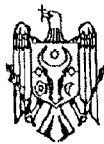




MD/EP 3233108 T2 2022.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3233108 (13) T2

(51) Int. Cl.: **A61K 38/28** (2006.01.01)
A61K 47/12 (2006.01.01)
A61P 3/10 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2017 0200 (22) Data de depozit: 2015.12.09 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 15817678.4, 2015.12.09 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3233108, 2017.10.25 (31) Numărul cererii prioritare: 201462092407 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2014.12.16 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 09/2022, 2022.09.30 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 13/2022, 2022.03.30 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 01/2018, 2018.01.31
(71) Solicitant: ELI LILLY AND COMPANY, US (72) Inventatori: AKERS Michael Patrick, US; MAJUMDAR Ranajoy, US; NGUYEN Chi A., US; PAAVOLA Chad D., US; SARIN Virender Kumar, US; SCHULTE Nanette Elizabeth, US (73) Titular: ELI LILLY AND COMPANY, US (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Compoziții de insulină care acționează rapid

(57) Rezumat:

1

Invenția este o compoziție de insulină umană sau analog de insulină care include concentrații specifice de citrat, clorură, în unele cazuri incluzând aditia de clorură de sodiu, zinc și, opțional, clorură de magneziu și/sau surfactant, și că are acțiune

2

farmacocinetică și/sau farmacodinamică mai rapidă decât a formulărilor comerciale ale produselor de analogi de insulină existente.

Secvențe: 5

Revendicări: 17

MD/EP 3233108 T2 2022.09.30

(54) Rapid-acting insulin compositions**(57) Abstract:**

1

The invention is a composition of human insulin or insulin analog that includes specific concentrations of citrate, chloride, in some cases including the addition of sodium chloride, zinc and, optionally, magnesium chloride and/or surfactant, and that has faster

2

pharmacokinetic and/or pharmacodynamic action than commercial formulations of existing insulin analog products.

Sequences: 5

Claims: 17

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

Prezenta invenție se referă la o compoziție de insulină farmaceutică pentru utilizare în tratamentul diabetului pentru a contracara excursiile glucozei postprandiale în sânge și pentru tratamentul acut al hiperglicemiei. Compoziția include insulină umană sau un analog de insulină, și concentrații specifice de citrat, în unele cazuri incluzând adăugarea de clorură de sodiu, zinc și, opțional, clorură de magneziu și/sau surfactant. Compoziția are o absorbție mai rapidă a insulinei din situsurile de injecție decât compozițiile comerciale de insulină existente. Compoziția este utilă pentru asigurarea activității insulinei în timpul mesei sau a unui tratament acut pentru hiperglicemie atunci când este necesară insulina.

Profilul de acțiune în timp al insulinei este important pentru controlarea nivelurilor de glucoză postprandială în sânge. La indivizii sănătoși, pancreasul secretă un impuls de insulină ca răspuns la alimentele absorbite, care conduce la niveluri crescute ale insulinei în sânge în câteva minute. La indivizii cu diabet de tip 1 și la anumiți indivizi cu diabet de tip 2, trebuie să le fie administrată insulină. Totuși, insulina administrată intră încet în sânge. Eliberarea inadecvată de insulină și debutul care este prea lent la începutul unei mese conduce la hiperglicemie în timpul sau imediat după masă. Durata de acțiune prea lungă și insulina excesivă între mese cauzează hipoglicemie postprandială.

Au existat eforturi anterioare de a reduce timpul de acțiune al produselor cu insulină. Eforturile timpurii de a dezvolta astfel de produse au inclus dezvoltarea de noi analogi de insulină „care acționează rapid”, cum ar fi insulina lispro (HUMALOG®), insulina aspart (NOVOLOG®), și insulina glulizină (APIDRA®). Insulina lispro și insulina aspart obțin acțiune rapidă prin modificări în secvențele de aminoacizi din secvențele catenelor de aminoacizi din insulina umană. Insulina glulizină include de asemenea modificări în secvențele catenelor de aminoacizi din insulina umană, și de asemenea îi lipsește zincul și nu formează hexameri de stabilizare. Analogii de insulină care acționează rapid au devenit disponibili în anii 1990 și la începutul anilor 2000. Chiar cu așa numiți analogi de insulină care acționează rapid, totuși, nivelul maxim de insulină nu este atins până la 50-90 minute după injecție. Acesta este mai lent decât insulina care este eliberată de un pancreas care funcționează normal și nu se potrivește întotdeauna cu profilele de absorbție ale carbohidraților.

O altă cale de a obține o acțiune rapidă care a fost explorată este utilizarea de ingrediente sau excipienți care îmbunătățesc profilul de acțiune în timp al insulinei când sunt furnizați în combinație cu insulina.

De exemplu, US2013/0231281 divulă compoziții apoase care cuprind o insulină și o anumită oligozaharidă, fie singure sau în combinație cu un compus polianionic. Compusul polianionic este un polimer anionic selectat din grupul constând din selecția din grupul constând din acid dextranmetilcarboxilic, acid poliglutamic, acid poliaspartic, PAA (acid poliacrilic), alginat, acid hialuronic, polimeri pe bază de acid glucuronic sau pe bază de acid galacturonic și sărurile lor, sau este un compus anionic selectat din grupul constând din acid citric, acid aspartic, acid glutamic, acid malic, acid tartric, acid succinic, acid adipic, acid oxalic, trifosfat, polifosfat, și sărurile lor. Într-o realizare, compusul polianionic este citrat de sodiu. Compuși polianionici sunt menționați ca îmbunătățind performanța compozițiilor care conțin oligozaharidă chiar atunci când oligozaharida singură sau compusul polianionic singur nu au nici un efect asupra acțiunii în timp. Nu este divulgat nici un rezultat al acțiunii în timp a insulinei pentru compozițiile care conțin citrat dar care nu au o oligozaharidă.

În plus, US2012/0178675 și US2014/0113856 divulă compoziții care conțin insulină în combinație cu un chelator de zinc cum ar fi acidul etilendiaminotetraacetic (EDTA) și care sunt descrise ca agenți de „dizolvare/stabilizare”, cum ar fi acidul citric sau citratul de sodiu. US2014/0113856 afirmă că studiile clinice timpurii pe astfel de compoziții au prezentat disconfort la locul injecției, și intenționează să crească tolerabilitatea la locul injecției prin adăugarea unui compus care conține magneziu. Astfel de compuși cu magneziu includ săruri anorganice, cum ar fi hidroxidul de magneziu, sulfatul de magneziu, clorura de magneziu, bromura de magneziu, iodura de magneziu, pirofosfatul de magneziu, sulfatul de magneziu heptahidrat și oxidul de magneziu; și săruri organice, cum ar fi EDTA de magneziu, lactat de magneziu, aspartat de magneziu, acetat de magneziu, carbonat de magneziu, citrat de magneziu, și gluconat de magneziu. US2012/0178675 și US2014/0113856 nu divulgă rezultatele acțiunii în timp a insulinei pentru compozițiile care conțin acid citric sau citrat dar nu conțin EDTA. Cu toate acestea, un poster din 2012 al destinatarului acelor aplicații, a comparat profilul de acțiune în timp al unei compoziții de insulină lispro care conține citrat și nu conține EDTA cu al compozițiilor care conțin concentrații variabile de EDTA și citrat, și acel poster afirmă că “[c]itratul singur în formulare este insuficient pentru a îmbunătăți profilul de absorbție [al insulinei lispro];” și că “[a]mbele chelarea zincului cu EDTA (pentru a grăbi dezasblarea hexamerului analogului de insulină mai puțin stabil) și citratul (pentru a masca sarcina suprafeței și preveni reagregarea) sunt necesare peste o concentrație de

prag pentru a ameliora rata de absorbție subcutanată". Roderike Pohl, și colab., „Development of Ultra-Rapid-Acting Prandial Insulin Analogs Requires Chelation of Zinc Ions and Charge Masking to Increase the Rate of Subcutaneous Absorption”, disponibile la http://files.shareholder.com/downloads/BIOD/3315705516x0x602912/3C955886-6AA4-4D66-BD33-3FFB4C906B25/EASD_Poster_September_2012_FINAL.pdf.

US2015/0065423 descrie compoziții care cuprind o peptidă și un agent vasodilatator (de exemplu, nitroglicerină) și, opțional, care sunt descrise ca „agenți de mascare ai sarcinii”, cum ar fi citratul, o diketopiperazină, un derivat de diketopiperazină, EDTA, di-arginină piperazină, o sare de piperazină diarginină, un izomer de piperazină di-arginină, un ester de piperazină di-arginină și orice combinație a acestora. Nu este divulgată nici o compoziție care conține citrat dar care nu are un agent vasodilatator.

Stadiul anterior al tehnicii, în mod colectiv, nu prezintă o formulare de insulină ultra rapidă cu excipienți și concentrațiile specifice ale acestora incluși în prezenta invenție.

În ciuda eforturilor descrise mai sus, rămâne o necesitate pentru compoziții de insulină, destinate pentru utilizare în timpul mesei, care au o absorbție mai rapidă a insulinei în sânge de la locul injectiei; debut mai rapid de acțiune decât produsele de insulină existente; și stabilitate chimică și fizică în timpul depozitării. Prezenta invenție urmărește să furnizeze compoziții care să îndeplinească aceste necesități.

Prezenții inventatori au descoperit în mod surprinzător că, compozițiile care conțin anumite concentrații de citrat au o absorbție a insulinei în sânge și/sau debut de acțiune mai rapide decât compozițiile disponibile comercial de insulină existente. Stabilitatea chimică și fizică a compozițiilor sub anumite condiții este menținută, fără eliminarea îmbunătățirilor de acțiune în timp, prin includerea în compoziții a anumitor concentrații de agenți pentru stabilizare, cum ar fi zinc, clorură de sodiu, și, opțional, clorură de magneziu și/sau surfactant.

Corespunzător, prezenta invenție furnizează compoziții farmaceutice cuprinzând insulină într-o concentrație de la aproximativ 100 până la aproximativ 200 IU/mL, citrat într-o concentrație de la aproximativ 15 până la aproximativ 35 mM, zinc într-o concentrație de la aproximativ 0,3 până la aproximativ 0,8 mM, și un conservant; și în care compoziția nu include EDTA sau orice oligozaharidă. În anumite realizări, compozițiile farmaceutice cuprind suplimentar clorură de magneziu într-o concentrație de până la aproximativ 5 mM.

Într-o altă realizare, prezenta invenție furnizează în general compoziții cuprinzând o insulină și concentrații specifice de citrat și agenți pentru stabilizare.

În anumite realizări, compozițiile farmaceutice din prezenta invenție cuprind insulină lispro, într-o concentrație de la aproximativ 100 până la aproximativ 200 IU/mL; citrat, într-o concentrație de la aproximativ 15 până la aproximativ 25 mM; clorură de magneziu, într-o concentrație de la aproximativ 3 până la aproximativ 8 mM; zinc, într-o concentrație de la aproximativ 0,3 până la aproximativ 0,8 mM; clorură totală, într-o concentrație de la aproximativ 20 până la aproximativ 25 mM; poloxamer 188, într-o concentrație de la aproximativ 0,06 până la aproximativ 0,09 % m/v; și metacresol, într-o concentrație de aproximativ 2,8 până la aproximativ 3,5 mg/mL; și în care pH-ul compoziției este de la aproximativ 7,0 până la 7,8.

În anumite realizări, compozițiile farmaceutice din prezenta invenție cuprind insulină lispro, într-o concentrație de la aproximativ 100 până la aproximativ 200 IU/mL; citrat, într-o concentrație de la aproximativ 15 până la aproximativ 25 mM; clorură de magneziu, într-o concentrație de la aproximativ 3 până la aproximativ 8 mM; zinc, într-o concentrație de la aproximativ 0,3 până la aproximativ 0,8 mM; clorură de sodiu, într-o concentrație de la aproximativ 1 până la aproximativ 20 mM; poloxamer 188, într-o concentrație de la aproximativ 0,06 până la aproximativ 0,09% m/v; și metacresol, într-o concentrație de la aproximativ 2,8 până la aproximativ 3,5 mg/mL; și în care pH-ul compoziției este de la aproximativ 7,0 până la 7,8.

În plus, prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică din prezenta invenție pentru utilizare în terapie. Mai special, prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică din prezenta invenție pentru utilizare în tratamentul diabetului.

În plus, prezenta invenție furnizează un articol de fabricare cuprinzând o compoziție farmaceutică din prezenta invenție. În particular, prezenta invenție furnizează un articol de fabricare cuprinzând o compoziție farmaceutică din prezenta invenție în care articolul de fabricare este o fiolă cu utilizări multiple. În particular, prezenta invenție furnizează un articol de fabricare cuprinzând o compoziție farmaceutică din prezenta invenție în care articolul de fabricare este un stilou injector reutilizabil. În particular, prezenta invenție furnizează un articol de fabricare cuprinzând o compoziție farmaceutică din prezenta invenție în care articolul de fabricare este un dispozitiv cu pompă pentru terapia de perfuzie subcutanată continuă cu insulină.

Într-o realizare, insulina este selectată din grupul constând din insulină umană, sau o variantă structurală, mutant, sau analog de insulină umană care acționează rapid, cum ar fi insulina lispro, insulina aspart sau insulina glulizină. Într-o realizare preferată, insulina este insulină lispro.

Într-o realizare, conservantul este selectat din grupul constând din fenol și meta-cresol. Preferabil, conservantul este meta-cresol. Într-o realizare, concentrația de meta-cresol este de la aproximativ 2,5 mg/mL până la aproximativ 3,8 mg/mL. Preferabil, concentrația de meta-cresol este de aproximativ 3,15 mg/mL.

5 Într-o realizare, compoziția cuprinde în plus un agent de tonicitate. Într-o realizare, agentul de tonicitate este glicerolul. În anumite realizări, concentrația de glicerol este de la aproximativ 1 până la aproximativ 16 mg/mL.

Într-o realizare, compoziția cuprinde în plus un tampon. În anumite realizări, tamponul este fosfat de sodiu.

10 În anumite realizări compoziția cuprinde în plus un agent suplimentar de stabilizare. În anumite realizări compoziția cuprinde în plus un surfactant.

Într-o realizare, pH-ul compoziției este de la aproximativ 7,0 până la aproximativ 7,8. În anumite realizări preferate, pH-ul compoziției este de la aproximativ 7,3 până la aproximativ 7,5. În anumite realizări preferate, pH-ul compoziției este de aproximativ 7,4.

15 În anumite realizări, compoziția farmaceutică prevede o absorbție a insulinei în sânge și/sau debutul de acțiune care este cu cel puțin 10%, cel puțin 20%, cel puțin 30%, cel puțin 40%, sau cel puțin 50% mai rapid decât pentru compozițiile de analogi de insulină care acționează rapid care nu conțin citrat, când s-a măsurat printr-unul sau mai mulți parametri farmacocinetici sau farmacodinamici relevanți pentru acțiunea în timp, cum ar fi: timpul până la concentrația maximă de insulină (T_{max}); timpul pentru a ajunge la jumătate din concentrația maximă de insulină ($\frac{1}{2} T_{max}$ timpuriu); timpul pentru a ajunge la jumătate din concentrația maximă de insulină în timpul fazei de scădere a curbei concentrației funcție de timp ($\frac{1}{2} T_{max}$ târziu); timpul între $\frac{1}{2} T_{max}$ timpuriu și târziu (T_{max} de răspândire); procentajul din doza totală de insulină absorbită la diferite momente de timp pe baza ariei fracționale de sub curba de concentrație a insulinei (de exemplu, $AUC_{0-30min}$, $AUC_{0-60min}$, $AUC_{0-120 min}$, $AUC_{0-180min}$); timpul pentru a ajunge la jumătate din concentrația totală de insulină (T_{50}); timpul pentru a ajunge la rata maximă de perfuzie cu glucoză (GIR_{max}), timpul pentru a ajunge la jumătate din rata maximă de perfuzie cu glucoză ($\frac{1}{2} GIR_{max}$ timpuriu); timpul pentru a ajunge la jumătate din rata maximă de perfuzie cu glucoză în timpul fazei de scădere a curbei concentrației în funcție de timp ($\frac{1}{2} GIR_{max}$ târziu); procentajul de glucoză totală perfuzată la diferite momente de timp pe baza ariei fracționale de sub curba GIR (de exemplu, $GIR_{0-30min}$, $GIR_{0-60min}$, $GIR_{0-120 min}$, $GIR_{0-180min}$).

În anumite realizări, compoziția farmaceutică prevede o absorbție a insulinei în sânge și/sau debutul de acțiune care este între 10% și 50% mai rapid decât pentru compozițiile de analogi de insulină care acționează rapid care nu conțin citrat, când s-a măsurat prin unul sau mai mulți parametri farmacocinetici sau farmacodinamici relevanți pentru acțiunea în timp, cum ar fi cei descriși mai sus.

35 În anumite realizări, compoziția farmaceutică este stabilă pentru a permite depozitarea de cel puțin 24 luni la 2-8°C. În anumite realizări, compoziția farmaceutică este stabilă pentru a permite utilizarea de până la 28 zile la temperaturi de până la 30°C pentru fiole sau cartușe în stilouri injectoare reutilizabile. În anumite realizări, compoziția farmaceutică este stabilă pentru a permite depozitarea de cel puțin 36 luni la 2-8°C. În anumite realizări, compoziția farmaceutică este stabilă pentru a permite utilizarea de până la 32 zile la temperaturi de până la 30°C pentru fiole sau cartușe în stilouri injectoare reutilizabile. În anumite realizări, compoziția este stabilă pentru a permite utilizarea într-un dispozitiv cu pompă pentru terapia prin perfuzie subcutanată continuă cu insulină terapie de până la 7 zile.

Într-o realizare, compoziția farmaceutică cuprinde insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 100 IU/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,3 mM; clorură de sodiu, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; clorură de magneziu, într-o concentrație de aproximativ 5 mM; metacresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL; și glicerol, într-o concentrație de aproximativ 7,6 mg/mL.

Într-o altă realizare, compoziția farmaceutică cuprinde insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 100 IU/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 25 mM; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,3 mM; clorură de sodiu, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; clorură de magneziu, într-o concentrație de aproximativ 5 mM; metacresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL; și glicerol, într-o concentrație de aproximativ 4,5 mg/mL.

Într-o altă realizare, compoziția farmaceutică cuprinde insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 100 IU/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 35 mM; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,3 mM; clorură de sodiu, într-o concentrație de aproximativ 23 mM; clorură de magneziu, într-o concentrație de aproximativ 5 mM; și metacresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL.

Într-o altă realizare, compoziția farmaceutică cuprinde insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 100 IU/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 25 mM; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,3 mM; clorură de sodiu, într-o concentrație de aproximativ 25 mM; și metacresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL.

Într-o altă realizare, compoziția farmaceutică cuprinde insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 100 IU/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,3 mM; clorură de sodiu, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; clorură de magneziu, într-o concentrație de aproximativ 5 mM; metacresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL; și glicerol, într-o concentrație de aproximativ 7,6 mg/mL; și în care compoziția farmaceutică prevede o absorbție a insulinei în sânge și/sau debutul de acțiune care este între 10% și 20%, între 20% și 30%, între 30% și 40% sau între 40% și 50% mai rapid decât pentru compozițiile de analogi de insulină care acționează rapid care nu conțin citrat, când s-a măsurat prin unul sau mai mulți parametri farmacocinetici sau farmacodinamici relevanți pentru acțiunea în timp, cum ar fi cei descriși mai sus.

Într-o altă realizare, compoziția farmaceutică cuprinde insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 100 IU/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 25 mM; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,3 mM; clorură de sodiu, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; clorură de magneziu, într-o concentrație de aproximativ 5 mM; metacresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL; și glicerol, într-o concentrație de aproximativ 4,5 mg/mL; și în care compoziția farmaceutică prevede o absorbție a insulinei în sânge și/sau debutul de acțiune care este între 10% și 50% mai rapid decât pentru compoziții de analogi de insulină care acționează rapid care nu conțin citrat, când s-a măsurat prin unul sau mai mulți parametri farmacocinetici sau farmacodinamici relevanți pentru acțiunea în timp, cum ar fi cei descriși mai sus.

Într-o altă realizare, compoziția farmaceutică cuprinde insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 100 IU/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 35 mM; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,3 mM; clorură de sodiu, într-o concentrație de aproximativ 23 mM; clorură de magneziu, într-o concentrație de aproximativ 5 mM; și metacresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL; și în care compoziția farmaceutică prevede o absorbție a insulinei în sânge și/sau debutul de acțiune care este între 10% și 50% mai rapid decât pentru compoziții de analogi de insulină care acționează rapid care nu conțin citrat, când s-a măsurat prin unul sau mai mulți parametri farmacocinetici sau farmacodinamici relevanți pentru acțiunea în timp, cum ar fi cei descriși mai sus.

Într-o altă realizare, compoziția farmaceutică cuprinde insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 100 IU/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 25 mM; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,3 mM; clorură de sodiu, într-o concentrație de aproximativ 25 mM; și metacresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL; și în care compoziția farmaceutică prevede o absorbție a insulinei în sânge și/sau debutul de acțiune care este între 10% și 50% mai rapid decât pentru compoziții de analogi de insulină care acționează rapid care nu conțin citrat, când s-a măsurat prin unul sau mai mulți parametri farmacocinetici sau farmacodinamici relevanți pentru acțiunea în timp, cum ar fi cei descriși mai sus.

Când este utilizat aici, termenul „compoziție“ se referă la o combinație dintre insulină și celelalte ingrediente sau excipienți în care insulina și alte ingrediente sau excipienți sunt combinate într-o singură formulare combinată.

Când este utilizat aici, „insulină“ înseamnă insulină umană sau o variantă structurală, mutant, sau analog de insulină umană care acționează rapid, care are activitate funcțională de debut mai rapid de acțiune decât insulina umană. Analogi particulari de insulină umană care acționează rapid sunt insulina lispro, insulina aspart, și insulina glulizină. Insulina pentru produsele comerciale poate fi produsă utilizând metode de ADN recombinant sau prin sinteză chimică. Metodele recombinante sunt bine cunoscute și sunt puternic preferate. O moleculă de insulină umană (CAS nr. 11061-68-0) constă din două catene de aminoacizi, A și B, ale căror secvențe sunt bine cunoscute.

Catena A de insulină umană are următoarea secvență de aminoacizi: Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn (SEQ ID NO: 1).

Catena B de insulină umană are următoarea secvență de aminoacizi: Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr (SEQ ID NO: 2).

Catenele sunt îmbinate prin două legături disulfură: CysA7-CysB7 și CysA20-CysB19. Catena A are o legătură disulfură intracatenară la CysA6-CysA11. Insulina umană are formula empirică $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ și o masă moleculară de 5808.

Insulina lispro, substanța medicamentoasă din HUMALOG[®], este identică cu insulina umană în termeni ai secvenței sale primare de aminoacizi cu excepția unei inversiuni a secvenței prolină-lizina naturale pe catena B la pozițiile 28 și 29 (insulină umană 28^B-L-Lizină-29^B-L-prolină). S-a arătat că insulina lispro (CAS nr. 133107-64-9) este echipotentă cu insulina umană pe o bază molară, dar efectul său după injecția subcutanată este mai rapid și de mai scurtă durată decât cel al insulinei umane solubile injectate. HUMALOG[®] conține m-cresol ca conservant și un agent stabilizator, un modulator de tonicitate (glicerol), un agent de tamponare (fosfat de sodiu dibazic), un stabilizator (oxid de zinc) și ajustare a pH-ului pentru vehicul.

O moleculă de insulină lispro constă din catena A de insulină umană (SEQ ID nr. 1) reticulată cu catena B de insulină lispro, a cărei secvență de aminoacizi este dată de SEQ ID NO:3, de mai jos: Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr (SEQ ID NO: 3).

Formula chimică a insulinei lispro este $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ și masa sa moleculară este de aproximativ 5808. O unitate de insulină lispro este echivalentă cu până la 0,0347 mg insulină lispro.

Insulina aspart (CAS nr. 116094-23-6), substanța medicamentoasă din NOVLOG[®], este un alt analog de insulină cu debut rapid. Structura sa constă din catena A de insulină umană (SEQ ID nr. 1) și o catenă B în care Pro la B28 este înlocuit cu Asp (insulină umană Pro-B28-Asp), cum se reflectă în următoarea secvență de aminoacizi:

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Thr (SEQ ID NO: 4).

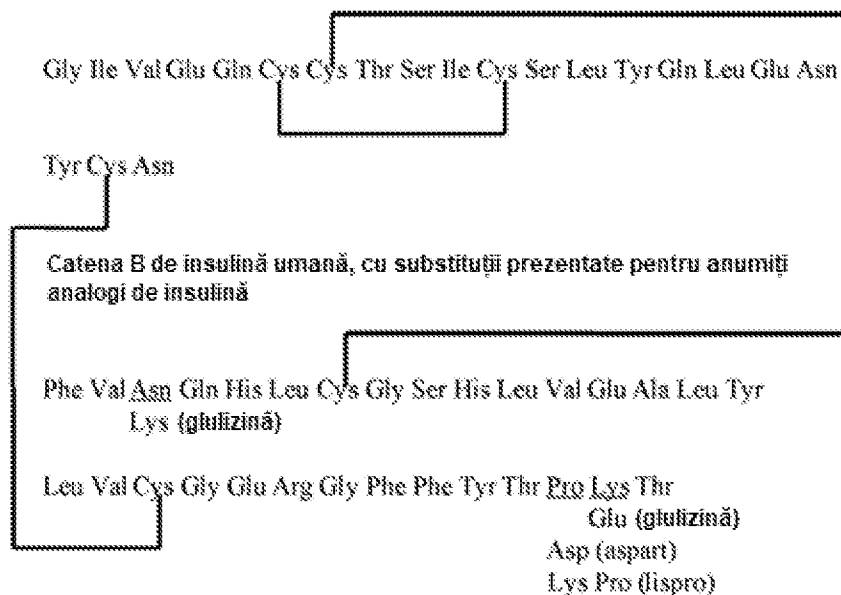
Insulina aspart (28^B acid aspartic-insulină umană) are formula empirică $C_{256}H_{381}N_{65}O_{79}S_6$ și o masă moleculară de aproximativ 5826. O unitate de insulină aspart corespunde până la 6 nmol, corespunzător cu 0,035 mg insulină aspart anhidră fără sare.

Insulina glulizină (CAS nr. 207748-29-6), substanța medicamentoasă din APIDRA[®], este încă un alt analog de insulină cu debut rapid. O moleculă de insulină glulizină constă din catena A de insulină umană (SEQ ID nr. 1) și o catenă B modificată (Asn-B3-Lys, Lys-B29-Glu) comparativ cu insulina umană, cum se reflectă în următoarea secvență de aminoacizi: Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr (SEQ ID NO: 5).

Insulina glulizină (3^B-lizină-29^B-acid glutamic-insulină umană) are formula empirică $C_{258}H_{384}N_{64}O_{78}S_6$ și o masă moleculară de 5823. O unitate de insulină glulizină corespunde cu aproximativ până la 0,0349 mg de insulină glulizină.

Următoarele scheme ilustrează secvențele de aminoacizi și legăturile disulfură ale insulinei umane și ale analogilor de insulină care acționează rapid care sunt în prezent aprobați pentru utilizare în tratarea excursiilor glucozei din sânge în timpul mesei:

Catena A de insulină umană



Compozițiile prezentei invenții au concentrații de insulină de la aproximativ 100 până la aproximativ 200 IU/mL. Anumite compoziții cuprind aproximativ 100 IU/mL. Anumite compoziții cuprind aproximativ 200 IU/mL.

Îmbunătățirile în profilul de acțiune în timp al analogilor de insulină referiți mai sus demonstrate în prezenta invenție sunt obținute prin utilizarea anumitor concentrații specifice de citrat și fără necesitatea nici unui agent chelator suplimentar, cum ar fi cei descriși în US2012/0178675 și US2014/0113856 (de exemplu, EDTA), nici unui agent vasodilatator suplimentar, cum ar fi cei descriși în US2015/0065423 (de exemplu, nitroglicerină), sau nici unei alte oligozaharide, cum ar fi cele descrise în US2013/0231281.

Ionul citrat are denumirea chimică 2-hidroxipropan-1,2,3-tricarboxilat, formula moleculară $C_6H_5O_7^{-3}$, și masă moleculară de 189. Ionul citrat este distribuit pe larg în plante și animale și este o componentă care apare natural a dietei. Este un metabolit comun în metabolismul oxidativ și o

componentă importantă a osului. Un număr de citrați sunt GRAS (priviți în general ca siguri) de către Administrația Alimentelor și Medicamentelor din S.U.A pentru utilizare în alimente, incluzând următoarele:

Substanță GRAS	Formula (m.w.)	CAS nr.	21 CFR
Acid citric	$C_6H_8O_7$ (192,12)	77-92-9	184,1033
Citrat de sodiu	$C_6H_5Na_3O_7$ (258,07)	68-04-2	184,1751
Citrat de potasiu monohidrat	$C_6H_5O_7K_3$ (324,41)	6100-05-6	184,1625

Diferiți compuși care conțin citrat sunt de asemenea incluși ca ingrediente în produsele medicamentoase parenterale în conformitate cu baza de date de ingrediente inactive a Administrației Alimentelor și Medicamentelor din S.U.A., incluzând de exemplu, acid citric, acid citric monohidrat, acid citric anhidru, citrat de sodiu, citrat de trisodiu anhidru, citrat de trisodiu dihidrat. Compusul citrat particular utilizat în compozițiile prezentei invenții poate fi forma acidică sau diferite forme de sare, în special săruri alcaline (de exemplu, sodiu și potasiu) și/sau mono sau dihidrați ai acestora. Dintre acestea, este preferat citratul de sodiu. În unele realizări, concentrația de citrat în compozițiile prezentei invenții variază de la aproximativ 15 mM până la aproximativ 35 mM. În realizările preferate, concentrația de citrat variază de la aproximativ 15 până la aproximativ 30 mM. În anumite realizări preferate, concentrația de citrat variază de la aproximativ 15 până la aproximativ 25 mM. În anumite realizări, concentrația de citrat variază de la aproximativ 15 până la aproximativ 20 sau de la aproximativ 20 până la aproximativ 25 mM. Anumite compoziții au concentrații de citrat de aproximativ 15, aproximativ 20, aproximativ 25, aproximativ 30 sau 35 mM.

Deși s-a descoperit că adăugarea de citrat conduce la îmbunătățiri ale acțiunii în timp, adăugarea de citrat conduce de asemenea la pasivități mai mari din punctul de vedere al stabilității. Astfel, pentru a avea o stabilitate suficientă chimică și fizică pentru depozitarea pe termen lung și utilizare, compozițiile prezentei invenții cuprind suplimentar agenți de stabilizare, cum ar fi zinc, magneziu, clorură și surfactanți.

Oxidul de zinc poate fi adăugat pentru a furniza stoichiometria dorită a ionilor de zinc. Hexamerii de insulină au 2 situsuri specifice de legare a zincului de afinitate ridicată. Ionii de zinc încorporați în astfel de hexameri sunt cei la care se face uneori referire ca zinc „legat”. Formulările care conțin zinc disponibile în prezent includ între aproximativ 2 și 4 ioni de zinc pe hexamer de insulină. Unele compoziții comerciale de insulină au aproximativ 2,4 ioni de zinc la șase molecule de insulină (HUMULIN® R U-500), și unele au aproximativ 3,0 ioni de zinc la șase molecule de insulină (HUMALOG®, NOVOLOG®). Formulările 100 U/mL de insulină lispro (HUMALOG®) și insulină aspart (NOVOLOG®) au aproximativ 3,0 ioni de zinc la șase molecule de insulină, care corespund cu o concentrație de aproximativ 0,3 mM. Formulările de 200 U/ml disponibile în prezent de HUMALOG® au aproximativ 3,5 ioni de zinc la șase molecule de insulină, care corespund cu o concentrație de zinc de aproximativ 0,7 mM. Formularea de 100 U/ml disponibilă în prezent de insulină umană vândută de Eli Lilly and Company (HUMULIN® R) conține aproximativ 2,3 ioni de zinc la șase molecule de insulină, care corespunde cu o concentrație de zinc de aproximativ 0,23 mM.

Compozițiile prezentei invenții au o concentrație de zinc suficientă pentru a furniza cel puțin suficienți ioni de zinc pentru moleculele de insulină pentru a forma hexameri de stabilizare. Astfel, compozițiile prezentei invenții trebuie să includă suficient zinc pentru a furniza cel puțin 2 ioni de zinc pe hexamer de insulină. Compozițiile prezentei invenții au o concentrație de zinc de la aproximativ 0,3 mM până la aproximativ 0,8 mM. Când concentrația de insulină este 100 IU/mL, concentrația de zinc în anumite realizări din prezenta invenție este de aproximativ 0,3 mM (aproximativ 3,0 Zn ioni/șase molecule de insulină). Pentru concentrații de insulină de aproximativ 100 U/mL, aproximativ 200 U/mL, aproximativ 300 U/mL sau aproximativ 500 U/mL, concentrația minimă de zinc necesară pentru a furniza 2 ioni de zinc pe hexamer de insulină ar fi de aproximativ 0,2 mM, aproximativ 0,4 mM, aproximativ 0,6 mM sau respectiv aproximativ 1 mM.

Includerea de exces de zinc - adică, mai mult zinc decât ar fi legat în hexamerii de insulină - poate fi utilizată pentru a stabiliza suplimentar compozițiile prezentei invenții. Astfel zincul este uneori cel la care se face referire ca zinc „liber” sau „nelegat”. În anumite compoziții ale prezentei invenții, includerea excesului de zinc liber sau nelegat a fost găsită ca având un efect de stabilizare. Compozițiile având aproximativ 100 U/mL de insulină lispro și concentrații de zinc de până la aproximativ 1 mM - care ar constitui aproximativ 0,2 mM legat și aproximativ 0,8 mM nelegat sau zinc liber - au fost găsite ambele că acționează rapid și stabil. Includerea de prea mult zinc liber sau nelegat, totuși, poate atenua îmbunătățirile acțiunii în timp. De exemplu, o compoziție având aproximativ 100 U/mL de insulină lispro cu o concentrație de zinc de aproximativ 5 mM - care ar constitui aproximativ 4,8 mM zinc nelegat - a fost găsită că nu are îmbunătățirile de acțiune în timp văzute la compozițiile cu concentrații mai scăzute

de zinc. În anumite realizări, concentrația de zinc este de aproximativ 0,6, aproximativ 0,7, sau aproximativ 0,8 mM.

Includerea de magneziu (Mg^{+2}) în compozițiile prezentei invenții a fost de asemenea găsită ca având un efect de stabilizare. Ionii de magneziu pot fi furnizați într-o varietate de maniere, cum ar fi prin adăugarea de clorură de magneziu, care are o formulă moleculară de $MgCl_2$ și masa moleculară de 95,211.

În timp ce magneziul poate avea efecte de stabilizare în anumite compoziții, concentrațiile care depășesc concentrația de citrat vor conduce la precipitarea insulinei. Astfel, cantitatea maximă de magneziu care poate fi inclusă este limitată de cantitatea de citrat care este inclusă. De exemplu, când $MgCl_2$ a utilizat un agent de stabilizare în compozițiile prezentei invenții, raportul molar dintre magneziu și citrat variază de la aproximativ 1:10 până la aproximativ 1:2. Preferabil raportul molar dintre clorura de magneziu și citrat variază de la aproximativ 1:5 până la aproximativ 1:3. Astfel, de exemplu, pentru a obține un raport molar dintre magneziu și citrat de la aproximativ 1:10 până la aproximativ 1:2 într-o compoziție în care concentrația de citrat este între aproximativ 10 până la aproximativ 30 mM, concentrația de magneziu ar fi între aproximativ 1 și aproximativ 15 mM. În mod similar, pentru a obține un raport molar dintre magneziu și citrat de aproximativ 1:5 până la aproximativ 1:3 într-o compoziție în care concentrația de citrat este 25 mM, concentrația de magneziu ar varia de la 5 până la 8,3 mM. În anumite realizări, concentrația de magneziu variază de la aproximativ 1 până la aproximativ 15 mM. În anumite realizări, concentrația de magneziu variază de la aproximativ 1 până la aproximativ 5, de la aproximativ 5 până la aproximativ 10 sau de la aproximativ 10 până la aproximativ 15 mM. Concentrația de clorură de magneziu în anumite realizări din prezenta invenție variază de la 1 până la aproximativ 5 mM (~0,48 mg/mL). În anumite realizări, concentrația de magneziu este de aproximativ 5 mM.

Includerea anumitor concentrații de ioni de clorură (Cl^-) în compoziții ale prezentei invenții a fost de asemenea găsită ca având un efect de stabilizare. Ionii de clorură pot fi furnizați într-o varietate de maniere, inclusiv prin utilizarea de $MgCl_2$ pentru a furniza magneziu, cum s-a descris mai sus, sau prin adăugarea de clorură de sodiu. Compozițiile anumitor realizări din prezenta invenție cuprind clorură de sodiu. Formula moleculară a clorurii de sodiu este $NaCl$ și masa sa moleculară este 58,44. Clorura de sodiu este utilizată în unele formulări disponibile în prezent de analogi de insulină care acționează rapid, cum ar fi APIDRA® (insulină glulizină), care cuprinde 5 mg/mL clorură de sodiu, NOVOLOG® (insulină aspart), care cuprinde 0,58 mg/mL clorură de sodiu.

În timp ce adăugarea anumitor cantități de clorură, de exemplu, prin includerea în compoziție a excipienților care conțin clorură cum ar fi $MgCl_2$ sau $NaCl$, a fost găsită ca având un efect de stabilizare, dacă conținutul total de clorură al compoziției este prea ridicat, insulina din compoziție poate cristaliza la temperaturi scăzute. Astfel, conținutul total de clorură al compoziției trebuie să fie luat în considerare.

Pentru a determina conținutul total de clorură al unei compoziții, cineva trebuie să ia în considerare nu doar ionii de clorură care pot fi adăugați la compoziție prin adăugarea de clorură de magneziu și/sau clorură de sodiu ca agenți pentru stabilizare, ci de asemenea prin adăugarea de alte componente, de exemplu cu ingredientul activ farmaceutic de insulină în vrac (API), prin adăugarea de cantități mici de HCl care pot fi necesare pentru ajustări ale pH-ului, și/sau în legătură cu furnizarea de Zn, care poate fi adăugat în formă de o soluție preparată prin solubilizarea oxidului de zinc (ZnO) cu HCl.

În anumite realizări, clorura de sodiu este utilizată pentru a furniza cantitatea de clorură suplimentară necesară pentru a atinge concentrația țintă de clorură sau intervalul de concentrație - adică, cantitatea de clorură de sodiu care trebuie adăugată este determinată scăzând din concentrația țintă de clorură cantitatea de clorură furnizată prin adăugarea de alte componente, cum ar fi prin adăugarea de insulină API, clorură de magneziu și/sau orice HCl care ar putea fi necesar pentru ajustări ale pH-ului și/sau solubilizarea oxidului de zinc. De exemplu, dacă concentrația țintă de clorură dintr-o formulare este de aproximativ 20 mM, și 15 mM de clorură este prevăzută într-o combinație de insulină vrac API, clorură de magneziu, și HCl utilizat pentru ajustări ale pH-ului, trebuie să se adauge 5 mM de clorură de sodiu. Persoanele calificate în domeniu vor înțelege că cantitatea de clorură de sodiu care trebuie să fie adăugată în astfel de formulări poate fi determinată prin: (1) fie calculând prospectiv cantitatea de clorură suplimentară care va fi necesară pe baza conținutului teoretic de clorură adăugată prin alte surse; sau (2) fie preparând o formulare a tuturor excipienților cu excepția clorurii de sodiu, măsurând conținutul de clorură al acelei formulări, și calculând diferența între acea cantitate și concentrația țintă de clorură sau intervalul de concentrație. Conținutul de clorură al unei formulări apoase poate fi măsurat utilizând o varietate de tehnici cunoscute, cum ar fi prin titrare sau metode cu lelectrozi selectivi de ioni.

În plus, s-a descoperit de asemenea că problemele de cristalizare la temperatură scăzută asociate cu concentrațiile de clorură relativ ridicate sunt sensibile la concentrațiile de citrat. Astfel, compozițiile prezentei invenții având concentrații de citrat la capătul inferior al intervalului prevăzut aici, pot fi mai tolerante la concentrații de clorură relativ mai ridicate decât compozițiile care au concentrații de citrat la capătul superior al intervalului prevăzut aici. De exemplu, s-a observat că adăugarea de concentrații de clorură de sodiu de până la 50-75 mM la formulări care conțin 25 mM citrat conduce la probleme de

cristalizare la temperatură scăzută, dar astfel de probleme nu sunt observate consistent nici când 50 mM clorură de sodiu se adaugă la o formulare citrat de 15 mM sau nici când 25 mM clorură de sodiu se adaugă la o formulare citrat de 25 mM.

Din motive de claritate, când s-au utilizat aici, termenii „clorură” sau „total clorură” se referă la cantitatea totală de ioni de clorură dintr-o compoziție furnizată în legătură cu adăugarea oricărei componente, de exemplu, sursele de ioni de clorură dintr-o compoziție care este declarată că cuprinde 25 mM clorură sau total clorură includ orice clorură furnizată prin adăugarea de $MgCl_2$, $NaCl$ și/sau orice HCl necesar pentru ajustări ale pH-ului sau solubilizarea de ZnO . Pe de altă parte, termenii „clorură de magneziu”, „ $MgCl_2$ ”, „clorură de sodiu” și „ $NaCl$ ” se referă la cantitatea din aceste săruri particulare care se adaugă la o compoziție. Astfel, într-o compoziție care este descrisă ca cuprinzând 5 mM clorură de magneziu și 10 mM clorură de sodiu, de exemplu, concentrația de clorură, sau de total clorură, include cantitatea combinată de ioni de clorură furnizați de către clorura de magneziu, clorura de sodiu și orice altă sursă, cum ar fi HCl .

În anumite realizări din prezenta invenție, concentrația totală de clorură variază de la aproximativ 10 până la aproximativ 60 mM. În anumite realizări, concentrația totală de clorură variază de la aproximativ 15 până la aproximativ 35 mM. În anumite realizări, concentrația totală de clorură variază de la aproximativ 20 până la aproximativ 25 mM. În anumite realizări, concentrația totală de clorură este de aproximativ 20 mM, aproximativ 21 mM, aproximativ 22 mM, aproximativ 23 mM, aproximativ 24 mM sau aproximativ 25 mM.

În anumite realizări din prezenta invenție, compoziția cuprinde clorură de sodiu într-o concentrație care variază de la aproximativ 1 până la aproximativ 50 mM. În anumite realizări, concentrația de clorură de sodiu este de la aproximativ 1 până la aproximativ 25 mM. În anumite realizări, concentrația de clorură de sodiu variază de la aproximativ 1 până la aproximativ 20 mM. Concentrația de clorură de sodiu în anumite realizări din prezenta invenție variază de la aproximativ 15 mM (~0,88 mg/mL) până la aproximativ 25 mM (~2,0 mg/mL). În anumite realizări, concentrația de clorură de sodiu este de aproximativ 1, aproximativ 2, aproximativ 3, aproximativ 4, aproximativ 5, aproximativ 6, aproximativ 7, aproximativ 8, aproximativ 9, aproximativ 10, aproximativ 11, aproximativ 12, aproximativ 13, aproximativ 14, aproximativ 15, aproximativ 16, aproximativ 17, aproximativ 18, aproximativ 19 sau aproximativ 20 mM.

Dacă necesar pentru a obține suficientă stabilitate chimică și fizică, compoziția poate cuprinde suplimentar unul sau mai mulți agenți suplimentari pentru stabilizare. Exemplele de agenți pentru stabilizare includ surfactanții. S-a descoperit în mod surprinzător că combinațiile de surfactanți și magneziu ca agenți pentru stabilizare pot avea efecte stabilizatoare mai mari decât aditive sau sinergice în compozițiile prezentei invenții.

Exemplele de surfactanți divulgate pentru utilizare în compozițiile farmaceutice parenterale includ polisorbati, cum ar fi polisorbitat 20 (TWEEN® 20), polietilen glicoli cum ar fi PEG 400, PEG 3000, TRITON™ X-100, polietilen glicoli cum ar fi polioxietilen (23) lauril eter (număr CAS: 9002-92-0, vândut sub numele comercial BRIJ®), acizi grași alcoilați, cum ar fi MYRJ™, polipropilen glicoli, copolimeri bloc cum ar fi poloxamerul 188 (număr CAS 9003-11-6, vândut sub numele comercial PLURONIC® F-68) și poloxamerul 407 (PLURONIC® F127), sorbitan alchil ester (de exemplu, SPAN®), ulei de ricin polietoxilat (de exemplu, KOLLIPHOR®, CREMOFOR®) și trehaloză și derivați ai acesteia, cum ar fi trehaloză laurat ester. În anumite realizări, surfactantul este selectat din grupul constând din polioxietilen (23) lauril eter, poloxamer 188 și trehaloză laurat ester. Un surfactant preferat este poloxamerul 188. În anumite realizări, concentrația de surfactant, cum ar fi poloxamerul 188, variază de la aproximativ 0,001 până la aproximativ 2% m/v, de la aproximativ 0,001 până la aproximativ 0,2% m/v, de la aproximativ 0,03 până la aproximativ 0,12% m/v, sau de la aproximativ 0,06 până la aproximativ 0,09% m/v. În anumite realizări, concentrația de poloxamer 188 este de aproximativ 0,06, aproximativ 0,07, aproximativ 0,08 sau aproximativ 0,09 % m/v.

În plus, compozițiile prezentei invenții includ unul sau mai mulți conservanți, care asigură proprietăți antimicrobiene și pot asigura beneficii suplimentare de stabilitate. Compozițiile sunt sterile când sunt produse pentru prima dată, totuși, când compoziția este prevăzută într-o fiolă sau cartuș cu utilizări multiple, un compus antimicrobian conservant sau amestec de compuși care este compatibil cu celelalte componente ale formulării sunt de obicei adăugați la o rezistență suficientă pentru a îndeplini cerințele reglatoare și de conservare antimicrobiene farmacopiale. Vezi U.S. Pharmacopeia Monographs. Insulin lispro injection. USP29-NF24; British Pharmacopeia Monographs 2008 Volume III: Insulin aspart injection; U.S. Pharmacopeia Monographs. Insulin assays; și U.S. Pharmacopeia General chapters. USP29-NF24. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention; 2005. Antimicrobial effectiveness testing; pp. 2499-2500. Conservanții preferați sunt acizii aril și compușii fenolici, sau amestecuri de astfel de compuși.

Compozițiile prezentei invenții include astfel unul sau mai mulți conservanți. Concentrațiile eficiente pot fi constatăte cu ușurință utilizând metodele referențiate mai sus. Conservanții utilizați în mod

obișnuit în produsele cu insulină includ fenol (nr. CAS 108-95-2, formulă moleculară C_6H_5OH , masă moleculară 94,11.), și m-cresol (nr. CAS 108-39-4, molecular formula C_7H_8O , masă moleculară 108,14). Compozițiile comerciale prezente, de exemplu, conțin 3,15 mg/mL m-cresol (HUMALOG® și APIDRA®), 1,72 mg/mL m-cresol și 1,50 mg/mL fenol (NOVOLOG®), și 2,5 mg/mL m-cresol (HUMULIN® R U-500). Compozițiile prezentei invenții includ unul sau mai mulți conservanți. Într-o realizare conservantul este selectat din grupul constând din fenol și metacresol și amestecuri ale acestora. Preferabil conservantul este metacresol. În anumite realizări concentrația de metacresol este de la aproximativ 2,5 mg/mL până la aproximativ 3,8 mg/mL. Preferabil concentrația de metacresol este de aproximativ 3,15 mg/mL.

Este de dorit să se potrivească aproximativ tonicitatea (adică, osmolalitatea) fluidelor corporale la locul injectiei cât mai aproape posibil când administrarea compozițiilor datorate soluțiilor care nu sunt aproximativ izotonice cu fluidele corporale poate produce o senzație de usturime dureroasă când se administrează. Astfel, este de dorit ca compozițiile să fie aproximativ izotonice cu fluidele corporale la locurile de injecție. Dacă osmolalitatea unei compoziții în absența unui agent de tonicitate este suficient de scăzută față de osmolalitatea țesutului (pentru sânge, aproximativ 300 mOsmol/kg; cerința Farmacopeei Europene pentru osmolalitate este > 240 mOsmol/kg), apoi un agent de tonicitate ar trebui să fie în general adăugat pentru a crește tonicitatea compoziției până la aproximativ 300 mOsmol/kg. Agenții tipici pentru tonicitate sunt glicerolul (glicerină) și clorura de sodiu. Dacă adăugarea unui agent de tonicitate este necesară, este preferat glicerolul. Cantitatea de agent de tonicitate care se adaugă este cu ușurință determinată utilizând tehnici standard. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, David B. Troy și Paul Beringer, eds., Lippincott Williams & Wilkins, 2006, pp. 257-259; Remington: Essentials of Pharmaceutics, Linda Ed Felton, Pharmaceutical Press, 2013, pag. 277-300. În anumite realizări concentrația de glicerol este de la aproximativ 1 până la aproximativ 16 mg/mL.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică este stabilă sub condiții de depozitare și utilizare. Când s-a utilizat aici, termenul „stabil” se referă la ambele stabilități chimică și fizică, cum s-a indicat, de exemplu, printr-o pierdere a potenței insulinei de mai puțin de 5%, formarea de A-21 desamido a nu mai mult de 1,5%, dezvoltarea de substanțe altele decât insulină și A-21 desamido (la care se face referire colectiv ca alte substanțe înrudite (ORS)) de nu mai mult de 4%, formarea de masă moleculară mare (HMW) de mai puțin de 1,5 %, și întreținerea unei soluții clare și incolore fără precipitate. Astfel de proprietăți pot fi măsurate prin tehnici cunoscute, incluzându-le de exemplu, pe cele rezumate în studiile descrise mai jos. În anumite realizări, compoziția farmaceutică este stabilă pentru a permite depozitarea pe cel puțin 24 luni la 2-8°C. În anumite realizări, compoziția farmaceutică este stabilă pentru a permite utilizarea până la 28 zile la temperaturi de până la 30°C pentru fiole sau cartușe în stilouri injectoare reutilizabile. În anumite realizări, compoziția farmaceutică este stabilă pentru a permite depozitarea pe cel puțin 36 luni la 2-8°C. În anumite realizări, compoziția farmaceutică este stabilă pentru a permite utilizarea până la 32 zile la temperaturi de până la 30°C pentru fiolele sau cartușele din stilourile injectoare reutilizabile. În anumite realizări, compoziția este stabilă pentru a permite utilizarea într-un dispozitiv cu pompă pentru terapia prin perfuzie subcutanată continuă cu insulină de până la 7 zile.

Citratul, care cum s-a notat mai sus se adaugă pentru a contribui la îmbunătățirile acțiunii în timp, este de asemenea cunoscut că are proprietăți de tamponare la anumite niveluri de pH, dar dacă se dorește, poate fi inclus un compus de tamponare suplimentar. Exemple de astfel de compuși de tamponare sunt tampoane fosfat, cum ar fi fosfat de sodiu dibazic, sau acetat de sodiu și tris(hidroximetil)aminometan (TRIS). Tampoanele fosfat sau TRIS sunt preferate. PH-ul pentru compozițiile comerciale cu insulină este uzual în intervalul de la 7,2 până la 7,6, cu $7,4 \pm 0,1$ ca pH țintă comun. PH-ul compozițiilor prezentei invenții este de obicei de la 7,0 până la 7,8 și este ajustat utilizând acizi și baze adecvate fiziologic, de obicei acid clorhidric 10% și hidroxid de sodiu 10%. Preferabil, pH-ul este de aproximativ 7,4.

Calea de administrare pentru compozițiile prezentei invenții va fi de obicei prin injecție subcutanată autoadministrată, de exemplu, prin utilizarea unei seringi sau a unui dispozitiv stilou, sau prin terapie prin perfuzie subcutanată continuă cu insulină cu un dispozitiv cu pompă pentru insulină, deși pot fi de asemenea utilizate căile intravenoasă, intradermală, sau intraperitoneală. Preferabil, calea de administrare este prin injecție subcutanată autoadministrată. Doza de agent activ injectat va fi determinată de către pacient în consultație cu medicul pacientului.

Realizările suplimentare din prezenta invenție le include pe cele descrise mai jos:

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care insulina este selectată din grupul constând din insulină umană, insulină lispro, insulină aspart sau insulină glulizonă.

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care insulina este insulină lispro.

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de insulină este de aproximativ 100 U/mL.

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de citrat este de la aproximativ 15 până la aproximativ 30 mM.

- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de citrat este de la aproximativ 15 până la aproximativ 25 mM.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de citrat este de la aproximativ 15 până la aproximativ 20 mM.
- 5 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de citrat este de la aproximativ 20 până la aproximativ 25 mM.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care raportul molar dintre magneziu și citrat este de la aproximativ 1:10 până la aproximativ 1:2.
- 10 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care raportul molar dintre magneziu și citrat este de la aproximativ 1:5 până la aproximativ 1:3.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de magneziu este de la aproximativ 1 până la aproximativ 15 mM.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de magneziu este de la aproximativ 1 până la aproximativ 5 mM.
- 15 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de magneziu este de la aproximativ 5 până la aproximativ 10 mM.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de magneziu este de la aproximativ 10 până la aproximativ 15 mM.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de magneziu este de la aproximativ 3 până la aproximativ 8 mM.
- 20 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de magneziu este prevăzută prin includerea de clorură de magneziu.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația totală de clorură este de la aproximativ 10 până la aproximativ 60 mM.
- 25 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația totală de clorură este de la aproximativ 15 până la aproximativ 35 mM.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația totală de clorură este de la aproximativ 15 până la aproximativ 30 mM.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația totală de clorură este de la aproximativ 20 până la aproximativ 25 mM.
- 30 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția cuprinde clorură de sodiu într-o concentrație care variază de la aproximativ 1 până la aproximativ 50 mM.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția cuprinde clorură de sodiu într-o concentrație care variază de la aproximativ 1 până la aproximativ 25 mM.
- 35 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția cuprinde clorură de sodiu într-o concentrație care variază de la aproximativ 1 până la aproximativ 20 mM.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de surfactant este de la aproximativ 0,001 până la aproximativ 0,2 % m/v.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care surfactantul este poloxamer 188.
- 40 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de poloxamer 188 este de la aproximativ 0,003 până la aproximativ 0,2 % m/v.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de poloxamer 188 este de la aproximativ 0,03 până la aproximativ 0,12 % m/v.
- 45 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrație de poloxamer 188 este de la aproximativ 0,06 până la aproximativ 0,09 % m/v.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care conservantul este selectat din grupul constând din fenol și metacresol.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care conservantul este metacresol.
- 50 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care concentrația de metacresol este de la aproximativ 2,5 până la aproximativ 3,8 mg/mL.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, care cuprinde în plus un agent de tonicitate.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, care cuprinde glicerol ca agent de tonicitate.
- 55 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, care cuprinde glicerol ca agent de tonicitate într-o concentrație de la aproximativ 1 până la aproximativ 16 mg/mL.
- Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, care cuprinde în plus un tampon suplimentar.
- 60 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care pH-ul compoziției este de la aproximativ 7,0 până la aproximativ 7,8.

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția prevede o absorbție a insulinei în sânge care este cu cel puțin 20% mai rapidă decât pentru compozițiile care conțin aceeași insulină dar care nu conțin citrat.

5 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția prevede un debut de acțiune care este cu cel puțin 20% mai rapid decât pentru compozițiile care conțin aceeași insulină dar care nu conțin citrat.

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția prevede o absorbție a insulinei în sânge care este cu cel puțin 30% mai rapidă decât pentru compozițiile care conțin aceeași insulină dar care nu conțin citrat.

10 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția prevede un debut de acțiune care este cu cel puțin 30% mai rapid decât pentru compozițiile care conțin aceeași insulină dar care nu conțin citrat.

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția este stabilă pentru a permite depozitarea de cel puțin 24 luni la 2-8°C.

15 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția este stabilă pentru a permite utilizarea de până la 28 zile la temperaturi de până la 30°C pentru fiole sau cartușe în stilouri injectoare reutilizabile.

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția este stabilă pentru a permite depozitarea de cel puțin 36 luni la 2-8°C.

20 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția este stabilă pentru a permite utilizarea de până la 32 zile la temperaturi de până la 30°C pentru fiole sau cartușe în stilouri injectoare reutilizabile.

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția este stabilă pentru a permite utilizarea într-un dispozitiv cu pompă pentru terapia prin perfuzie subcutanată continuă cu insulină pentru până la 7 zile.

25 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția nu include nici un agent chelator suplimentar.

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția nu include EDTA, acid tetraacetic de etilen glicol (EGTA), acid alginic, acid alfa lipoic, acid dimercaptosuccinic (DMSA), sau acid 1,2-diaminociclohexantetraacetic (CDTA).

30 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția nu include nici un agent vasodilatator.

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția nu include nici o nitroglicerină.

35 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția nu include adenozină, factor de hiperpolarizare derivat din endoteliu, un inhibitor de fosfodiesterază de tip 5 (PDES), un deschizător al canalului de potasiu, prostaciclina, forskolină, nitroglicerina, un agent de formare al oxidului nitric, nitrit amil, sau nitroprusidă.

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus, în care compoziția nu include nici o oligozaharidă.

40 Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus pentru utilizare în terapie.
Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus pentru utilizare în tratamentul diabetului.

Compoziția farmaceutică a oricăroră din realizările descrise mai sus pentru utilizare în fabricarea unui medicament pentru tratamentul diabetului.

45 O fiolă cu utilizare multiplă care cuprinde oricare din compozițiile farmaceutice ale oricăroră din realizările descrise mai sus.

Un stilou injector reutilizabil care cuprinde oricare din compozițiile farmaceutice ale oricăroră din realizările descrise mai sus.

50 Un dispozitiv cu pompă pentru terapia prin perfuzie subcutanată continuă cu insulină care cuprinde oricare din compozițiile farmaceutice ale oricăroră din realizările descrise mai sus.

Invenția este ilustrată mai departe prin următoarele exemple.

EXAMPLE

Studii farmacocinetice și farmacodinamice

55 **Insulină lispro formulată cu 35 mM citrat, 0,3 mM zinc, 5 mM MgCl₂ și 23 mM NaCl**

Porcii miniaturali Yucatan cu diabet (indus cu Alloxan), castrați, masculi cu porturi de acces vascular montate anterior au fost utilizați sub supravegherea echipei și veterinarilor. Animalele cu diabet sunt găzduite individual și au acces la apă proaspătă în orice moment. Ele sunt alimentate cu două mese pe zi la o dietă standard și primesc insulina bazală și prandială de întreținere adecvată de două ori pe zi pentru a gestiona afecțiunea lor diabetică.

60

Articolul de test (compoziția A din tabelul de mai jos) a fost formulată și expedită la locul de test și controlul Humalog® al insulinei a fost o fiolă comercială pe situs la situsul de test:

Tabelul 1.

Nume	Compoziția formulării
	108 U/mL insulină lispro
	35 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
Compoziție A	23 mM NaCl
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL m-cresol
	pH 7,4
	100 U/mL KPB
	1,88 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	16 mg/mL glicerol
Humalog®	3,15 mg/mL meta-cresol
	0,3 mM zinc
	pH 7,4

În ziua de dinaintea studiului, animalele au fost alimentate cu jumătate din rația lor zilnică și au primit 0,2 U/kg insulină Humalog® Mix 75/25 la administrarea lor de întreținere de dimineață. Toate animalele de studiu au fost alimentate peste noapte și nu au primit insulina sau masa lor de seară înainte de administrarea medicamentului din ziua studiului.

În dimineața studiului, toate animalele au fost plasate în curele pentru restricționare și le-au fost accesate porturile lor de acces vascular (echipate pentru recoltarea unei mostre de sânge) și verificate pentru permeabilitate. Animalele au fost plasate aleator în grupurile de tratament. Acesta a fost un proiect longitudinal complet cu n=13. Un animal nu a participat la grupul de tratament cu compoziția A rezultând n=12 pentru acel grup de tratament.

După ce au fost colectate două probe de sânge ale liniei de bază (-30 și -20 min), animalele au fost întoarse la țarcurile lor și au fost alimentate ~300 g. La douăzeci de minute după prezentarea mesei consumate complet, animalele au fost injectate cu articol de test subcutanat în flanc (0 min) cu o seringă cu insulină Terumo (0,3 sau 0,5 ml cu ac de 1/2"). Toate animalele de studiu au avut acces la apă curată, proaspătă pe perioada de recoltare a sângelui rămasă.

Probe seriale de sânge (2,0 mL fiecare) au fost colectate de la fiecare animal la următoarele momente de timp: -30, -20 (apoi imediat alimentate), 0 (chiar înainte de doză), 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 240, și 360 minute după dozarea SC.

Probele de sânge (anticoagulant: nici unul [ser]) au fost menținute la temperatura ambiantă timp de cel puțin 30 minute dar nu mai mult de 2 ore pentru a permite coagularea. Serul a fost apoi separat prin centrifugare și divizat în două alicote și depozitate congelate la aproximativ -70°C.

Concentrațiile de glucoză serică au fost determinate utilizând un analizor de chimie clinică AU480 automat (Beckman Coulter, Inc., Brea, California). Alicota pentru PK a fost expedită la EMD Millipore Corp., St. Charles, MO pe gheață uscată printr-un serviciu de expediere în ziua următoare și a inclus un manifest detaliat al mostrei.

Datele glucozei serice sunt reprezentate în Tabelul 2 de mai jos ca Medie (mg/dL) +/- SEM în afară de cazul când se specifică altfel.

Tabelul 2.

	Humalog®		Compoziție A	
Timp (min)	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	308,5	13,2	294,6	10,0
-20	311,8	13,3	296,0	10,3
0	321,8	13,3	311,4	11,7
5	325,8	14,5	319,6	9,6

	Humalog®		Compoziție A	
10	320,2	13,0	282,3	11,2
15	297,5	21,7	243,8	11,6
30	249,1	13,3	168,3	14,5
45	191,9	19,1	125,7	15,2
60	148,2	17,9	95,8	14,2
75	113,5	15,4	75,8	13,3
90	89,8	14,2	61,2	12,0
105	68,7	11,1	53,7	11,0
120	53,5	9,4	44,8	10,5
150	46,5	8,0	44,9	10,2
180	44,8	9,6	43,1	10,5
240	74,5	17,1	62,8	11,2
360	109,7	27,0	103,9	21,8

Pentru a compara statistic modificarea glucozei serice sub diferite formulări la diferite momente de timp, a fost utilizată analiza derivatelor. Modificarea glucozei din sânge la fiecare moment de timp este caracterizată de către derivata de prim ordin (modificarea direcțională instantă) la momentul curent de timp. Polinoamele de până la ordinul 10 se potrivesc cu datele cursului de timp pentru fiecare animal individual. Ordinea optimă a polinomului este selectată utilizând Criteriul de informație Bayesian (BIC). Rata modificării la fiecare moment de timp este calculată ca derivata curbei polinomiale ajustate la acel moment de timp. O dată ce sunt obținute derivatele, modelul ANOVA este ajustat pentru a compara diferitele formulări la fiecare moment de timp. Variația de la animal la animal este luată în considerare pentru modelul ANOVA. Contrastele sunt construite pentru a compara diferitele formulări și valorile p sunt ajustate utilizând pachetul R „multcomp“. Animale sunt dozate după momentul 0; prin urmare, momentul 0 nu este inclus în analiză. Pentru momentele de timp de după 150 minute, nu există destul momente de timp pentru a estima robust derivata, prin urmare, aceste momente de timp sunt de asemenea excluse din analiza statistică.

Compoziția A a condus la o scădere semnificativ ($p \leq 0,01$) mai rapidă în glucoza serică la 5, 10, și 15 minute post doză în comparație cu Humalog®.

Nivelurile de insulină pentru mostrele PK serice pentru grupurile de tratament cu compoziția A și Humalog® sunt măsurate utilizând o RIA totală de insulină. Limitele inferioară și superioară de cuantificare pentru test sunt de 20 pM și respectiv 5000 pM. Valorile sub limita inferioară de cuantificare sunt presupuse ca fiind de 20 pM. Analizele farmacocinetice neocompartimentale sunt efectuate utilizând Phoenix WinNonlin v6.3.

Tabelul 3.

Nume		Tmax (min)	Cmax (nM)	AUC _{INF} (min*nM)	CL/F (mL/min/kg)
Humalog® N=13	Medie	53,1	1,37	157	8,70
	SE	7,52	0,246	16,9	0,871
	Mediană	45,0	1,04	127	9,48
Compoziție A N=12	Medie	23,8	1,48	152	8,46
	SE	6,07	0,130	10,5	0,822
	Mediană	12,5	1,35	154	7,80

Abrevieri: Tmax - timp până la concentrația maximă, Cmax - concentrație maximă, AUC_{INF} - aria de sub curba de la 0 la infinit, CL/F - eliminare/biodisponibilitate

Tmax medie și mediană sunt cu 55% și 72% mai timpurii în Compoziția A, respectiv, decât cu Humalog.

Insulină lispro formulată cu 25-35 mM citrat, 0,285 mM zinc, 5 mM MgCl₂ și 15-23 mM NaCl

Un studiu de compoziții care cuprinde concentrații variabile de citrat și zinc, clorură de magneziu și clorură de sodiu este efectuat pe porcii miniaturali Yucatan masculi cu diabet (indus cu Alloxan), castrați, urmând procedurile generalele descrise mai sus.

- 5 Articolele de test (Compozițiile A' și B din tabelul de mai jos) sunt formulate și expediate la situsul de test, și controlul cu insulină Humalog® este o fiolă comercială pe situs la situsul de test:

Tabelul 4.

Nume	Compoziția formulării
	95 U/mL insulină lispro
	35 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
	23 mM NaCl
Compoziție A'	0,285 mM zinc
	2,99 mg/mL m-cresol
	1,79 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	15,2 mg/mL glicerol
	pH 7,4
	95 U/mL insulină lispro
	25 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
	15 mM NaCl
Compoziție B	0,285 mM zinc
	2,99 mg/mL m-cresol
	1,79 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	15,2 mg/mL glicerol
	pH 7,4
	100 U/mL KPB
	1,88 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
Humalog®	16 mg/mL glicerol
	3,15 mg/mL meta-cresol
	0,3 mM zinc
	pH 7,4

- 10 Studiul este conceput ca un proiect longitudinal complet pe 21 de porci pentru a studia toți porcii pe toate tratamentele (n=21). Un animal este exclus din grupul de tratament cu Humalog® pentru glucoza din sânge a liniei de baa <200 mg/dl, și un animal este exclus din grupul de tratament cu Humalog® pentru un port non-brevet, astfel că n=19 pentru acel grup de tratament. Un animal este exclus din grupul de tratament cu compoziția A' pentru o doză lipsă raportată la momentul injecției, astfel n=20 pentru acel grup de tratament. Un animal este exclus din grupul de tratament cu compoziția B pentru glucoza din sânge a liniei de bază <200 mg/dl, astfel n=20 pentru acel grup de tratament.

- 15 Datele referitoare la glucoza serică sunt prezentate în Tabelul 5 de mai jos ca medie (mg/dL) +/- SEM.

Tabelul 5.

	Humalog®		Compoziție A'		Compoziție B	
Timp (min)	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	291,1	8,9	288,3	8,7	284,1	11,4
-20	296,8	8,7	296,5	9,3	289,0	12,6

	Humalog®		Compoziție A'		Compoziție B	
0	311,5	10,6	311,1	10,5	297,5	13,8
5	320,3	8,9	319,9	10,6	296,8	15,2
10	319,5	9,8	299,2	12,6	280,4	14,4
15	306,3	11,8	265,0	14,3	248,7	16,5
30	262,8	17,1	206,8	21,9	185,5	19,3
45	223,6	19,4	177,1	24,3	156,0	20,8
60	195,7	19,6	162,4	24,4	140,9	20,9
75	168,3	19,2	148,3	23,6	131,0	21,9
90	150,3	18,4	139,8	22,9	112,9	19,1
105	130,0	17,0	128,5	21,5	107,5	18,1
120	122,8	17,2	123,2	20,9	95,4	16,5
150	89,6	12,7	107,7	19,6	76,5	13,2
180	70,1	10,6	98,3	18,0	66,0	11,3
240	64,2	9,9	92,8	16,3	66,0	9,8
360	79,0	12,4	100,3	15,2	90,3	11,0

Pentru a compara statistic modificarea glucozei serice sub diferite formulări la diferite momente de timp, a fost utilizată analiza derivatelor, urmând în general procedura descrisă mai sus. Compozițiile A' și B au condus fiecare la scăderea semnificativ mai rapidă ($p \leq 0,01$) în glucoza serică la 5, 10, și 15 minute post doză în comparație cu Humalog®.

Concentrațiile de insulină serică și parametrii PK sunt generate și analizate în general cum s-a descris mai sus, și rezultatele PK sunt furnizate în Tabelul 6 de mai jos.

Tabelul 6.

Compus		Tmax (min)	Cmax (nM)	AUC _{INF} (min*nM)	CL/F (mL/min/kg)
Humalog® N=19	Medie	52,9	0,791	110	12,1
	SE	6,42	0,137	10,1	0,906
	Mediană	45	0,569	97,9	12,3
Compoziție A' N=20	Medie	48,8	0,757	106	12,6
	SE	8,11	0,125	7,53	0,991
	Mediană	30	0,675	99,9	12,0
Compoziție B N=20	Medie	27,3	0,885	101	13,3
	SE	4,57	0,105	8,06	1,11
	Mediană	15	0,827	96,3	12,5

Rezultatele Tmax mediane sunt cu 33% și 67% mai timpurii în Compozițiile A' și B decât Humalog®, și Tmax medie este cu 48% mai timpurie în Compoziția B decât în Humalog.

Insulină lispro formulată cu 15 mM citrat, 0,285 mM zinc, 5 mM MgCl₂ și 15 mM NaCl

Un studiu pe compoziții cuprinzând citrat, zinc, clorură de magneziu și clorură de sodiu este efectuat pe porcii miniaturali Yucatan masculi cu diabet (indus cu Alloxan), castrați urmând procedurile generalele descrise mai sus. Compoziția C a fost formulată și expediată la situsul de test, și controlul cu Humalog® este o fiolă comercială.

Tabelul 7.

Nume	Compoziția formulării
	95 U/mL insulină lispro
	15 mM citrat

Nume	Compoziția formulării
	5 mM MgCl ₂
	15 mM NaCl
Compoziție C	0,285 mM zinc
	2,99 mg/mL m-cresol
	1,79 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	15,2 mg/mL glicerol
	pH 7,4
	100 U/mL KPB
	1,88 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
Humalog®	16 mg/mL glicerol
	3,15 mg/mL meta-cresol
	0,3 mM zinc
	pH 7,4

Studiul este conceput ca proiect longitudinal complet pe 13 porci pentru a studia toți porcii pe toate tratamentele (n=13). Un animal este exclus din grupul de tratament cu compoziția C pentru glucoza din sânge a liniei de bază <200 mg/dl, și un animal este exclus din grupul de tratament cu compoziția C pentru o doză lipsă raportată la momentul injectiei, conducând la n=11 pentru acel grup de tratament.

Datele referitoare la glucoza serică sunt prezentate în Tabelul 8 de mai jos ca medie (mg/dL) +/- SEM.

Tabelul 8.

Timp (min)	Humalog®		Compoziție C	
	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	292,2	9,4	297,8	10,6
-20	302,6	9,1	306,9	11,0
0	316,8	12,0	324,4	10,7
5	319,9	12,3	330,8	12,8
10	312,9	13,2	312,0	11,2
15	311,4	14,8	288,4	15,1
30	248,7	22,2	225,5	15,0
45	203,5	22,9	189,1	18,7
60	162,8	23,9	152,2	19,9
75	135,6	24,7	125,0	20,6
90	116,2	25,4	98,1	17,8
105	99,5	23,4	84,2	17,7
120	85,6	22,5	69,8	15,6
150	67,2	18,0	57,2	11,4
180	57,7	17,3	54,1	12,2
240	60,4	14,2	72,1	21,4
360	76,7	10,6	114,7	30,8

Compoziția C a produs o deplasare în profilul glucozei în comparație cu profilul de control cu Humalog®.

Concentrațiile de insulină serică și parametrii PK sunt generate și analizate în general cum s-a descris mai sus, și rezultatele PK sunt furnizate în Tabelul 9 de mai jos.

Tabelul 9.

Compus		Tmax (min)	Cmax (nM)	AUC _{INF} (min* nM)	CL/F (mL/min/kg)
Humalog® N=13	Medie	64,6	0,703	106	12,3
	SE	9,21	0,0955	9,10	1,09
	Mediană	60,0	0,643	99,5	12,1
Compoziție C N=11	Medie	46,4	0,691	107	13,6
	SE	8,20	0,111	17,6	1,58
	Mediană	45,0	0,540	92,5	13,0

Tmax medie și mediană sunt cu 28% și 25% mai timpurii în Compoziția C, respectiv, decât cu Humalog.

5 **Insulină lispro formulată cu 25 mM citrat, 0,285 mM zinc și 25 mM NaCl**

Un studiu pe compoziții cuprinzând 25 mM citrat, zinc și clorură de sodiu este efectuată pe porcii miniaturali Yucatan masculi cu diabeti (indus cu Alloxan), castrați, urmând procedurile generale descrise mai sus.

10 Articolul de test (Compoziția D din tabelul de mai jos) este formulat și expedit la situsul de test, și controlul cu insulină Humalog® a fost o fiolă comercială pe situs la situsul de test:

Tabelul 10.

Nume	Compoziție formulare
Compoziție D	96 U/mL insulină lispro
	25 mM citrat
	25 mM NaCl
	0,285 mM zinc
	2,99 mg/mL m-cresol
	1,79 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	15,2 mg/mL glicerol
	pH 7,4
Humalog®	100 U/mL KPB
	1,88 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	16 mg/mL glicerol
	3,15 mg/mL meta-cresol
	0,3 mM zinc
	pH 7,4

15 Acest studiu constă din trei doze (0,1, 0,2, și 0,4 Unități/Kg) de Compoziție D în comparație cu Humalog® la aceleași doze. Studiul este conceput ca proiect longitudinal complet pe 21 de porci pentru a studia toți porcii pe toate tratamentele (n=21). Pentru doza de 0,4 Unit/kg, două animale au fost excluse (unul pentru boală și unul pentru non-permeabilitatea portului) din grupul de tratament cu compoziția D rezultând n=19 pentru acel grup de tratament. Un animal a fost exclus din grupul de tratament cu 0,4 U/Kg Humalog® (pentru non-permeabilitatea portului) rezultând n=20 pentru acel grup de tratament. Toate celelalte doze n=21 pentru fiecare tratament.

20 Datele referitoare la glucoza serică sunt prezentate în Tabelul 11 ca medie (mg/dL) +/- SEM.

Tabelul 11.

	Humalog® 0,1 U/Kg		Compoziție D 0,1 U/Kg		Humalog® 0,2 U/Kg		Compoziție D 0,2 U/Kg		Humalog® 0,4 U/Kg		Compoziție D 0,4 U/Kg	
Timp (min)	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	306,2	7,7	310,3	9,3	301,0	7,2	302,3	7,6	319,8	10,0	316,3	11,4

	Humalog® 0,1 U/Kg		Compoziție D 0,1 U/Kg		Humalog® 0,2 U/Kg		Compoziție D 0,2 U/Kg		Humalog® 0,4 U/Kg		Compoziție D 0,4 U/Kg	
Timp (min)	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-20	307,7	9,2	312,6	8,9	305,6	6,8	311,1	8,3	315,7	9,2	313,4	10,2
0	329,9	8,7	329,0	8,8	326,9	9,3	329,4	9,3	344,5	10,2	341,1	11,5
5	333,5	10,0	340,8	9,2	327,2	9,7	330,0	8,3	349,1	10,0	343,1	11,3
10	335,0	12,5	330,1	8,8	332,3	9,9	311,8	8,6	349,3	10,5	307,9	11,9
15	337,2	11,6	307,3	9,9	323,2	10,5	285,7	9,2	335,4	13,4	260,6	12,5
30	317,6	15,9	284,4	13,2	282,2	13,2	236,0	11,0	277,3	15,1	182,2	13,6
45	321,0	19,6	293,3	15,8	263,3	15,7	228,8	14,3	233,1	17,6	141,3	14,3
60	318,2	22,0	291,9	16,9	231,8	17,7	219,9	17,6	184,5	17,1	114,4	14,1
75	303,5	22,8	294,7	18,1	207,7	19,5	208,3	18,2	152,4	19,1	96,9	13,7
90	297,7	23,3	289,8	18,8	188,8	18,0	198,0	19,1	121,0	17,0	84,6	13,0
105	290,5	22,9	283,9	19,3	167,0	17,1	193,7	19,1	96,2	16,5	71,1	12,3
120	283,4	22,3	282,3	20,0	149,3	16,6	164,8	18,1	80,1	17,2	61,1	10,5
150	273,5	21,7	271,4	19,9	124,6	15,6	152,6	17,6	61,3	17,2	49,8	10,5
180	274,7	17,9	270,7	20,4	113,1	14,4	142,4	16,3	50,6	15,3	43,5	10,9
240	285,4	16,2	270,2	17,1	124,1	15,5	147,5	17,1	49,1	14,9	45,4	10,5
360	302,0	15,8	287,1	17,2	166,9	20,7	176,6	16,2	74,5	21,8	67,4	12,5

Pentru a compara statistic modificarea glucozei serice sub diferite formulări la diferite momente de timp, a fost utilizată analiza derivatelor, urmând în general procedura descrisă mai sus. Toate cele trei doze de Compoziție D (0,1, 0,2, și 0,4 U/kg) conduc la o scădere semnificativ ($p \leq 0,01$) mai rapidă a nivelului de glucoză în sânge la momentele de timp 5, 10 și 15 minute când este comparat cu Humalog® la aceleași respective doze.

Pentru analiza farmacocinetică, unsprezece porci au fost aleși aleator utilizând o unealtă de randomizare. Nivelurile de insulină pentru mostrele PK serice pentru acei porci sunt măsurate utilizând o RIA de insulină totală. Limitele inferioară și superioară de cuantificare pentru test sunt 20 pM și 5000 pM, respectiv. Valorile sub limita inferioară de cuantificare sunt presupuse a fi de 20 pM. Analizele farmacocinetice non-compartimentale sunt efectuată utilizând Phoenix WinNonlin v6.3.

Tabelul 12.

Compus		Tmax (min)	Cmax (nM)	AUC _{INF} (min*nM)	CL/F (mL/min/kg)
0,1 U/kg Humalog®	Medie	41,8	0,350	44,3	15,3
	SE	5,53	0,0531	5,20	1,62
	Mediană	45	0,283	43,5	13,8
0,1 U/Kg Compoziție D	Medie	33,6	0,330	45,3	15,0
	SE	15,3	0,0546	5,70	1,60
	Mediană	15	0,231	38,3	15,7
0,2 U/Kg Humalog®	Medie	57,3	0,820	111	12,0
	SE	7,79	0,195	12,9	1,09
	Mediană	60	0,634	106	11,4
0,2 U/Kg Compoziție D	Medie	53,6	1,14	132	10,7
	SE	14,6	0,258	17,5	1,41
	Mediană	30	0,847	115	10,5

Compus		Tmax (min)	Cmax (nM)	AUC _{INF} (min*nM)	CL/F (mL/min/kg)
0,4 U/Kg Humalog®	Medie	75	1,57	197	13,4
	SE	11,1	0,435	21,3	1,17
	Mediană	75	0,952	159	15,0
0,4 U/Kg Compoziție D	Medie	48,6	3,19	327	8,58
	SE	13,2	0,975	46,6	0,961
	Mediană	45	2,16	304	7,89

Valorile Tmax mediane sunt cu 67%, 50% și 40% mai timpurii în grupurile cu compoziție D de 0,1 U/Kg, 0,2 U/Kg și 0,4 U/Kg în comparație cu acele aceleași doze cu Humalog®. Valorile Tmax medii au fost cu 20% și 35% mai timpurii în grupurile cu compoziție D de 0,1 U/Kg și 0,4 U/Kg în comparație cu acele aceleași doze cu Humalog®. Expunerea totală și Cmax apar mai mari pentru Compoziția D decât pentru Humalog® la doze de 0,2 U/kg și 0,4 U/kg.

Insulină umană, insulină aspart și insulină glulizină formulate cu 25 mM citrat, și 5 mM MgCl₂

Un studiu pe compoziții care cuprind trei insuline diferite, 25 mM citrat și clorură de magneziu este efectuat pe porci miniaturali Yucatan masculi, cu diabeti (indus cu Alloxan), castrați urmând procedurile generalele descrise mai sus.

Articolul de test (Compoziția E din tabelul de mai jos) este formulată prin adăugarea suficientă de citrat și clorură de magneziu la fiola comercială de HUMULIN-R®, NOVOLOG® și APIDRA® pentru a atinge o concentrație de 25 mM citrat și 5 mM clorură de magneziu:

Tabelul 13.

Nume	Compoziția formulării
Novolog®	100 U/mL insulină aspart
	0,58 mg/mL NaCl
	16 mg/mL glicerol
	1,5 mg/mL fenol
	1,72 mg/mL m-cresol
	19,6 μ/mL Zn
	pH 7,2-7,6
Compoziție E	97 U/mL insulină aspart
	25 mM citrat
	5mM MgCl ₂
	0,56 mg/mL NaCl
	15,5 mg/mL glicerol
	1,46 mg/mL fenol
	1,67 mg/mL m-cresol
	19,0 μg/mL Zn
	pH 7,2-7,6
Humulin-R®	100 U/mL insulină umană
	16 mg/mL glicerol
	2,5 mg/mL m-cresol
	0,015 mg/mL Zn
	pH 7,0-7,8
Apidra®	100 U/mL insulină glulizină
	3,15 mg/mL metacresol

Nume	Compoziția formulării
	6 mg/mL trometamină
	5 mg/mL NaCl
	0,01 mg/mL polisorbat 20
	pH 7,3

Studiul este conceput ca proiect longitudinal complet pentru a studia toți porcii pe toate tratamentele (n=20). Datele referitoare la glucoza serică sunt prezentate în Tabelul 14 ca medie (mg/dL) +/- SEM.

5 **Tabelul 14.**

	Novolog®		Compoziție E		Humulin-R®		Apidra®	
Timp (min)	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	340,9	8,2	338,1	5,8	313,2	7,7	298,3	8,4
-20	353,7	7,8	348,9	6,7	324,2	7,7	310,4	9,1
0	363,4	9,5	361,2	8,2	334,1	10,3	319,5	10,6
5	377,1	10,4	374,3	8,7	346,9	10,4	329,6	10,7
10	378,4	11,2	362,8	10,1	355,5	10,6	334,7	11,9
15	380,8	12,5	343,9	12,4	360,3	10,9	331,7	13,2
30	362,1	16,1	294,4	18,8	367,4	13,8	323,8	18,0
45	330,6	19,1	269,8	21,6	376,9	15,6	320,1	20,5
60	302,2	22,0	241,6	21,4	370,8	17,4	304,4	21,3
75	285,9	25,2	225,1	21,8	360,3	19,1	283,1	21,6
90	254,1	26,3	205,4	20,4	351,0	19,8	261,2	21,8
105	230,4	26,3	188,0	19,7	330,7	19,9	239,0	20,9
120	196,1	24,8	159,4	17,9	308,7	21,1	211,1	20,4
150	152,9	23,8	140,3	17,6	267,3	25,4	169,1	20,8
180	111,1	20,9	120,0	16,3	207,0	22,5	130,1	19,1
240	71,4	12,7	107,3	17,7	130,7	21,1	84,5	14,3
360	65,8	8,5	90,4	16,9	70,4	17,9	62,6	10,4

Formularea care conține citrat de insulină aspart produce o deplasare în profilul glucozei în comparație cu controlul cu Novolog®.

Insulină lispro formulată cu concentrații variabile de citrat, MgCl₂, zinc, surfactant și NaCl

10 Un studiu pe compoziții care cuprind concentrații variabile de citrat, clorură de magneziu, zinc, surfactant și/sau clorură de sodiu este efectuată pe porci miniaturali Yucatan masculi, cu diabet (indus cu Alloxan), castrați, urmând procedurile generalele descrise mai sus.

15 Compoziția de test J din tabelul de mai jos este preparată din ingredientul farmaceutic activ de insulină lispro vrac (API), și articolele de test I și K din tabelul de mai jos sunt preparate prin adăugarea de citrat și a agenților indicați pentru stabilizare la o fiolă de produs medicamentos Humalog®, și expediate la situsul de test, și controlul cu insulină Humalog® este o fiolă comercială pe situs la situsul de test.

Tabelul 15.

Nume	Compoziția formulării
Compoziție I	91,4 U/mL insulină lispro
	25 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
	15 mM NaCl

Nume	Compoziția formulării
Compoziție J	0,3 mM Zinc
	14,6 mg/mL glicerină
	97,6 U/mL insulină lispro
	15 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
	15 mM NaCl
	0,3 mM zinc
Compoziție K	7,6 mg/mL glicerină
	94 U/mL
	25 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
	0,51 mM zinc
	0,07% m/v P88
	15,2 mg/mL glicerină
Humalog®	100 U/mL KPB
	1,88 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	16 mg/mL glicerol
	3,15 mg/mL meta-cresol
	0,3 mM zinc
	pH 7,4

Studiul este conceput ca proiect longitudinal complet pentru a studia toți porcii pe toate tratamentele (n=19). Un animal este exclus din fiecare grup de tratament cu compozițiile I, J și K pentru defecțiunea portului sau afecțiunilor animalului conducând la n=18 pentru acele grupuri de tratament.

5

Datele referitoare la glucoza serică sunt prezentate în Tabelul 16 ca medie (mg/dL) +/- SEM.

Tabelul 16.

	Humalog®		Compoziție I		Compoziție J		Compoziție K	
Timp (min)	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	372,1	11,9	363,8	10,4	367,8	9,2	384,7	12,4
-20	382,5	11,7	378,6	11,2	380,2	10,4	398,2	12,6
0	399,9	12,8	399,2	11,0	398,3	10,0	409,6	11,7
5	409,7	12,1	410,8	11,0	408,3	10,3	423,8	11,2
10	412,1	13,6	387,2	10,5	392,4	10,8	406,0	11,5
15	410,2	13,4	352,2	12,0	361,8	14,6	376,8	13,5
30	377,2	18,1	295,2	18,4	317,4	20,8	324,4	16,9
45	353,8	21,7	280,1	24,4	299,8	24,3	306,3	21,7
60	331,6	25,2	271,3	25,5	289,2	26,8	289,2	22,3
75	298,4	27,9	258,3	25,1	272,0	28,2	275,4	22,2
90	279,7	28,9	245,2	23,6	258,1	28,4	265,7	22,1
105	256,1	28,5	235,4	23,6	248,3	27,0	251,1	20,4
120	242,3	28,2	227,2	22,8	240,7	26,4	242,5	21,0
150	221,7	26,5	216,9	21,4	227,8	23,9	221,9	20,4

	Humalog®		Compoziție I		Compoziție J		Compoziție K	
180	207,3	25,4	204,6	21,3	221,1	20,6	215,8	21,8
240	214,7	24,1	191,9	21,7	204,6	18,4	209,4	20,3
360	185,2	28,7	162,9	19,9	153,2	19,9	151,7	22,3

Formulările care conțin citrat produc o deplasare în profilul glucozei în comparație cu controalele cu Humalog®.

- 5 Concentrațiile de insulină serică și parametrii PK pentru Humalog® și Compozițiile J și K sunt generate și analizate în general cum s-a descris mai sus, și rezultatele PK sunt furnizate în Tabelul 17 de mai jos.

Tabelul 17.

Formulare		Tmax (min)	½ Tmax timpuriu (min)	½ Tmax târziu (min)	Răspândire Tmax (min)	T50 (min)
Humalog®	Medie	57,2	20,1	161	141	105
	SE	5,2	2,8	19	20	8
Compoziție J	Medie	28,8	9,40	141	131	97,7
	SE	5,4	3,58	18	19	6,1
Compoziție K	Medie	56,2	16,7	115	98,3	89,3
	SE	13,7	6,0	18	19	5,8

Rezultatele au indicat că, Compozițiile J și K au debut PK mai rapid decât Humalog®.

10 **Studii de stabilitate**

Insulină lispro formulată cu concentrații variabile de citrat, clorură de sodiu și clorură de magneziu.

- 15 Un studiu de stabilitate accelerată al perioadei de valabilitate este efectuată pentru a evalua stabilitatea insulinei lispro când este coformulată cu diferite concentrații de citrat, clorură de sodiu, și, opțional, clorură de magneziu. Mostrele de stabilitate având compozițiile stabilite în tabelul de mai jos sunt preparate fie prin formularea ingredientului farmaceutic activ al insulinei lispro cu ceilalți excipienți indicați în tabelul de mai jos (Compozițiile L, M și N) sau fie prin adăugarea de citrat și clorură de sodiu la o fiolă de produs medicamentos Humalog® (Compoziție O).

Tabelul 18.

Nume	Compoziția formulării
Compoziție L	100 U/mL insulină lispro
	35 mM citrat de sodiu
	5 mM MgCl ₂
	23 mM NaCl
	0,3 mM oxid de zinc
	3,15 mg/mL m-cresol
	pH 7,5
Compoziție M	100 U/mL insulină lispro
	25 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
	15 mM NaCl
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL m-cresol
	4,49 mg/mL glicerol
	pH 7,5
Compoziție N	100 U/mL insulină lispro

Nume	Compoziția formulării
	15 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
	15 mM NaCl
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL m-cresol
	7,62 mg/mL glicerol
	pH 7,5
Compoziție O	95 U/mL insulină lispro
	25 mM citrat
	25 mM NaCl
	0,3 mM zinc
	1,88 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	3,15 mg/mL m-cresol
	16 mg/mL glicerol
	pH 7,5
Humalog [®]	100 U/mL KPB
	1,88 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	16 mg/mL glicerol
	3,15 mg/mL meta-cresol
	0,3 mM zinc
	pH 7,4

Soluțiile sunt filtrate utilizând o membrană PVDF de 0,22 microni (Cat# SLGV013SL, Millex, Millipore) și distribuite în fiole de sticlă (Cat# NC4015-1, National Scientific, Thermo Scientific Inc.) cu capace superioare cu șurub (Cat# C4015-67A, National Scientific, Thermo Scientific Inc.), incubate la 2 până la 8°C și 30°C respectiv. Mostre din temperatura de incubare de 30°C au fost extrase pentru analiza la inițial, momentele de timp de 8, 16, 27, 36, 44, 54 și 66 zile. Mostre din temperatura de incubare de 5°C sunt extrase pentru analiza la inițial, momentele de timp de 27, 36, 44, 54 și 66 zile.

Analiza cromatografică de lichide de înaltă performanță cu excludere dimensională (SEC-HPLC) este efectuată pentru a evalua potența proteinei și a cuantifica speciile cu masă moleculară mare în fiecare compoziție la momentele de timp de stabilitate utilizând un detector UV la 276 nm. Fiecare mostră (10 μL) este separată la temperatura camerei prin utilizarea unei coloane de particule Sepax Zenix-C SEC-80, 7,8 x 300 mm, 3 μm (catalog# 233080-7830) la un debit de 1,0 mL /minut cu eluare izocratică a fazei mobile (0,1% TFA, 50% ACN) pe un timp de rulare de 25 minute. Concentrațiile de insulină sunt calculate prin compararea ariei maximului insulinei cu o arie standard a insulinei lispro și ajustarea pentru puritate determinată prin HPLC cu fază inversă. Rezultatele, raportate în IU/mL, sunt date mai jos.

Tabelul 19.

Temperatură de incubare de 30°C								
	Zi 0	Zi 8	Zi 16	Zi 27	Zi 36	Zi 44	Zi 54	Zi 66
Compoziție L	102,26	100,86	101,14	102,33	99,43	100,71	101,23	98,57
Compoziție M	102,83	102,46	100,06	104,37	100,48	100,99	101,29	99,99
Compoziție N	102,95	102,34	101,09	104,75	101,52	101,93	100,18	99,98
Compoziție O	93,44	94,24	92,49	97,27	91,20	91,65	90,83	89,96
Humalog [®]	99,82	100,43	97,66	103,13	97,71	96,73	98,38	97,19

Tabelul 20.

Temperatură de incubare de 4°C						
	Zi 0	Zi 27	Zi 36	Zi 44	Zi 54	Zi 66
Compoziție L	102,26	104,63	102,93	102,87	105,14	102,59
Compoziție M	102,83	105,93	103,45	103,63	103,04	99,56
Compoziție N	102,95	106,56	103,25	102,83	102,69	104,28
Compoziție O	93,44	94,78	92,50	91,40	93,88	95,87
Humalog®	99,82	103,94	97,82	99,76	97,92	99,74

Pierderea de insulină pentru mostrele care conțin citrat și control cu Humalog® este mai mică de 5% pentru toate mostrele până la 66 zile la 4°C și 30°C.

- 5 Procentajul de masă moleculară mare (%HMW) este calculat prin integrarea ariei totale% a tuturor maximelor care eluează înainte de maximul principal. Rezultatele (% HMW) sunt date în tabelele de mai jos.

Tabelul 21.

Temperatură de incubare de 30°C								
	Zi 0	Zi 8	Zi 16	Zi 27	Zi 36	Zi 44	Zi 54	Zi 66
Compoziție L	0,18	0,20	0,27	0,37	0,40	0,45	0,50	0,63
Compoziție M	0,19	0,21	0,25	0,32	0,35	0,39	0,45	0,58
Compoziție N	0,16	0,21	0,25	0,32	0,36	0,43	0,46	0,57
Compoziție O	0,29	0,35	0,44	0,53	0,62	0,65	0,77	0,87
Humalog®	0,30	0,34	0,43	0,57	0,65	0,69	0,81	0,97

Tabelul 22.

Temperatură de incubare de 4°C						
	Zi 0	Zi 27	Zi 36	Zi 44	Zi 54	Zi 66
Compoziție L	0,18	0,19	0,20	0,15	0,18	0,20
Compoziție M	0,19	0,17	0,18	0,15	0,19	0,19
Compoziție N	0,16	0,18	0,16	0,19	0,16	0,17
Compoziție O	0,29	0,34	0,36	0,34	0,31	0,35
Humalog®	0,30	0,34	0,35	0,34	0,32	0,35

10 Formarea HMW este mai mică de 1% pentru toate mostrele care conțin citrat și control cu Humalog® până la 66 zile la 4°C și 30°C.

- 15 Analiza cromatografică de lichide de înaltă performanță (RP-HPLC) cu fază inversă este efectuată pentru a evalua puritatea proteinei în fiecare compoziție la momentele de timp de stabilitate utilizând un detector UV la 214 nm. Fiecare mostră (5 µL) este separată la 40°C prin utilizarea unei coloane HPLC Waters BioSuite C18 PA-B, 3,5µm, 2,1 × 150mm (Part #186002435), sau a unei coloane comparabile, la un debit de 0,6 mL/minut cu fază mobilă A (50mM sulfat, pH 2,3 + 20% acetonitril (v/v)) și fază mobilă B (50mM sulfat, pH 2,3 + 50% acetonitril (v/v)). Gradientul fazei mobile B la 0, 3, 15, 21, 26, 27, 27,5 și 35,0 min este 21, 25, 25, 30, 80, 80, 21 și respectiv 21%. Procentajul mostrei exterioare a
- 20 maximului principal și A-21 desamido este determinat prin scăderea procentajului maximului principal și procentajului A-21 desamido din 100 de procente. Colectiv, aceste maxime sunt considerate alte substanțe înrudite (ORS). Rezultatele (% exterior al maximului principal și A-21 și desamido) sunt date mai jos.

Tabelul 23.

Temperatură de incubare de 30°C								
	Zi 0	Zi 8	Zi 16	Zi 27	Zi 36	Zi 44	Zi 54	Zi 66
Comp. L	0,52	0,71	0,96	1,20	1,69	1,65	2,03	2,25
Comp. M	0,57	0,83	1,00	1,20	1,70	1,63	2,02	2,18

Temperatură de incubare de 30°C								
	Zi 0	Zi 8	Zi 16	Zi 27	Zi 36	Zi 44	Zi 54	Zi 66
Comp. N	0,50	0,87	1,12	1,28	1,82	1,72	2,01	2,25
Comp. O	0,78	1,18	1,49	1,63	1,89	2,14	2,53	2,78
Humalog®	0,74	1,15	1,47	1,68	1,77	2,20	2,63	2,97

Tabelul 24.

Temperatură de incubare de 4°C					
	Zi 0	Zi 27	Zi 44	Zi 54	Zi 66
Compoziție L	0,52	0,62	0,59	0,66	0,68
Compoziție M	0,57	0,67	0,60	0,63	0,73
Compoziție N	0,50	0,66	0,59	0,67	0,76
Compoziție O	0,78	1,08	0,89	0,99	0,94
Humalog®	0,74	1,05	0,87	0,95	0,91

ORS pentru toate mostrele care conțin citrat și control cu Humalog® este mai mic de 1,5% la 4°C pentru 66 zile și mai mic de 3,0% la 30°C pentru 66 zile.

5 Stabilitatea fizică a insulinei lispro formulată cu 25 mM citrat, 0,3 mM zinc, 5 mM MgCl₂, 0,09% poloxamer și concentrații variabile de clorură

O formulare stoc concentrată lispro este preparată cuprinzând 200 U/mL insulină lispro/mL, 32 mg glicerină/mL, 6,30 mg metacresol/mL, 0,6 mM zinc în apă pentru operațiuni sterile vrac. Formularea este pH-ajustată cu acid clorhidric pentru a dizolva insulina lispro și apoi ajustată cu hidroxid de sodiu la pH de 7,45.

Formulările de test sunt apoi preparate prin diluarea concentratelor de insulină lispro cu tampon de citrat de sodiu, pulbere hexahidrat de clorură de magneziu, soluție de poloxamer 188, și clorură de sodiu granulară și q.s. cu apă pentru operațiunile sterile vrac la o compoziție de 25 mM citrat, 5 mM MgCl₂, 0,09% poloxamer 188, 100 unități/mL lispro, 16 mg/mL glicerină, 3,15 mg/mL Metacresol, și 0,3 mM zinc cu clorură totală de 23,2 (Compoziție P) sau de 17,7 (Compoziție Q) mM.

Formulările sunt filtrate steril și apoi transferate volumetric în fiole de sticlă de 10 mL cu o umplere de 7 mL, închise cu dop, și etanșate prin sertizare.

În a treisprezece zi a studiului accelerat de stabilitate (30°C, agitat la 75 de mișcări pe minut (spm)) fiolele suferă o inspecție vizuală în zilele 2, 4, 8 și 13. Fiolele care conțin o soluție clară și incoloră fără precipitat sunt considerate notate ca „trecute”, în timp ce o fiolă care conține particule sau o soluție care nu este clară și/sau decolorată este înregistrată ca „picată”. Datele sunt furnizate mai jos în Tabelul 25.

Tabelul 25.

Compoziție	Zi 2 (n=2)	Zi 4 (n=2)	Zi 8 (n=4)	Zi 13 (n=4)
Compoziție P	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	50% trecută
Compoziție Q	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	0% trecută

25 Stabilitatea fizică a insulinei lispro formulată cu 25 mM citrat, 0,3 mM zinc, 0,09% poloxamer și 23 mM clorură totală cu și fără magneziu

O formulare stoc concentrată lispro este preparată cuprinzând 200 U/mL insulină lispro, 32 mg glicerină/mL, 6,30 mg metacresol/mL, și 0,6 mM zinc în apă pentru operațiuni sterile vrac. Formularea este pH-ajustată cu acid clorhidric pentru a dizolva insulina lispro și apoi ajustată cu hidroxid de sodiu la pH de 7,45.

Formulările de test sunt preparate prin diluarea concentratelor lispro cu tampon de citrat de sodiu, soluție de poloxamer 188, clorură de sodiu granulară, opțional, cu pulbere hexahidrat de clorură de magneziu, și q.s. cu apă pentru operațiunile sterile vrac la compoziții de 25 mM citrat, 0,09% m/v poloxamer 188, 100 unități/mL lispro, 16 mg/mL glicerină, 3,15 mg/mL Metacresol, 0,3 mM zinc, 23 mM total clorură și fie 0 (Compoziție R) sau 5 (Compoziție S) mM MgCl₂.

Formulările de test sunt filtrate steril și apoi transferate volumetric în fiole de sticlă de 10 mL cu o umplere de 7 mL, închise cu dop, și etanșate prin sertizare.

Fiolele sunt supuse la a treisprezece zi a studiului accelerat de stabilitate la o inspecție vizuală periodică urmând în general metoda descrisă mai sus. Datele sunt furnizate mai jos în Tabelul 26.

Tabelul 26.

Compoziție	Zi 2 (n=2)	Zi 4 (n=2)	Zi 8 (n=4)	Zi 10 (n=4)	Zi 13 (n=4)
S	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% trecută	50% trecută
R	100% Trecută	50% Trecută	0% Trecută	N/A	N/A

Rezultatele susțin că magneziul îmbunătățește stabilitatea Compoziției S față de Compoziția R.

Stabilitatea fizică a insulinei lispro formulată cu 25 mM citrat, 5 mM MgCl₂, 20 mM clorură, 0,6 mM zinc, 0,09 % poloxamer

A 69 zi a studiului accelerat al duratei de valabilitate este efectuată pe o formulare cuprinzând 100 U/mL insulină lispro, 5 mM MgCl₂, 20 mM clorură, 0,6 mM zinc, 0,09 % m/v poloxamer 188, 5 mg/mL glicerină și 3,15 mg/mL m-cresol (Compoziție T).

O formulare concentrată vrac este preparată prin dizolvarea de glicerină, metacresol, lispro și oxid de zinc în apă pentru operațiuni sterile vrac prin adăugarea de HCl până la un pH mai scăzut. După ajustarea pH-ului până la 7,4 - 7,5 cu NaOH, se adaugă o soluție de concentrație adecvată de citrat și agenți suplimentari pentru stabilizare pentru a obține concentrația excipientului țintă final a Compoziției T. Această soluție este alcătuită din tampon de citrat de sodiu, clorură de zinc, hexahidrat de clorură de magneziu, și poloxamer 188 în apă pentru operațiuni sterile vrac. După ajustarea pH-ului până la 7,4 - 7,5, dacă necesar, se adaugă soluție de clorură de sodiu pentru a obține concentrația țintă de clorură totală. Formularea este apoi q.s. la volum cu apă pentru operațiuni sterile vrac.

Formulările sunt filtrate steril și apoi transferate volumetric în fiole de sticlă de 10 mL cu o umplere de 10,3 mL, închise cu dop, și etanșate prin sertizare. Fiolele sunt depozitate static și în poziție verticală la 30°C și inspectate vizual, urmând în general metoda descrisă mai sus, la zilele 36 și 69. Toate fiolele inspectate la fiecare moment de timp au trecut (n=3 pentru ziua 36 și n=5 pentru ziua 69). Aceste rezultate susțin că, Compoziția T rămâne clară și incoloră fără precipitate într-un studiu accelerat al duratei de valabilitate.

Insulină lispro formulată cu concentrații variabile de citrat, magneziu, clorură, zinc, surfactant, glicerină și TRIS

Stabilitate fizică a următoarelor șapte formulări este testată într-un studiu simulat de 32 zile pe un pacient în uz:

Tabelul 27.

Compoziție	Citrat (mM)	MgCl ₂ (mM)	Total Cl- (mM)	Zn, (mM)	P88 (% m/v)	Glicerină (mg/mL)	TRIS, (mM)	m-cresol (mg/mL)
U	25	5	21	0,6	0,12	5	0	3,15
W	25	8,3	31	0,6	0,06	5	0	3,15
X	20	5	20	0,6	0,09	5	0	3,15
Y	20	5	20	0,6	0,12	5	0	3,15
Z	25	5	>30	0,6	0,09	1,3	40	3,15
AA	25	8,3	28	0,6	0,09	4,1	10	3,15

Soluțiile stoc lispro concentrate sunt preparate prin dizolvarea de cantități adecvate de glicerină, metacresol, lispro, oxid de zinc și, opțional, TRIS în apă pentru operațiuni sterile vrac prin adăugarea de HCl până la un pH mai scăzut. Compozițiile din cele două soluții concentrate sunt după cum urmează: (1) 200 U/mL lispro, 12 mM total clorură, 10 mg/mL glicerină, 6,3 mg/mL Metacresol, 0,6 mM total zinc; și (2) 200 U/mL lispro, 51 mM total clorură, 2,6 mg/mL glicerină, 6,3 mg/mL Metacresol, 0,6 mM total zinc, 80 mM TRIS. Soluțiile sunt apoi pH-ajustate până la 7,4 - 7,5 cu NaOH sau HCl și umplute la volum cu apă pentru operațiuni sterile vrac.

Compozițiile de test sunt preparate prin diluarea soluțiilor stoc lispro prin adăugarea secvențială de tampon de citrat de sodiu, zinc în soluție de HCl, hidroxid de sodiu pentru ajustarea pH-ului, soluție hexahidrat de clorură de magneziu, soluție de poloxamer 188, și soluție de clorură de sodiu. Compozițiile sunt filtrate steril și apoi volumetric q.s. la volum cu apă pentru operațiuni sterile vrac. Compozițiile sunt transferate volumetric în fiole din sticlă de 10 mL cu o umplere de 10,3 mL, închise cu dop, și etanșate prin sertizare.

Compozițiile sunt depozitate la 30°C și supuse la condiții simulate de dozare în utilizare de 3 ori pe zi, cum s-a descris în următoarele etape: se obține o seringă de insulină și se extrag 8 unități de aer; se inserează acul în fiolă în timp ce fiola este în poziție verticală; se asigură ca vârful acului să nu atingă

soluția de insulină; se injectează aerul în fiolă; în timp ce se menține acul în fiolă, se întorc fiola și seringă cu susul în jos; se extrag 8 unități de compoziție; dacă există bule de aer în seringă, se mișcă încet plonjorul pentru a împinge bulele înapoi în fiolă; se ajustează plonjorul seringii astfel ca dozajul final să fie de 8 unități; se îndepărtează seringă și se plasează fiola înapoi în incubatorul de 30°C.

- 5 Inspecțiile vizuale, urmând în general metoda descrisă mai sus, sunt efectuate în zilele 15, 20, 25, 28 și 32. Datele sunt furnizate în Tabelul 28.

Tabelul 28.

Compoziție	15 Zile (n=5)	20 Zile (n=5)	25 Zile (n=5)	28 Zile (n=5)	32 Zile (n=5)
U	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	80% Trecută	80% Trecută
W	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
X	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
Y	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	80% Trecută	67% Trecută
Z	100% Trecută	100% Trecută	60% Trecută	10% Trecută	0% Trecută
AA	100% Trecută	80% Trecută	60% Trecută	20% Trecută	0% Trecută

- 10 Colectiv, studiile descrise mai sus demonstrează că compozițiile de insulină cu anumit concentrații specifice de citrat și alți excipienți cum ar fi zinc, magneziu, clorură și surfactant au debut de acțiune mai timpuriu, precum și efecte de scădere a glucozei mai timpurii, și în anumite realizări sunt stabile chimic și fizic.

Secvențe

- 15 Catena A de insulină umană
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn (SEQ ID NO: 1).
- Catena B de insulină umană
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
- 20 Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr (SEQ ID NO: 2).
- Catena B de insulină lispro
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
- Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr (SEQ ID NO: 3).
- Catena B de insulină aspart
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
- Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Thr (SEQ ID NO: 4).
- 25 Catena B de insulină glulizină
Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
- Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr (SEQ ID NO: 5).

Listă de secvențe

- 30 <110> Eli Lilly și Company
<120> COMPOZIȚII DE INSULINĂ CARE ACȚIONEAZĂ RAPID
<130> X20221
<150> 62/092407
<151> 16-12-2014
- 35 <160> 5
<170> Versiune patentln 3.5
<210> 1
<211> 21
<212> PRT
- 40 <213> Homo sapiens
<400> 1

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

<210> 3

<211> 30

10 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

<400> 3

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr
20 25 30

15 <210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> Secvență artificială

20 <220>

<223> construcție sintetică

<400> 4

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Thr
20 25 30

<210> 5

25 <211> 30

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

30 <400> 5

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr
20 25 30

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- CAPELLE ET AL: "High throughput screening of protein formulation stability: Practical considerations", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 65, no. 2, 5 January 2007 (2007-01-05), pages 131-148, XP005823137, ISSN: 0939-6411, DOI: 10.1016/J.EJPB.2006.09.009
- WO-A1-2010/102020
- WO-A1-2010/102020
- WO-A1-2013/158618
- US-A1- 2013 231 281
- US-A1- 2013 231 281
- US-A1- 2014 357 554

(57) Revendicări:

1. O compoziție farmaceutică cuprinzând:
 - a. o insulină, într-o concentrație de aproximativ 100 până la aproximativ 200 IU/mL;
 - b. citrat, într-o concentrație de la aproximativ 15 până la aproximativ 35 mM;
 - c. zinc, într-o concentrație de la aproximativ 0,3 până la aproximativ 0,8 mM; și
 - d. un conservant; șiîn care compoziția nu include EDTA sau nici o oligozaharidă.
2. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 1, cuprinzând în plus clorură de magneziu într-o concentrație de până la aproximativ 5 mM.
3. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 1, în care insulina este insulină lispro.
4. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 1 în care concentrația de citrat este de la aproximativ 15 până la aproximativ 25 mM.
5. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 1, în care conservantul este selectat dintre fenol sau metacresol.
6. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 5, în care conservantul este metacresol.
7. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 6, în care concentrația de metacresol este de la aproximativ 2,5 până la aproximativ 3,8 mg/mL.
8. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 1, cuprinzând în plus un agent de tonicitate.
9. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 8, în care agentul de tonicitate este glicerolul.
10. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 1 în care pH-ul compoziției este de la aproximativ 7,0 până la aproximativ 7,8.
11. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 1, în care compoziția prevede o absorbție a insulinei în sânge care este cu cel puțin 20% mai rapidă decât pentru compozițiile care conțin aceeași insulină dar care nu conțin citrat.
12. Compoziția farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 11 pentru utilizare în terapie.

13. Compoziția farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 11 pentru utilizare în tratamentul diabetului.

14. Un articol de fabricare cuprinzând oricare din compozițiile farmaceutice din revendicările 1 până la 11.

15. Articolul de fabricare conform revendicării 14 care este o fiolă cu utilizări multiple.

16. Articolul de fabricare conform revendicării 14 care este un stilou injector reutilizabil.

17. Articolul de fabricare conform revendicării 14 care este un dispozitiv cu pompă pentru terapia prin perfuzie subcutanată continuă cu insulină.