 1 -
 1000 µg/ml.

Outro objeto da invenção é uma formulação farmacêutica como
 15 acima descrita, na qual o glicerol e/ou manitol estão presentes em uma con-
 centração de 100 - 250 mM, e/ou cloreto de preferência em uma concentra-
 ção de até 150 mM.

Um outro objeto da invenção é uma formulação farmacêutica
 como descrita acima, na qual a substância-tampão está presente em uma
 20 concentração de 5 - 250 mM.

Um outro objeto da invenção é uma formulação farmacêutica de
 insulina que contém outros aditivos como, por exemplo, sais, protamina ou
 Surfen®, os quais retardam a liberação da insulina. Também estão contidas
 misturas de tais insulinas de retardo com as formulações acima descritas.

Um outro objeto da invenção é um método para a preparação de
 25 formulações farmacêuticas deste tipo. O uso de tais formulações para o tra-
 tamento da Diabetes mellitus é igualmente outro objeto da invenção. Outro
 objeto da invenção é o uso ou a adição de tensoativos como estabilizador
 durante o processo de preparação de insulina, análogos de insulina ou deri-
 vados de insulina ou de seus preparados.
 30

Nas formulações farmacêuticas descritas contendo um poli-
 peptídeo escolhido de um grupo contendo insulina, um análogo de insulina,

um derivado de insulina, um metabólito ativo de insulina ou combinações dos mesmos, o valor de pH situa-se entre 2 e 12, de preferência entre 6 e 8,5 e de modo particularmente preferido entre 7 e 7,8.

5 A invenção será descrita a seguir com alguns exemplos, que não são, de modo algum, restritivos.

Exemplos:

10 Testes de comparação: Com análogo de insulina HMR1964 (insulina humana Lys(B3), Glu(B29)) são produzidos diferentes preparados isentos de zinco. HMR1964 isento de zinco e os demais componentes são dissolvidos em uma parte de água para fins injetáveis e o valor de pH é ajustado com ácido clorídrico/NaOH em 7,3 +/- 0,2 e completado até o volume final. A concentração de HMR1964 em cada um dos testes abaixo descritos é de 3,5 mg/ml (corresponde a 100 unidades/ml). Um segundo preparado é produzido de modo idêntico, mas acrescenta-se ainda uma determinada quantidade de um tensoativo. As soluções são transferidas para recipientes de vidro de 5 ml ou de 10 ml ("Vials") e fechados. Estes recipientes são, então, submetidos a condições de estresse.

20 1. Teste de rotação: 5 recipientes de cada vez de uma carga, bem como 5 recipientes de carga de comparação são submetidos a um teste de rotação. Este teste consiste em colocar os recipientes sob tensão em um rotor e girá-los pontacabeça (360°), a 37°C, com 60 rpm. Após tempos determinados, a turvação dos preparados contidos nos recipientes é comparada à turvação padrão ou é determinada com um fotômetro de turvação para laboratório (nefelômetro) em unidades nefelométricas de formazina (UNF). O teste é feito até que o índice de turvação em todos os recipientes tenha ultrapassado 18 UNF.

25 2. Teste de vibração: Os recipientes são colocados em uma incubadora no rotor de laboratório e vibrados a 30°C com 30 100 movimentos/min. Após tempos determinados, o índice de turvação das amostras é determinado em um fotômetro

de turvação de laboratório (nefelômetro), em unidades nefelométricas de formazina (UNF).

Exemplo 1: Estabilização de HMR1964 por meio de adição de zinco no teste de rotação

- 5 a) Em uma solução aquosa que, na formulação final contém 2,7 mg/ml de m-cresol, 20 mg/ml de glicerol e 6 mg/ml de trometamol (tris), dissolve-se HMR1964 isento de zinco (calculado de tal forma que da formulação pronta resulte uma concentração de 3,5 mg/ml) e ajusta-se o valor de pH com ácido clorídrico 1 N / NaOH 1N em 7,2 - 7,4 (medido em temperatura ambiente). A solução é completada com água até o volume final e filtrada em um filtro de 0,2 µm até
- 10 tornar-se estéril. A seguir, a solução é transferida para frascos para injeção de 5 ml que são fechados com tampas.
- 15 b) Uma solução de comparação é preparada de modo idêntico, porém, antes de completar com água adiciona-se uma quantidade correspondente de uma solução-mãe de cloreto de zinco a 0,1%, de modo a obter-se na formulação pronta um teor de zinco de 15 µg/ml.

20 5 amostras de cada vez são, a seguir, submetidas a estresse no teste de rotação e a turvação é determinada em diferentes períodos de tempo. Os resultados são mostrados na tabela que segue.

Descrição	Índice de padrão de teste com turvação > 18 FNU após:					
	0 h	8 h	16 h	32 h	40 h	56 h
HMR1964 Sem adição	0	5	-	-	-	-
HMR1964 + 15 µg/ ml Zn	0	0	0	0	4	5

25 A adição de zinco pode protelar temporariamente a turvação da solução de modo significativo e, assim, estabilizar a formulação HMR1964. Sem adição de zinco, o preparado apresenta já após 8 horas no teste de rotação uma nítida turvação.

Exemplo 2: Estabilização de HMR1964 por meio de adição de

polissorbato 20 (Tween ® 20) no teste de rotação

5

a) Em uma solução aquosa que, na formulação final contém 3,15 mg/ml de m-cresol, 5 mg/ml de NaCl e 6 mg/ml de trometamol, dissolve-se HMR1964 isento de zinco (calculado de tal forma que na formulação pronta resulte uma concentração de 3,5 mg/ml) e ajusta-se o valor de pH com ácido clorídrico 1 N / NaOH 1 N em 7,2 - 7,4 (medido em temperatura ambiente). A solução é completada com água até o volume final e filtrada em um filtro de 0,2 µm até tornar-se estéril. A seguir, a solução é transferida para frascos para injeção de 5 ml que são fechados com tampas.

10

15

b) Uma solução de comparação é preparada de modo idêntico, porém, antes de completar com água adiciona-se uma quantidade correspondente de uma solução-mãe de polissorbato 20 a 0,1% (Tween® 20) de modo a obter-se na formulação pronta uma concentração de 10 µg/ml.

5 amostras de cada vez são, a seguir, submetidas a estresse no teste de rotação e a turvação é determinada em diferentes períodos de tempo. Os resultados são mostrados na tabela que segue.

Descrição	Índice de padrão de teste com turvação > 18 FNU após:					
	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h
HMR1964 Sem adição	0	5	-	-	-	-
HMR1964 + 10 µg/ml Tween® 20	0	0	0	0	5	-

20

A adição de polissorbato 20 protela muito nitidamente o surgimento de turvações.

Exemplo 3: Estabilização de HMR1964 por meio de adição de poloxâmero no teste de rotação

25

a) Em uma solução aquosa que, na formulação final contém 4,5 mg/ml de fenol, 5 mg/ml de NaCl e 6 mg/ml de trometamol, dissolve-se HMR1964 isento de zinco (calculado de

5

tal forma que na formulação pronta resulte uma concentração de 3,5 mg/ml) e ajusta-se o valor de pH com ácido clorídrico 1 N / NaOH 1 N em 7,2 - 7,4 (medido em temperatura ambiente). A solução é completada com água até o volume final e filtrada em um filtro de 0,2 µm até tornar-se estéril. A seguir, a solução é transferida para frascos para injeção de 5 ml que são fechados com tampas.

10

- b) Uma solução de comparação é preparada de modo idêntico, porém, antes de completar com água adiciona-se uma quantidade correspondente de poloxâmero 171 (por exemplo Genapol ®) de modo a obter-se na formulação pronta uma concentração de 10 µg/ml.

15

5 amostras de cada vez são, a seguir, submetidas a estresse no teste de rotação e a turvação é determinada em diferentes períodos de tempo. Os resultados são mostrados na tabela que segue.

Descrição	Índice de padrão de teste com turvação > 18 FNU após:					
	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h
HMR1964 Sem adição	0	5	-	-	-	-
HMR1964 + 0,01 mg/ml Poloxamer 171	0	0	0	2	5	-

A adição de poloxâmero 171 protela nitidamente o surgimento de turvações e estabiliza o preparado.

Exemplo 4: Estabilização de HMR1964 por meio de adição de polissorbato 20 ou polissorbato 80 no teste de vibração

20

- a) Em uma solução aquosa que, na formulação final contém 3,15 mg/ml de m-cresol, 5 mg/ml de NaCl e 6 mg/ml de trometamol, dissolve-se HMR1964 isento de zinco (calculado de tal forma que na formulação pronta resulte uma concentração de 3,5 mg/ml) e ajusta-se o valor de pH com ácido clorídrico 1 N / NaOH 1 N em 7,2 - 7,4 (medido em temperatura ambiente). A solução é completada com água até

25

o volume final e filtrada em um filtro de 0,2 µm até tornar-se estéril. A seguir, a solução é transferida para frascos para injeção de 5 ml que são fechados com tampas.

- 5 b) Uma solução de comparação é preparada de modo idêntico, porém, antes de completar com água, adiciona-se uma quantidade correspondente de uma solução-mãe de polissorbato 20 (Tween® 20) a 0,1%, de modo a obter-se uma formulação pronta com uma concentração de 10 µg/ml.
- 10 c) Uma outra solução de comparação é preparada de modo idêntico ao b), só que desta vez emprega-se polissorbato 80 (Tween® 80) em vez de polissorbato 20.

As amostras são agitadas em um vibrador de laboratório (60 rpm), a 30°C) e a turvação das amostras é medida em tempos determinados. Os resultados são mostrados na tabela que segue.

Adição	Teste de vibração, turvação (FNU) após				
	Início	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Sem adição	0,55	2,04	4,86	6,12	10,51
0,01 mg/ml Tween 20	1,75	2,60	2,44	2,44	3,80
0,01 mg/ml Tween 80	2,38	2,98	2,86	3,01	4,14

15 Tanto a adição de polissorbato 20 quanto a de polissorbato 80 têm efeito estabilizante em HMR1964 no teste de vibração.

Exemplo 5: Estabilização de HMR1964 por meio de adição de zinco ou poloxâmico (Genapol®) no teste de vibração

- 20 a) Em uma solução aquosa que, na formulação final contém 3,3 mg/ml de fenol, 5 mg/ml de NaCl e 6 mg/ml de trometamol, dissolve-se HMR1964 isento de zinco (calculado de tal forma que na formulação pronta resulte uma concentração de 3,5 mg/ml) e ajusta-se o valor de pH com ácido clorídrico 1 N / NaOH 1N em 7,2 - 7,4 (medido em temperatura ambiente). A solução é completada com água até o vo-
- 25

lume final e filtrada em um filtro de 0,2 μm até tornar-se estéril. A seguir, a solução é transferida para frascos para injeção de 5 ml que são fechados com tampas.

- 5 b) Uma solução de comparação é preparada de modo idêntico, porém, antes de completar com água adiciona-se uma quantidade correspondente de uma solução-mãe de poloxâmero 171 (Genapol®) a 0,1%, de modo a obter-se na formulação pronta um teor de 10 $\mu\text{g/ml}$.
- 10 c) Uma outra solução de comparação é preparada como em a), porém adiciona-se à solução, antes de completar com água, uma quantidade correspondente de solução-mãe de cloreto de zinco a 0,1%, no lugar do poloxâmero, de modo que na solução pronta resulte uma concentração de 15 $\mu\text{g/ml}$ de zinco.

Adição	Teste de vibração, turvação (FNU) após				
	Início	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Nenhuma	0,39	0,70	4,46	8,74	14,11
0,01 mg/ml Poloxamer	0,36	0,57	0,52	1,59	0,89
0,015 mg/ml Zinco	1,02	0,68	0,70	0,56	0,86

- 15 Tanto a adição de zinco quanto a de poloxâmero evita o surgimento de turvações no teste de vibração.

Exemplo 6: Estabilização de HMR1964 por meio de adição de poloxâmero no teste de rotação

- 20 a) Em uma solução aquosa que, na formulação final contém 3,3 mg/ml de fenol, 5 mg/ml de NaCl e 6 mg/ml de trometamol, dissolve-se HMR1964 isento de zinco (calculado de tal forma que na formulação pronta resulte uma concentração de 3,5 mg/ml) e ajusta-se o valor de pH com ácido clorídrico 1 N / NaOH 1N em 7,2 – 7,4 (medido em temperatura ambiente). A solução é completada com água até o volume final e filtrada em um filtro de 0,2 μm até tornar-se
- 25

estéril. A seguir, a solução é transferida para frascos para injeção de 5 ml que são fechados com tampas.

- b) Uma solução de comparação é preparada de modo idêntico, porém, antes de completar com água adiciona-se uma quantidade correspondente de uma solução-mãe de poloxâmero 171 (Genapol®) a 0,1%, de modo a obter-se na formulação uma concentração de 100 µg/ml.

5

5 amostras de cada vez são, a seguir, submetidas a estresse no teste de rotação e a turvação é determinada em diferentes períodos de tempo. Os resultados são mostrados na tabela que segue.

10

Descrição	Índice de padrão de teste com turvação > 18 FNU após:					
	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h
HMR1964 Sem adição	0	5	-	-	-	-
HMR1964 + 0,10 mg/ml Poloxamer 171	0	0	0	0	1	5

A adição de 100 µg/ml de poloxâmero estabiliza igualmente muito nitidamente o preparado de HMR1964.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação farmacêutica aquosa, caracterizada pelo fato de que compreende insulina humana Lys(B3), Glu(B29), um tensoativo ou combinações de tensoativos, em que o tensoativo é selecionado do grupo compreendendo polissorbato 20 e polissorbato 80, em que a formulação farmacêutica compreende menos de 0,2% em peso de zinco em relação ao teor de insulina da preparação.

2. Formulação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende um conservante selecionado do grupo compreendendo fenol, cresol, clorocresol, álcool de benzila, parabenos.

3. Formulação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que compreende um agente isotonzante selecionado do grupo compreendendo manitol, sorbitol, lactose, dextrose, trehalose, cloreto de sódio, glicerol.

4. Formulação farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que compreende uma substância auxiliar selecionada do grupo compreendendo substâncias-tampão como, por exemplo, TRIS, fosfato, citrato, acetato, glicilglicina ou outras substâncias como ácidos, lixívias, sais, protamina, arginina.

5. Formulação farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a insulina humana Lys(B3), Glu(B29) está presente em uma concentração de 60 - 6000 nmoles/ml.

6. Formulação farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a insulina humana Lys(B3), Glu(B29) está presente em uma concentração de 240 - 3000 nmoles/ml.

7. Formulação farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que o tensoativo está presente em uma concentração de 0,1 - 10000 µg/ml.

8. Formulação farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o tensoativo está presente em uma

concentração de 1 - 1000 µg/ml.

9. Formulação farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o glicerol e/ou manitol está presente em uma concentração de 100 - 250 mM.

5 10. Formulação farmacêutica de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o cloreto está presente em uma concentração de até 150 mM.

10 11. Formulação farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que uma substância-tampão está presente em uma concentração de 5 - 250 mM.

12. Formulação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende:

3,15 mg/ml de cresol;

3,5 mg/ml de HMR 1964;

15 6,0 mg/ml de trometamol;

5,0 mg/ml de NaCl; e

0,01 mg/ml de polissorbato 20.

20 13. Processo para preparação de uma formulação farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que se misturam os componentes juntos em forma de soluções aquosas, em seguida ajusta-se o pH desejado e completa-se a mistura com água até o volume total.