

CASTELLANOS & Co. LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-001866- -00007-0000

Fecha: 2014-05-06 15:49:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 25

Señor

Director de la División de Nuevas Creaci

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo Industria

E.

S.

D.

Re.: Expediente No. **12 001866**

Solicitud de Patente PCT Entrada en Fase Nacional, para:

“PREPARACIONES INSULÍNICAS QUE COMPRENDEN METIONINA”

Solicitante: **SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente me permito dar repuesta a su oficio No. 1421 notificado el 11 de febrero de 2014, de la siguiente manera:

1. Modificación a las reivindicaciones

De acuerdo con lo establecido en el Artículo 34 de la Decisión 486 y en vista de las observaciones realizadas por el examinador, se presenta en esta oportunidad un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 18 reivindicaciones, en el cual se han realizado las siguientes modificaciones:

- Siguiendo las amables recomendaciones del examinador, se ha limitado el alcance del pliego reivindicatorio a una formulación farmacéutica acuosa que comprende un análogo de insulina o una sal farmacológicamente tolerable del mismo y metionina, en donde el análogo de insulina se selecciona del grupo que consiste de insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32) e insulina humana Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂, y en donde la composición tiene un pH en el rango de pH 2,5-4,5.
- En vista de lo anterior no se incluyen las reivindicaciones 2 a 3 y 7.

CASTELLANOS & Co. LTDA

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A - 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

- Se ha modificado la reivindicación 4 (nueva reivindicación 2) incluyendo el contenido de las reivindicaciones 5 y 6 con el fin de definir claramente cuáles son los posibles conservantes y agentes isotónicos.
- No se incluyen las reivindicaciones 20 a 22, 25 y 26.
- Se incluyen nuevas reivindicaciones 27 y 28 dirigidas a dos formulaciones específicas, de conformidad con el soporte encontrado en la descripción.

Por lo anterior es posible establecer que el nuevo pliego reivindicatorio es claro y conciso, ya que define específicamente el objeto reivindicado. Además este objeto se encuentra debidamente soportado en la descripción.

En consecuencia, se solicita atentamente tener en cuenta este nuevo pliego reivindicatorio para el análisis de patentabilidad, toda vez que no implica una ampliación de la materia inicialmente solicitada y además permite superar las objeciones comunicadas por el examinador.

2. Descripción

El examinador ha objetado la descripción de la solicitud, argumentando que no divulga la invención de manera suficientemente completa para que la persona del oficio normalmente versada en la materia pueda ejecutarla o reproducirla.

Teniendo en cuenta esta observación, se ha limitado el pliego reivindicatorio como se indica en el numeral 1. Por lo tanto, es posible establecer que la materia reivindicada encuentra el soporte debido en la descripción y que la objeción formulada a este respecto se ve superada.

3. Análisis de patentabilidad

3.1 Nivel inventivo

Para la evaluación de este requerimiento, el examinador ha citado las anterioridades D1: US 2002132760 y D2: US 20070191271. Se afirma que el uso de metionina para aumentar la estabilidad ya había sido divulgado en el documento D2, lo que demuestra que es un antioxidante eficaz para polipéptidos que carecen de un residuo de metionina. Así, una persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría la metionina según lo divulgado en el

CASTELLANOS & Co. LTDA

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A - 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

documento D2, en las composiciones de derivados de insulina enseñadas en D1, para llegar al objeto de la reivindicación 1 de la presente solicitud, afectando su nivel inventivo.

En este sentido, respetuosamente nos apartamos de la opinión del examinador por cuanto la formulación acuosa reivindicada en la presente solicitud sí tiene nivel inventivo, ya que no podía ser derivada de manera obvia a partir de D1 y D2.

En primer lugar, el Examinador no ha dado respuesta a los argumentos presentados junto con el memorial de defensa a la oposición interpuesta por PROCAPS ni tampoco ha indicado por qué los resultados experimentales adjuntados no han sido considerados como prueba del efecto técnico asociado a la formulación reivindicada.

Ahora bien, tal como se indicó, D1 no enseña o sugiere una formulación acuosa que comprende los análogos de insulina de la presente invención. De modo que, al comparar las características esenciales de la presente invención con la materia de invención revelada en el documento D1, se observa que a pesar de que D1 menciona de forma general una mezcla de especies de insulina, dicho documento no anticipa la formulación específica acá reivindicada.

De otro lado, D1 en combinación con D2 no enseña o sugiere una formulación farmacéutica acuosa que comprende un análogo de insulina o una sal farmacológicamente tolerable del mismo y metionina, en donde el análogo de insulina se selecciona del grupo que consiste de insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32) e insulina humana Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂, y en donde la composición tiene un pH en el rango de pH 2,5-4,5.

Una persona medianamente versada en la materia que busca estabilizar una formulación como la reivindicada no se vería motivada a emplear el documento D1 en combinación con D2. En particular, el documento D1 está dirigido a una composición que comprende: una primera especie de insulina y una segunda especie de insulina, en el que la primera especie de insulina y la segunda especie de insulina forman un complejo heterodimérico; y en el que la primera especie de insulina y la segunda especie de insulina se seleccionan de manera que el complejo heterodimérico es más estable que un complejo homodímero formado por la primera especie de insulina o un complejo homodímero formado por la segunda especie de insulina. En vista de esto, la persona medianamente versada en la materia que tiene acceso a dicha información y al contenido de D1, entiende que las especies allí mencionadas encuentran su estabilidad en la

formación del complejo heterodimérico y que en consecuencia, no requieren la adición de un componente que ofrezca dicho efecto. Por su parte, el documento D2 no revela la aplicación de metionina a una solución como la reivindicada en la presente solicitud, la cual específicamente comprende un análogo de insulina como el mencionado, con el pH en el rango de pH 2,5-4,5.

Adicionalmente, los inventores de la presente solicitud encontraron de forma sorprendente que al adicionar metionina a formulaciones que comprenden el análogo de insulina reivindicado se obtiene una estabilidad mejorada. El ejemplo 2 de la presente solicitud describe un estudio relacionado con la estabilidad, con base en tres antioxidantes diferentes. En dicho estudio se emplea el análogo de insulina SAR161271 (Insulina humana Arg(A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂). Así, las formulaciones que comprenden glutatión o ácido ascorbico, muestran un cambio en el color luego de un almacenamiento de 3 meses. Por el contrario, la que comprende metionina no mostró cambios en el color y permaneció estable luego de un periodo de almacenamiento de 1 mes a 5°C.

Asimismo, se anexan nuevamente los datos experimentales que demuestran la estabilización de insulina glargina (HOE901, Lantus, Gly(A21), Arg(B31), Arg (B32)-insulina humana) por metionina.

Finalmente, se adjunta un nuevo ensayo experimental en donde se describe y demuestra el efecto de estabilidad otorgado por la metionina a una composición que incluye insulina glargina y lixisenatida (desPro³⁶-exendin-4-Lys₆-NH₂). En este ensayo se prueban diferentes formulaciones que comprenden insulina glargina (Lantus) y lixisenatida (AVE0010) a un pH de 4 o 4,5 incluyendo diferentes excipientes. La estabilidad se determinó directamente después de la producción (T0) y después de un mes de almacenamiento a 25°C o 40°C (ver resultados y figuras 1 a 3).

Aún a T0, la metionina provee un efecto benéfico. Las formulaciones que comprenden metionina tuvieron las menores cantidades de impurezas (alrededor de 1,2% a 1,5%). Por el contrario, las formulaciones que no comprenden metionina exhibieron una gran proporción de impurezas. Después de un mes de almacenamiento a 40°C, se midió la cantidad de impurezas de lixisenatida y se estableció que las formulaciones que comprenden metionina tuvieron la menor cantidad de metionina oxidada (met(ox)) y las menores cantidades de otras impurezas (ver formulaciones 25, 26, 28 y 30, figuras 1 y 2). Estas formulaciones también mostraron menores cantidades de impurezas que las formulaciones de control.

CASTELLANOS & Co. LTDA

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A - 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

Tal como indican las conclusiones del estudio, la presencia de metionina resulta en una estabilidad química mejorada y no tiene un impacto negativo sobre la estabilidad física de formulaciones en donde se combina lixisenatida e insulina glargina. Así, la presencia de metionina es ventajosa para dichas formulaciones.

En consecuencia, es posible concluir que la presente invención resulta inventiva sobre el arte previo.

4. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por dieciocho (18) reivindicaciones.
- Formulario de modificaciones de solicitud en trámite.
- Resultado experimental 1 : Supplementary Experimental Data
- Resultado experimental 2: Ejemplo 1

Señor Director,


Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Bogotá
T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.
Calle 94A No. 7A-09 - Bogotá, D.C.
Teléfono: 7560770

Bogotá, D.C. **06 MAYO 2014**
MCA/jm 
P2389
RESPUESTA EXAMEN DE FONDO

REIVINDICACIONES EN RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

1. Una formulación farmacéutica acuosa que comprende un análogo de insulina o una sal farmacológicamente tolerable del mismo y metionina, en donde el análogo de insulina se selecciona del grupo que consiste de insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32) e insulina humana Arg(A0), His(A8), Glu(A15), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂, y en donde la composición tiene un pH en el rango de pH 2,5-4,5.

2. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende

0,001 a 0,2 mg/ml de zinc,

0,1 a 5,0 mg/ml de un conservante y

5,0 a 100 mg/ml de un agente isotónico, en donde el conservante se selecciona del grupo que consiste de fenol, m-cresol, clorocresol, alcohol bencílico y parabenos y en donde el agente isotónico se selecciona del grupo que consiste de manitol, sorbitol, lactosa, dextrosa, trehalosa, cloruro de sodio y glicerol.

3. La formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que tiene un pH en el rango de pH 3,0 - 4,0.

4. La formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene un pH en el rango de pH 3,75.

5. La formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el análogo de insulina está presente en una concentración de 240 – 3000 nmol/ml.

6. La formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende glicerol en una concentración de 20 a 30 mg/ml.

7. La formulación farmacéutica de acuerdo cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 6, que además comprende glicerol en una concentración de 25 mg/ml.

8. La formulación farmacéutica de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que además comprende m-cresol en una concentración de 1 a 3 mg/ml.

9. La formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende m-cresol en una concentración de 2 mg/ml.

10. La formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que además comprende zinc en una concentración de 0,01 ó 0,03 ó 0,08 mg/ml.

11. La formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que además comprende un péptido-1 tipo glucagón (GLP1) o uno de sus análogos o derivados, o exendina-3 y/o -4 o uno de sus análogos o derivados.

12. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, que además comprende exendina-4.

13. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en la que un análogo de exendina-4 se selecciona del grupo que consiste de
 H-desPro³⁶-exendina-4-Lys₆-NH₂,
 H-des(Pro^{36,37})-exendina-4-Lys₄-NH₂ y
 H-des(Pro^{36,37})-exendina-4-Lys₅-NH₂,
 o una sal farmacológicamente tolerable de los mismos.

14. La Formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en la que un análogo de exendin-4 se selecciona del grupo que consiste de
 desPro³⁶ [Asp²⁸]exendina-4 (1-39),
 desPro³⁶ [IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),

desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4 (1-39),
 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
 desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-2 (1-39),
 desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]exendina-2 (1-39),
 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4 (1-39) y
 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39)
 o una sal farmacológicamente tolerable de los mismos.

15. La formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende metionina en el rango de concentración de hasta 10 mg/ml.

16. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende metionina en el rango de concentración de hasta 3 mg/ml.

17. Una formulación farmacéutica acuosa que comprende insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32) y metionina.

18. Una formulación farmacéutica acuosa que comprende insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32), H-desPro³⁶-exendina-4-Lys₆-NH₂ y metionina.

46074P CO-WO/WWDiil
Supplementary Experimental Data

Orientating Stability Study Lantus -
3 months results

3 months +5 ± 3 °C

Batch no.	Assay HOE901 [mg/mL]	Largest single protein [%]	Sum of related impurities [%]	HMWP [%]	pH
929	3,66	0,2	0,5	<0.1	4,0
934	3,69	0,2	0,4	<0.1	4,0
935	3,69	0,2	0,7	0.2	4,0
936	3,70	0,2	0,6	<0.1	3,9

3 months +25 °C

Batch no.	Assay HOE901 [mg/mL]	Largest single protein [%]	Sum of related impurities [%]	HMWP [%]	pH
929	3,62	0,4	1,6	0.4	4,0
934	3,67	0,3	1,0	0.1	4,0
935	3,56	0,3	1,6	0.5	4,0
936	3,56	0,3	1,2	0.2	3,9

3 months 30 °C

Batch no.	Assay HOE901 [mg/mL]	Largest single protein [%]	Sum of related impurities [%]	HMWP [%]	pH
929	3,48	0,6	3,1	0,9	4,1
934	3,56	0,5	1,7	0,7	4,0
935	3,49	0,5	2,9	0,3	4,0
936	3,51	0,5	2,2	0,5	3,9

3 months 37 °C

Batch no.	Assay HOE901 [mg/mL]	Largest single protein [%]	Sum of related impurities [%]	HMWP [%]	pH
929	3,30	1,4	7,2	2,7	4,1
934	3,54	1,1	3,8	0,4	4,0
935	3,38	1,2	5,1	1,8	4,0
936	3,44	1,2	4,4	0,9	3,9

Batch No. 929 corresponds to a formulation of insulin glargine (100 U/ml) containing 60 mcg/ml zinc chloride, 2.7 mg/ml m-cresol, 20 mg/ml glycerol 85%, and water. Batches nos. 934, 935 and 936 additionally contain 3.0/1.5/0.75 mg/ml methionine. It is evident that the occurrence of by-products is reduced by the presence of methionine. The tests that were carried out consisted of storing the samples at different temperatures over different time periods and a subsequent chemical analysis, using known analytical methods.

1. Propósito del estudio

Se ensayó la estabilidad física y química de las composiciones que comprenden un agonista de GLP-1 (AVE0010) y una insulina (insulina glargina, Lantus).

15 2. Formulaciones usadas

Para las formulaciones ensayadas, las sustancias se usaron en las siguientes concentraciones/cantidades:

Sustancia	Farmacopea	Fabricante	Nombre	Cantidad usada [mg/ml]
Insulina glargina		Sanofi-Aventis		3,63 7,27 10,67
AVE0010		Poly Peptide LabTorrance CA, USA		0,1 0,025
Metionina	USP	MP Biomedicals		3
Cloruro de cinc	Ph. Eur., USP, BP	Merck		0,03 0,06 0,09

Sustancia	Farmacopea	Fabricante	Nombre	Cantidad usada [mg/ml]
Glicerol, 85%	Ph. Eur., JP	Hedinger, Stuttgart		20 18
m-Cresol	Ph. Eur., USP	Hedinger, Stuttgart		2,7
Polisorbato 20	Ph. Eur., JP	Koib	Tween 20	0,02
Polisorbato 80	Ph. Eur.	SEPPIC	Tween 80	0,02
Poloxámero 188		BASF, Ludwigshafen	Lutrol F68	0,02
Cloruro de benzalconio	Ph. Eur., JP	Sigma-Aldrich		0,02
L-Lisina		Resum, F-Ham, Degussa		1,0 5,0
Acetato				1,75 3,5
NaOH	Ph. Eur., JP	Merck		0,1 N, para ajustar a pH 4,0 ó 4,5
HCl	Ph. Eur., JP	Merck		0,1 N, para ajustar a pH 4,0 ó 4,5
Agua				Hasta 1 ml

5 Cuando se menciona un factor junto con un constituyente de una formulación (por ejemplo, 1/2, 1/4, 2x, 3x, 5x como en acetato 1/2, lisina 5x, Lantus 2x y Lantus 3x), las concentraciones de la sustancia en cuestión se usaron a una concentración reducida o aumentada dependiendo del factor.

3. Método de ensayo

3.1. Estabilidad física

3.1.1. Ensayo de THT

La tioflavina T (THT) se une específicamente a las fibrillas de la proteína, lo que conduce a un cambio en la fluorescencia de la THT. LA THT no se une a AVE0010 ni a insulina. La cinética de la formación de fibrillas puede medirse en presencia de la THT como el cambio de fluorescencia.

Un aumento en la fluorescencia se corresponde con la formación de fibrillas. La forma de las curvas permite extraer conclusiones sobre la tendencia de una formulación para formar fibrillas.

Las mediciones de fluorescencia se realizaron sobre un instrumento de medición de fluorescencia Tecan Infinite 200. Para el análisis de la cinética de fibrilación, se usó un lector de microplaca de fluorescencia a temperatura elevada Photomed FluoDia 770. El espectro de fluorescencia de la tioflavina T se realizó con un instrumento de medición de fluorescencia Tecan Infinite 200 a 23°C. La insulina (900 µl) se mezcló con 10 µl de tioflavina T (1 mM en H₂O). Después la mezcla se distribuyó en una placa de 96 pocillos negros con forma de V de Biozym (100 µl por pocillo). La emisión de fluorescencia se midió entre 470 y 600 nm (en incrementos de 1 nm) después la excitación a 450 nm con un aumento de 100, un tiempo de integración de 200 µs y 25 lecturas a temperatura ambiente.

La cinética de unión de tioflavina T se midió sobre un lector de microplaca de fluorescencia a temperatura elevada Photomed FluoDia 770. El instrumento comprende esencialmente una lámpara halógena de cuarzo de 50 W para la excitación, ruedas de filtro para la excitación y emisión conteniendo cada una hasta 4 conjuntos de filtros y un detector PMT (tubo fotomultiplicador). La placa térmica para las placas de 96 pocillos permite una gran precisión con respecto a la temperatura (mejor de ±0,3°C).

Se añadió una solución (10 µl) de tioflavina T (10,1 mM en agua ultrapura) a 1 ml de las formulaciones y se mezcló suavemente invirtiendo los tubos pequeños varias veces. Después la mezcla se distribuyó en una placa de 96 pocillos oscuros en forma de V de Biozym (100 µl por pocillo, 8 pocillos por muestra). Todas las mediciones se realizaron con los siguientes parámetros:

Número de ciclos:	181
Filtro de excitación:	450 nm
Intervalo:	1 min

Filtro de emisión: 486 nm
Tiempo de integración: 20 ms
Control de temperatura: Temperatura convencional-modo control
Número de promedios: 4
Temperatura diana: 70°C
Atenuación: 4

Los valores medios de fluorescencia se determinaron a partir de 8 mediciones en paralelo.

3.2 Estabilidad química

5 Las formulaciones se ensayaron para determinar la estabilidad química después de la preparación (t0) o después del almacenamiento durante 1 mes a 4°C, 25°C (humedad relativa del 60%) y 40°C (humedad relativa del 75%). Las mediciones se realizaron en un instrumento de HPLC (modelo: alliance) de Water Systems, usando el método del área máxima al 100%. Para la separación, se usó un gradiente de TFA al 0,1% y acetonitrilo como la fase móvil y una columna de fase inversa C18 (Jupiter) como la fase estacionaria. Para el análisis, la formulación se trató con una solución de acetato de cinc, que condujo a la precipitación de la insulina glargina. Los precipitados se centrifugaron y sólo se analizó el sobrenadante.

15 Impurezas de insulina glargina: la cantidad de impurezas se determinó con una HPLC (Water Systems), usando el método del área máxima al 100%. Para la separación, se usó una solución tamponada con fosfato de sódico (pH 2,5) con gradientes de NaCl y acetonitrilo como la fase móvil. Se usó una columna de fase inversa C18 como la fase estacionaria.

20 4. Resumen de datos experimentales sobre la estabilidad física

Formulación		Composición	pH	THT 3 h, intensidad de fluorescencia relativa a 70°C a 486 nm
Nº	Lote			
1	630	AVE0010 convencional, escala industrial	4,5	536
2	567	AVE0010 convencional, reciente	4	518

Formulación		Composición	pH	THT 3 h, intensidad de fluorescencia relativa a 70°C a 486 nm
Nº	Lote			
3	631	Lantus convencional, escala industrial	4,0	2952
4	560	Lantus convencional, reciente	4	1566
5	568	Forma Lantus, AVE0010	4	2037
6	569	Forma Lantus, AVE0010, tampón acetato ½	4	11763
7	570	Forma Lantus, AVE0010, tampón acetato	4	69184
8	582	Forma Lantus, AVE0010, metionina	4	2053
9	583	Forma Lantus, AVE0010, tampón de acetato 1/2, metionina	4	18814
10	584	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20	4	8183
11	585	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20, metionina	4	6731
12	586	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20, tampón acetato 1/2	4	13897
13	587	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20, tampón acetato 1/2, metionina	4	22200

Formulación		Composición	pH	THT 3 h, intensidad de fluorescencia relativa a 70°C a 486 nm
Nº	Lote			
14	588	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20, tampón acetato, metionina	4	134093
15	590	Forma Lantus, AVE0010, lisina	4	3362
16	591	Forma Lantus, AVE0010, lisina, tampón acetato 1/2	4	19677
17	592	Forma Lantus, AVE0010, lisina, tampón acetato 1/2, polisorbato 20	4	30176
18	593	Forma Lantus, AVE0010 1/4	4	3107
19	594	Forma Lantus, AVE0010 1/4, lisina 5x	4	74662
20	595	Lantus 2x, AVE0010	4	4504
21	596	Lantus 3x, AVE0010	4	30251
22	604	Forma Lantus, AVE0010	4,5	4357
23	605	Forma Lantus, AVE0010, tampón acetato 1/2	4,5	36338
24	606	Forma Lantus, AVE0010, tampón	4,5	72370

Formulación		Composición	pH	THT 3 h, intensidad de fluorescencia relativa a 70°C a 486 nm
Nº	Lote			
		acetato		
25	607	Forma Lantus, AVE0010, metionina	4,5	5429
26	608	Forma Lantus, AVE0010, tampón acetato 1/2, metionina	4,5	34714
27	609	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20	4,5	1166
28	610	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20, metionina	4,5	5564
29	611	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20, tampón acetato 1/2	4,5	12115
30	612	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20, tampón acetato 1/2, metionina	4,5	16397
31	613	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20, tampón acetato, metionina	4,5	779
32	614	Forma Lantus, AVE0010, lisina	4,5	9726
33	615	Forma Lantus, AVE0010, lisina, tampón acetato 1/2	4,5	74027

Formulación		Composición	pH	THT 3 h, intensidad de fluorescencia relativa a 70°C a 486 nm
Nº	Lote			
34	616	Forma Lantus, AVE0010, lisina, tampón acetato 1/2, polisorbato 20	4,5	9520
35	617	Forma Lantus, AVE0010 1/4x	4,5	3713
36	618	Forma Lantus, AVE0010 1/4x, lisina 5x	4,5	83384
37	619	Lantus 2x, AVE0010	4,5	13120
38	620	Lantus 3x, AVE0010	4,5	41684
39	657	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 80, metionina	4	9309
40	658	Forma Lantus, AVE0010, poloxamer 188, metionina	4	767
41	659	Forma Lantus, AVE0010, cloruro de benzalconio, metionina	4	1040
42	660	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 80, metionina	4,5	16803
43	661	Forma Lantus, AVE0010, poloxamer 188, metionina	4,5	689

Formulación		Composición	pH	THT 3 h, intensidad de fluorescencia relativa a 70°C a 486 nm
Nº	Lote			
44	662	Forma Lantus, AVE0010, cloruro de benzalconio, metionina	4,5	942

5. Ensayo de THT

La metionina no tiene ninguna influencia sobre la tendencia a formar fibrillas. Las formulaciones tienen valores de fluorescencia parecidos a los de las formulaciones de la referencia (nº 2 y 4). Con valores aproximadamente inferiores a 6000, sin presentar tendencia a formar fibrillas.

Nº	Composición	Intensidad de fluorescencia a 486 nm
2	AVE0010 convencional	518
4	Lantus convencional	1566
8	Forma Lantus, AVE0010, metionina, pH 4	2053
25	Forma Lantus, AVE0010, metionina, pH 4,5	5429

Cuando se combinan AVE0010, Lantus y metionina con tampón acetato con o sin polisorbato 20 a pH 4, existe una mayor tendencia a formar fibrillas:

Nº	Composición	Intensidad de fluorescencia a 486 nm
2	AVE0010 convencional	518
4	Lantus convencional	1566
9	Forma Lantus, AVE0010, acetato 1/2, Met, pH 4	18814
13	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato	22200

Nº	Composición	Intensidad de fluorescencia a 486 nm
	20, acetato 1/2, Met, pH 4	
14	Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20, acetato, Met, pH 4	134093

Los valores para las formulaciones 13 y 14 están claramente por encima del umbral para una tendencia a formar fibrillas.

6.1 Resumen

- 5 El polisorbato 20 y el polisorbato 80 pueden producir un enturbiamiento, que puede detectarse en el ensayo de doble refracción. Por lo tanto, estas dos sustancias pueden conducir a la inestabilidad física de una formulación de AVE0010 e insulina.

La adición de metionina no conduce a inestabilidad física.

10 7. Estabilidad química

7.1 Estabilidad en el momento t0

Las formulaciones que comprenden metionina (con y sin acetato sódico) tienen las cantidades de impurezas más bajas (en su totalidad, aproximadamente de 1,2 a 1,5%). Las siguientes formulaciones tienen cantidades bajas de impurezas:

15

- 8 Forma Lantus, AVE0010, metionina, pH 4
- 9 Forma Lantus, AVE0010, tampón acetato 1/2, metionina, pH 4
- 11 Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20, metionina, pH 4
- 13 Forma Lantus, AVE0010, tampón acetato 1/2, polisorbato 20, metionina, pH 4
- 14 Forma Lantus, AVE0010, tampón acetato, polisorbato 20, metionina, pH 4
- 25 Forma Lantus, AVE0010, metionina, pH 4,5
- 26 Forma Lantus, AVE0010, tampón acetato 1/2, metionina, pH 4,5
- 28 Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20, metionina, pH 4,5
- 30 Forma Lantus, AVE0010, tampón acetato 1/2, polisorbato 20, metionina, pH 4,5
- 31 Forma Lantus, AVE0010, tampón acetato, polisorbato 20, metionina, pH 4,5

Las formulaciones que no comprenden metionina muestran una mayor fracción de impurezas.

El polisorbato 20 no tiene influencia negativa sobre la estabilidad química de las formulaciones.

El tampón de acetato no tiene influencia negativa sobre la estabilidad química cuando éste se combina con metionina y polisorbato 20.

5 Cuando en las formulaciones existe lisina, la suma de impurezas es mayor. Lo mismo ocurre en las formulaciones que comprenden polisorbato 80, poloxamer 188 y cloruro de benzalconio.

La determinación de las impurezas de la insulina glargina reveló que todas las formulaciones tenían cantidades comparables de impurezas (del 0,3 al 0,4%).

10 7.2 Estabilidad después de 1 mes

7.2.1 Impurezas de AVE0010

Se analizó el contenido de metionina oxidada en las formulaciones. La secuencia de AVE0010 tiene un resto de metionina en la posición 14. La secuencia de la insulina glargina no tiene restos de metionina. Por lo tanto, el contenido de metionina oxidada es indicativo de oxidación de AVE0010 en el resto de metionina. Los datos se resumen en la figura 1. En su conjunto, los datos demuestran que, sin metionina a un pH de 4,5, la fracción de Met(ox) es superior a un pH de 4.0. Sin metionina como un constituyente de las formulaciones, las fracciones de Met(ox) son más altas cuando se aumenta el contenido de insulina glargina o se reduce el contenido de AVE0010..

Generalmente, las fracciones más altas de Met(ox) se midieron después del almacenamiento a 40°C/humedad relativa al 75%. En este caso, las fracciones más bajas de Met(ox)-AVE0010 (<1%) se encuentran en las formulaciones 8, 9, 11, 13, 14, 25, 26, 28, 30 y 31. Los valores de estas formulaciones se encuentran en el intervalo de los valores para las formulaciones de referencia nº 1 y 2 de AVE0010 (marco en la figura 1).

Las impurezas de AVE0010 después de 1 mes sin Met(ox) se representan en la figura 2. Los marcos muestran los valores de las formulaciones de referencia de AVE0010 a 25°C y a 40°C. Las formulaciones que tienen los mismos o mejores valores de impureza que las formulaciones de referencia de AVE0010 se encuentran dentro o por debajo de los marcos. Lo mismo ocurre en las formulaciones 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33 y 34 (40°C). Los valores de impureza que se encuentran por encima de los valores de impureza de las formulaciones de referencia de AVE0010 indican impurezas de insulina glargina. Generalmente, las

formulaciones que tienen un pH de 4,5 tienen menores impurezas que a un pH de 4,0.

Las siguientes formulaciones tienen, después del almacenamiento durante 1 mes a 40°C, el contenido más bajo de Met(ox) y, de manera simultánea, el contenido más bajo de otras impurezas (comparación de las figuras 1 y 2). Son mejores o iguales que las formulaciones de referencia de AVE0010:

25 Forma Lantus, AVE0010, metionina, pH 4,5

26 Forma Lantus, AVE0010, tampón acetato 1/2, metionina, pH 4,5

28 Forma Lantus, AVE0010, polisorbato 20, metionina, pH 4,5

30 Forma Lantus, AVE0010, tampón acetato 1/2, polisorbato 20, metionina, pH 4,5

Estas formulaciones también pertenecen a aquellas formulaciones que en el momento t0 tienen las cantidades más bajas de impurezas de AVE0010. Todas las formulaciones comprenden metionina. El polisorbato 20 no tiene efectos negativos sobre las impurezas.

Las impurezas de la insulina glargina se representan en la figura 3. Las formulaciones 3 y 4 son formulaciones de referencia para la insulina glargina. Los valores de esas formulaciones se indican como marcos estrechos. Todas las formulaciones que se identificaron con respecto a las impurezas de AVE0010 como las mejores formulaciones (marcos anchos, más particularmente las formulaciones 25, 26, 28 y 30) son, con respecto a las impurezas de la insulina glargina, mejores que las formulaciones de referencia de la insulina glargina (aproximadamente de 1,5 al 2,4% a 40°C).

Por lo tanto, puede deducirse de este experimento que la metionina engendra una estabilidad de almacenamiento aumentada de una composición que comprende una insulina (por ejemplo, Lantus) y un agonista de GLP-1 (por ejemplo AVE0010). La adición de metionina engendra integridad química de esta composición.

8. Conclusiones

Los datos descritos en este documento conducen a las siguientes conclusiones:

- La metionina conduce a una estabilidad química aumentada y no tiene efectos negativos sobre la estabilidad física de las formulaciones de una combinación de un agonista de GLP-1, más particularmente AVE0010, y una insulina, más particularmente Lantus. Por lo tanto, la metionina es ventajosa como un constituyente de estas composiciones.

- El acetato puede conducir a la inestabilidad física. Esta inestabilidad es mayor con el aumento de la concentración de acetato. Por lo tanto, las formulaciones de una combinación de un agonista de GLP-1, más particularmente AVE0010 y una insulina, más particularmente Lantus, sin acetato son ventajosas en comparación con las composiciones correspondientes con acetato.

5
- El polisorbato 20 no tiene influencia negativa sobre la estabilidad física y química de las formulaciones de una combinación de un agonista de GLP-1, más particularmente AVE0010, y una insulina, más particularmente Lantus.

10
- Combinando acetato en concentraciones más bajas (acetato 1/2) con polisorbato 20, los efectos negativos del acetato pueden compensarse parcialmente. En composiciones sin acetato, la adición de polisorbato 20 no conduce a ninguna ventaja. Por lo tanto, las formulaciones de una combinación de un agonista de GLP-1, más particularmente AVE0010, y una insulina, más particularmente Lantus, deben prepararse sin polisorbato 20.

15
- Lisina (a concentraciones normales y más altas), cloruro de benzalconio, polisorbato 80 y poloxamer 188 ya mostraban inestabilidad química al comienzo de los estudios (t0). Para la lisina, esto también es cierto para los resultados del ensayo de THT.

Figura 1: Productos de oxidación después de 1 mes de almacenamiento

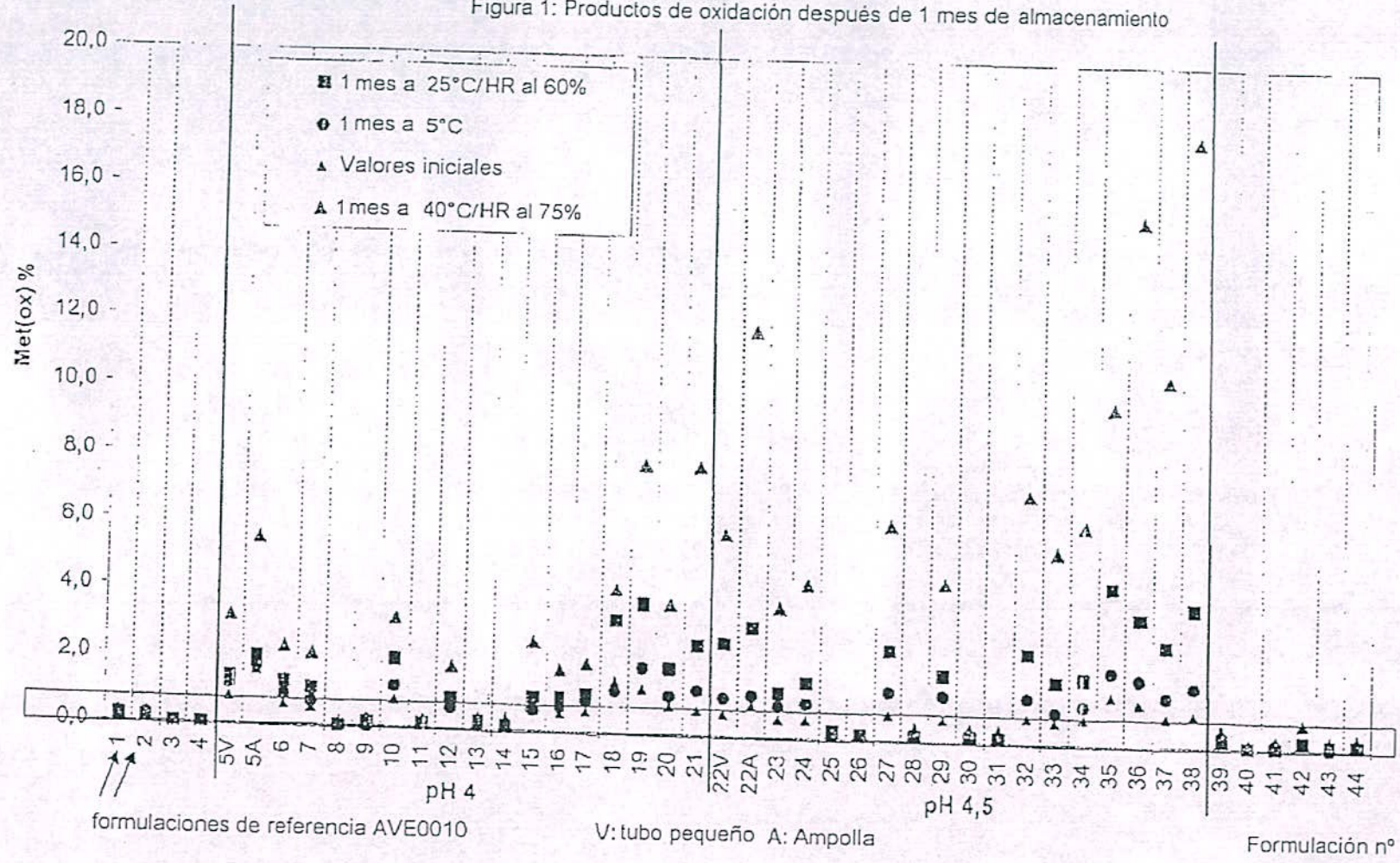
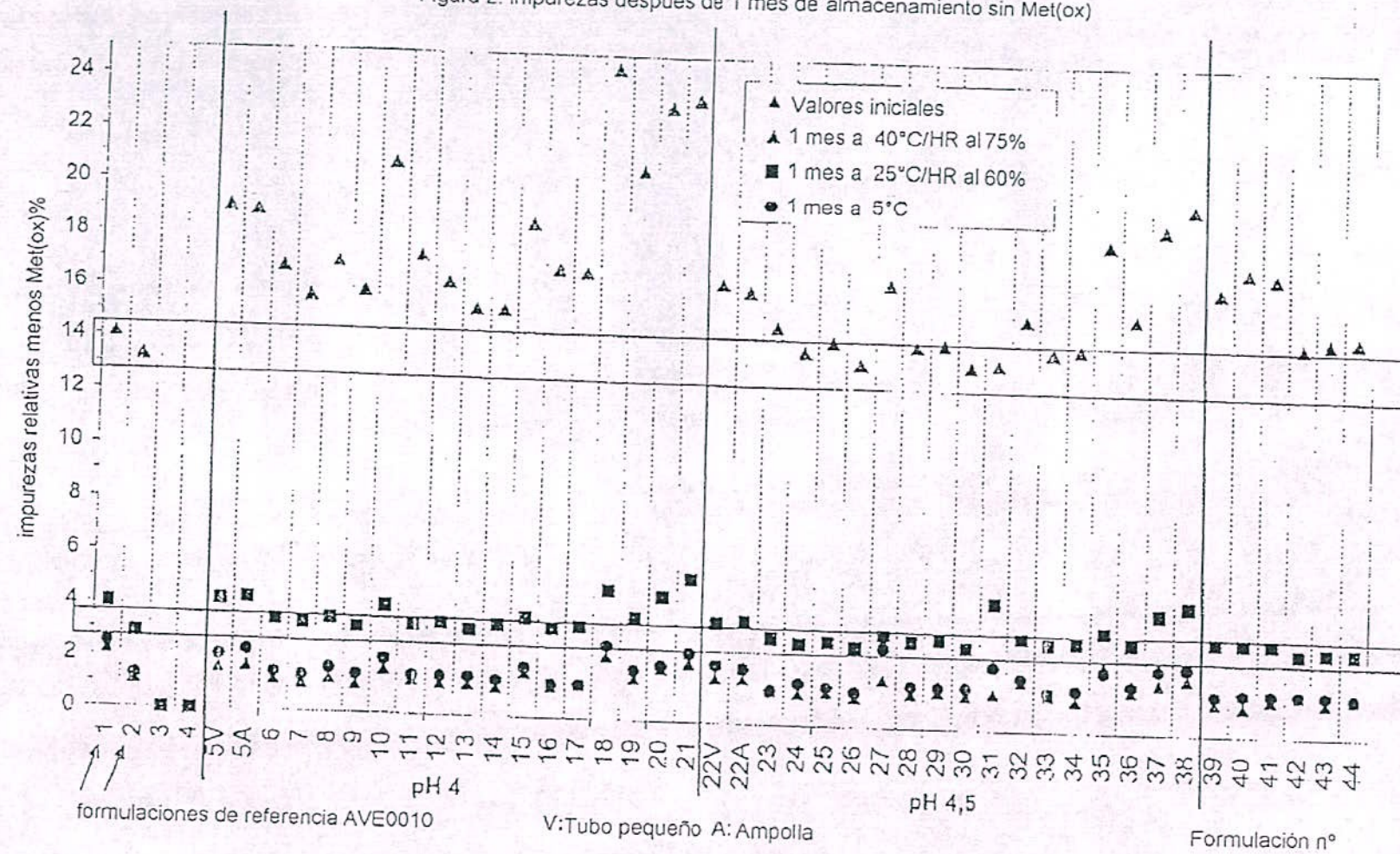


Figura 2: Impurezas después de 1 mes de almacenamiento sin Met(ox)



21

Figura 3: Impurezas de insulina glargina después de 1 mes de almacenamiento

