

Prezenta invenție este o compoziție farmaceutică pentru utilizare în tratamentul diabetului pentru a contracara variațiile postprandiale ale glucozei din sânge și pentru tratamentul acut al hiperglicemiei. Compoziția, care cuprinde o insulină, citrat, treprostinil, zinc, un conservant și unul sau mai mulți agenți suplimentari pentru stabilizare selectați dintre compuși care conțin magneziu și clorură de sodiu, are o absorbție mai rapidă a insulinei din situsurile de injecție decât compozițiile de insulină existente comercial și este stabilă pentru utilizare comercială. Compoziția este utilă pentru asigurarea activității insulinei în timpul mesei, pentru utilizare în perfuzia subcutanată continuă a insulinei (CSII) sau ca un tratament acut pentru hiperglicemie când insulina este necesară.

Profilul de acțiune în timp al insulinei este important pentru controlarea nivelurilor de glucoză postprandială în sânge. La indivizii sănătoși, pancreasul secretă un vârf de insulină ca răspuns la alimentele absorbite, care conduce la creșterea nivelurilor de insulină plasmatică în câteva minute. La indivizii cu diabet de tip 1 și la anumiți indivizi cu diabet de tip 2, insulina trebuie să fie administrată; totuși, insulina administrată intră încet în sânge din spațiul subcutanat. Eliberarea întârziată a insulinei și debutul acțiunii care este prea lent la începutul unei mese conduce la hiperglicemie în timpul, sau imediat după masă. O durată prelungită de acțiune din spațiul subcutanat conduce la insulină excesivă între mese care poate cauza hipoglicemie postprandială.

Au existat eforturi anterioare pentru a accelera acțiunea în timp a 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 insulina umană care slăbesc interfața dimer-dimer și alterează stabilitatea hexamerică sub condiții subcutanate. Insulina glulizină include de asemenea modificări în secvențele catenelor de aminoacizi din insulina umană; totuși, formulării sale comerciale îi lipsește zincul și nu formează hexameri stabilizatori. Un alt analog de insulină declarat că acționează rapid, dar care este încă în dezvoltare, Fluorolog, include un singur atom de fluor atașat la reziduul Phe la poziție 24 a catenei B de insulină.

Analogii de insulină care acționează rapid, insulina lispro, aspart și glulizină au devenit disponibili în anii 1990 și la începutul anilor 2000. Chiar cu așa numiții analogi de insulină care acționează rapid, totuși, nivelul maxim al insulinei plasmatice nu este atins până la 50-90 minute după o injecție subcutanată. Aceasta este mai încet decât eliberarea insulinei endogene dintr-un pancreas care funcționează normal și nu se potrivește întotdeauna cu profilele de absorbție ale glucozei.

O altă cale pentru a obține acțiunea 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, U.S. 8.324.157 declară că un debut mai rapid de acțiune comparativ cu terapiile cu insulină existente poate fi obținut prin adăugarea unui compus nicotinic, cum ar fi nicotinamidă, și aminoacidul arginină, și opțional acid glutamic. US2013/0231281 divulgă compoziții cuprinzând o insulină și o oligozaharidă, fie singure sau fie în combinație cu un compus polianionic și declară că astfel de compoziții acționează rapid. US2014/0113856 divulgă compoziții conținând insulină în combinație cu un chelator de zinc, cum ar fi acidul etilendiaminotetraacetic (EDTA), un alt excipient descris în publicație ca agent de „dizolvare/stabilizare”, cum ar fi acidul citric sau citratul de sodiu, și un compus care conține magneziu, și declară că astfel de compoziții au rate de absorbție mai rapide și scăderi față de concentrațiile de vârf. US2015/0065423 descrie compoziții care cuprind o peptidă și un agent vasodilatator, divulgă liste de agenți vasodilatatori din trei categorii diferite, și furnizează date despre compozițiile care conțin insulină lispro și nitroglicerină și declară că astfel de formulări acționează rapid.

WO2015/120457 divulgă formulări care conțin insulină în combinație cu un chelator de zinc cum ar fi acidul etilendiamină-tetraacetic (EDTA), un agent de dizolvare/stabilizare cum ar fi acidul citric, o sare de magneziu, un compus de zinc și, opțional, excipienți suplimentari.

În ciuda acestora și altor eforturi, rămâne o necesitate pentru compoziții cu insulină care să aibă o absorbție mai rapidă a insulinei în sânge de la locul injecției, un debut și/sau decalare mai rapide de acțiune decât produsele cu insulină existente, și stabilitate chimică și fizică în timpul

condițiilor de depozitare și utilizare. Prezenta invenție caută să furnizeze compoziții care îndeplinesc una sau mai multe dintre aceste necesități.

S-a descoperit în mod surprinzător că compozițiile care conțin anumite concentrații atât de citrat cât și de treprostinil au un profil de acțiune în timp mai rapid decât compozițiile cu insulină existente disponibile comercial, și că stabilitatea chimică și fizică a compozițiilor care conțin acele concentrații atât de citrat cât și de treprostinil poate fi menținută, fără a elimina îmbunătățirile acțiunii în timp, prin includerea în compoziții a zincului și a unuia sau mai multor agenți suplimentari pentru stabilizare cum ar fi un surfactant, clorură de magneziu sau clorură de sodiu.

Corespunzător, prezenta invenție furnizează compoziții farmaceutice cuprinzând: o insulină; citrat, într-o concentrație de la 5 până la 25 mM; treprostinil, într-o concentrație de la 0,04 până la 20 $\mu\text{g/mL}$; zinc, într-o concentrație suficientă pentru a furniza cel puțin 2 ioni de zinc la șase molecule de insulină; un conservant; și unul sau mai mulți agenți suplimentari pentru stabilizare selectați dintre compuși care conțin magneziu și clorură de sodiu; și având un pH de 7,0 până la 7,8 la temperatura camerei.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde insulină lispro, într-o concentrație de la aproximativ 100 până la aproximativ 200 U/mL; citrat, într-o concentrație de la aproximativ 15 până la aproximativ 25 mM; treprostinil, într-o concentrație de la aproximativ 0,5 până la aproximativ 2 $\mu\text{g/mL}$; zinc, într-o concentrație de la aproximativ 0,2 până la aproximativ 1 mM; m-cresol, într-o concentrație de la aproximativ 2,5 până la aproximativ 3,8 mg/mL; poloxamer 188, într-o concentrație de la aproximativ 0,03 până la aproximativ 0,12 m/v; clorură de magneziu, într-o concentrație conducând la un raport molar dintre clorura de magneziu și citrat de aproximativ 1:3; glicerol, într-o concentrație de la aproximativ 1 până la aproximativ 2 mg/mL; și are un pH de la aproximativ 7,0 până la aproximativ 7,8 la temperatura camerei.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde: insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 100 U/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; treprostinil, într-o concentrație de aproximativ 1 $\mu\text{g/mL}$; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,6 mM; poloxamer 188, într-o concentrație de aproximativ 0,09% m/v; clorură de magneziu, într-o concentrație de aproximativ 5 mM; m-cresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL; glicerol, într-o concentrație de aproximativ 1,61 mg/mL; și are un pH de aproximativ 7,4.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde: insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 200 U/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; treprostinil, într-o concentrație de aproximativ 1 $\mu\text{g/mL}$; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,8 mM; poloxamer 188, într-o concentrație de aproximativ 0,06 până la 0,12% m/v; clorură de magneziu, într-o concentrație de aproximativ 5 mM; m-cresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL; glicerol, într-o concentrație de aproximativ 1,61 mg/mL; și are un pH de aproximativ 7,4.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde insulină lispro, într-o concentrație de la aproximativ 100 până la aproximativ 200 U/mL; citrat, într-o concentrație de la aproximativ 15 până la aproximativ 25 mM; treprostinil, într-o concentrație de la aproximativ 0,5 până la aproximativ 2 $\mu\text{g/mL}$; și zinc, într-o concentrație de la aproximativ 0,2 până la aproximativ 2 mM

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde insulină lispro, într-o concentrație de la aproximativ 100 până la aproximativ 200 U/mL; citrat, într-o concentrație de la aproximativ 15 până la aproximativ 25 mM; treprostinil, într-o concentrație de la aproximativ 0,5 până la aproximativ 2 $\mu\text{g/mL}$; zinc, într-o concentrație de la aproximativ 0,2 până la aproximativ 2 mM; și magneziu, într-o concentrație conducând la un raport molar dintre magneziu și citrat de aproximativ 1:1 până la aproximativ 1:5.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde: insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 100 U/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; treprostinil, într-o concentrație de aproximativ 1 $\mu\text{g/mL}$; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,6 mM; și magneziu, într-o concentrație de aproximativ 5 mM.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde: insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 100 U/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; treprostinil, într-o concentrație

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde: insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 200 U/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; treprostinil, într-o concentrație de aproximativ 1 µg/mL; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,8 mM; magneziu într-o concentrație de aproximativ 5 până la aproximativ 10 mM; glicerol într-o concentrație de aproximativ 12 mg/mL; și o concentrație totală de clorură de aproximativ 10 până la aproximativ 50 mM.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde: insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 200 U/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; treprostinil, într-o concentrație de aproximativ 1 µg/mL; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,7 până la aproximativ 1,7 mM; și m-cresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde: insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 200 U/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; treprostinil, într-o concentrație de aproximativ 1 µg/mL; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,8 mM; magneziu într-o concentrație de aproximativ 5 până la aproximativ 10 mM; și m-cresol într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde: insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 200 U/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; treprostinil, într-o concentrație de aproximativ 1 µg/mL; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,8 mM; magneziu într-o concentrație de aproximativ 5 până la aproximativ 10 mM; o concentrație totală de clorură de aproximativ 10 până la aproximativ 50 mM; și m-cresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde: insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 200 U/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; treprostinil, într-o concentrație de aproximativ 1 µg/mL; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,8 mM; magneziu într-o concentrație de aproximativ 5 până la aproximativ 10 mM; glicerol într-o concentrație de aproximativ 12 mg/mL; și m-cresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde: insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 200 U/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; treprostinil, într-o concentrație de aproximativ 1 µg/mL; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,8 mM; magneziu într-o concentrație de aproximativ 5 până la aproximativ 10 mM; glicerol într-o concentrație de aproximativ 12 mg/mL; și o concentrație totală de clorură de aproximativ 10 până la aproximativ 50 mM; și m-cresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică cuprinde: insulină lispro, într-o concentrație de aproximativ 200 U/mL; citrat, într-o concentrație de aproximativ 15 mM; treprostinil, într-o concentrație de aproximativ 1 µg/mL; zinc, într-o concentrație de aproximativ 0,8 mM; magneziu într-o concentrație de aproximativ 5 mM; glicerol într-o concentrație de aproximativ 12 mg/mL; și o concentrație totală de clorură de aproximativ 10 până la aproximativ 50 mM; și m-cresol, într-o concentrație de aproximativ 3,15 mg/mL.

În plus, prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică pentru utilizare în terapie. Mai special, prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică pentru utilizare în tratamentul diabetului. De asemenea divulgată, dar nerevendicată, este utilizarea unei compoziții farmaceutice în fabricarea unui medicament pentru tratamentul diabetului.

În plus, prezenta invenție furnizează un articol de fabricare cuprinzând o compoziție farmaceutică, în care articolul de fabricare este o fiolă multifuncțională, un cartuș, un injector stilou reutilizabil, un dispozitiv stilou de unică folosință, un dispozitiv pompă pentru terapia cu perfuzie de insulină subcutanată continuă sau un sistem de închidere al recipientului pentru utilizare într-un dispozitiv pompă pentru terapia cu perfuzie de insulină subcutanată continuă.

Când s-a utilizat aici, termenul „compoziție” s-a referit la o combinație de insulină și celelalte ingrediente sau excipienți în care insulina și alte ingrediente sau excipienți sunt într-o singură formulare combinată, de obicei o formulare apoasă.

Când s-a utilizat aici, „insulina” a însemnat insulină umană sau o variantă structurală care acționează rapid, muteina, sau un analog de insulină umană care are activitate funcțională, dar cu

debut mai rapid de acțiune decât insulina umană. Analogi particulari care acționează rapid de insulină umană 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 naturale prolină-lizină pe catena B la pozițiile 28 și 29 (28^B -L-lizină- 29^B -L-prolină insulină umană). 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 de stabilizare, un modulator de tonicitate (glicerol), un agent de tamponare (fosfat de sodiu dibazic), un stabilizator (oxid de zinc) și ajustarea 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 aproximativ 5808. O unitate de insulină lispro este echivalentă cu până la 0,0347 mg insulină lispro.

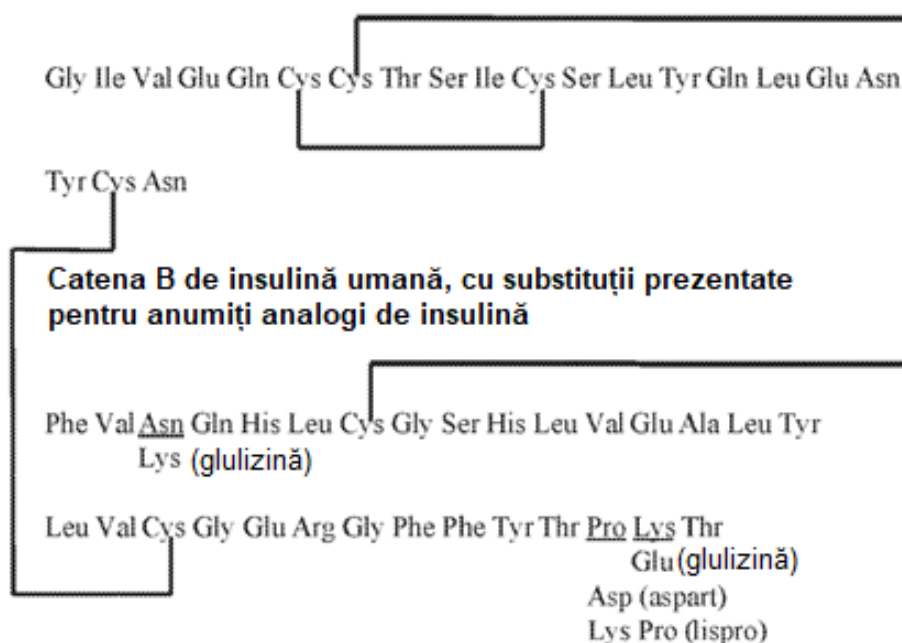
Insulina aspart (CAS nr. L16094-23-6), substanța medicamentoasă din NOVOLOG[®], este un alt analog de insulină cu debut rapid. Structura sa constă din catena A de insulină umană (SEQ ID NO: 1) și o catenă B în care Pro la B28 este înlocuit cu Asp (insulină umană Pro-B28-Asp), cum s-a reflectat în următoarea 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, corespunzând 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 NO: 1) și o catenă B modificată (Asn-B3-Lys, Lys-B29-Glu) comparativ cu insulina umană, cum s-a reflectat 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 aproximativ până la 0,0349 mg de insulină glulizină.

Următoarea schemă ilustrează secvențele de aminoacizi și legături disulfură ale insulinei umane și ale analogilor de insulină care acționează rapid care sunt în prezent aprobate pentru utilizare în tratarea variațiilor glucozei din sânge în timpul mesei:

Catena A de insulină umană



În anumite realizări, compozițiile prezentei invenții au concentrații de insulină de la aproximativ 40 până la aproximativ 500 U/mL. În anumite realizări, compozițiile prezentei invenții au concentrații de insulină de la aproximativ 100 până la aproximativ 500 U/mL. În anumite realizări, compozițiile prezentei invenții au concentrații de insulină de la aproximativ 100 până la aproximativ 300 U/mL. În anumite realizări, compozițiile prezentei invenții au concentrații de insulină de la aproximativ 100 până la aproximativ 200 U/mL. În anumite realizări preferate, compozițiile cuprind aproximativ 100 U/mL sau aproximativ 200 U/mL.

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

Îmbunătățiri în profilul de acțiune în timp al insulinei demonstrate în prezenta invenție sunt obținute prin utilizarea anumitor concentrații specifice de citrat și treprostinil.

Termenul „citrat” se referă la orice compus care conține ionul citrat, care are denumirea chimică 2-hidroxipropan-1,2,3-tricarboxilat, formula moleculară $C_6H_5O_7^{-3}$, și masă moleculară de 189. Ionul citrat este pe larg distribuit 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 Administrarea Alimentelor și Medicamentelor în 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
Monohidrat de citrat de potasiu	$C_6H_5O_7K_3$ (324,41)	6100-05-6	184.1625

Diferiți compuși care conțin citrați sunt de asemenea incluși în produsele medicamentoase parenterale în conformitate cu baza de date de Ingrediente Inactive a Administrării 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, dihidrat citrat de trisodiu. Compusul citrat particular utilizat în compozițiile prezentei invenții poate fi forma acidă sau diferite forme de sare, în special săruri alcaline (de exemplu, de sodiu și potasiu) și/sau mono sau dihidrați ai acestora. Dintre aceștia, citratul de sodiu este preferat.

S-a descoperit că concentrația de citrat care poate fi utilizată în compoziții care și acționează rapid și sunt stabile, variază de la aproximativ 5 până la aproximativ 25 mM. Anumite compoziții au concentrații de citrat de aproximativ 15, aproximativ 20 sau aproximativ 25 mM. S-a descoperit că concentrații mai ridicate de citrat pot conduce la îmbunătățiri mai mari a acțiunii în timp, dar pot conduce de asemenea la pasivități mai mari din punct de vedere al stabilității. Astfel, compozițiile cu concentrații de citrat la capătul superior al intervalului necesită agenți suplimentari pentru stabilizare pentru a avea stabilitate chimică și fizică pentru depozitarea și utilizarea pe termen lung, cum s-a descris mai detaliat mai jos.

Treprostinil este un analog sintetic de prostaciclina, și are denumirea chimică acid (1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-Hexahidro-2-hidroxi-1-[(3S)-3-hidroxiocetil]-1H-benz[f]inden-5-il]oxi]acetic (CAS nr. 81846-19-7), masa moleculară de 390,52 și formula moleculară $C_{23}H_{34}O_5$. Treprostinil este ingredientul activ din produsele medicamentoase comerciale vândute sub numele comerciale Remodulin®, Tyvaso® și Orenitran™, care sunt indicate pentru tratamentul hipertensiunii arteriale pulmonare pentru a diminua simptomele asociate cu efortul fizic (Remodulin®) și pentru a îmbunătăți abilitatea de efort fizic (Tyvaso® și Orenitran™). Tyvaso® și Orenitran™ sunt, respectiv, forme de dozare prin inhalare și orale, și Remodulin® este indicat pentru utilizare subcutanată sau intravenoasă ca perfuzie continuă. Remodulin® este în prezent disponibil în concentrații de dozaj de 1, 2,5, 5 și 10 mg/mL, și fiecare mL conține 3 mg m-cresol, 6,3 mg citrat de sodiu, fie 5,3 mg (concentrații de 1, 2,5 și 5 mg/mL) sau fie 4,0 mg (concentrație de 10 mg/mL) clorură de sodiu, și apă pentru injecție.

La fel ca citratul, treprostinil este inclus pentru a contribui la îmbunătățirea profilului de acțiune în timp al insulinei. Spre deosebire de citrat, totuși, o creștere în concentrația de treprostinil nu a fost găsită ca având un impact negativ asupra stabilității. Din cauza efectelor vasodilatatoare puternice ale treprostinilului, totuși, concentrația de treprostinil în compozițiile prezentei invenții trebuie să nu fie atât de ridicată încât să cauzeze efecte sistemice nedorite.

Mai mult, cantitatea de insulină, și astfel volumul compoziției, administrată unui subiect dat la un moment dat de timp este titrată pe baza nivelurilor de glucoză în sângele subiectului și/sau a aportului anticipat de carbohidrați. Ca rezultat, cantitatea totală de treprostinil furnizată va varia de la injecție la injecție. De exemplu, în unele circumstanțe un diabetic poate dori să aibă doar 1 unitate de insulină administrată, care ar fi un volum total de injecție de doar 10 μ L dintr-o compoziție de 100 U/mL de insulină lispro. Pe de altă parte, dispozitivele de injectare disponibile în prezent asigură doze de până la 80 U într-o singură injecție al cărei volum total al unei astfel de doze dintr-o compoziție de 100 U/mL ar fi cu peste un ordin de mărime mai ridicat decât cel al 1 doze unitare, și unii pacienți cu diabet de tip 2 pot necesita o doză de mai mult de 100 unități de insulină, necesitând uzual mai mult de o injecție.

Astfel, în compozițiile în care insulina și treprostinilul sunt ambele prezente într-o singură formulare combinată, concentrația de treprostinil trebuie să fie suficientă pentru a contribui la îmbunătățirea acțiunii în timp, chiar când este necesară o doză relativ mică de insulină, dar care nu trebuie să fie atât de ridicată pentru a cauza efecte sistemice nedorite ca atunci când este necesară o doză relativ mare de insulină. Compoziția cuprinde treprostinil într-o concentrație de la 0,04 până la 20 μ g/mL. În anumite realizări, compoziția cuprinde treprostinil într-o concentrație de la aproximativ 0,04 până la aproximativ 10 μ g/mL. O concentrație preferată de treprostinil în compozițiile cu insulină care au concentrații de insulină care variază de la aproximativ 100 până la aproximativ 200 U/mL, este de la aproximativ 0,5 până la aproximativ 2 μ g/mL. În anumite realizări, concentrația de treprostinil este de aproximativ 1 μ g/mL.

Cum s-a descris mai sus, în timp ce adăugarea de citrat conduce la îmbunătățiri ale acțiunii în timp, ea poate contribui de asemenea la pasivități mai mari din punct de vedere al stabilității. Astfel, compozițiile prezentei invenții necesită unul sau mai mulți agenți pentru stabilizare peste și dincolo de cei incluși în formulările comerciale disponibile în prezent de analogi de insulină care acționează rapid. Unul sau mai mulți agenți suplimentari pentru stabilizare sunt selectați dintre compuși care conțin magneziu și clorură de sodiu.

Cu privire la zinc, compozițiile prezentei invenții trebuie, la un minim, să includă zinc într-o concentrație care să furnizeze cel puțin suficienți ioni de zinc pentru moleculele de insulină pentru a forma hexameri stabilizanți, care au 2 situsuri de legare la zinc specifice, de afinitate ridicată. *Vezi, de exemplu*, BioMetals 18:295-303 (2005), disponibilă la <http://rd.springer.com/articol/10,1007/s10534-005-3685-y>. Ionii de zinc încorporați în astfel de hexameri de insulină sunt uneori referiți ca zinc „legat”. Astfel, compozițiile prezentei invenții trebuie să includă suficient zinc pentru a furniza cel puțin 2 ioni de zinc pe hexamer de insulină. În anumite realizări ale prezentei invenții care au, de exemplu, concentrații de insulină de aproximativ 100 U/mL, aproximativ 200 U/mL, aproximativ 300 U/mL sau aproximativ 500 U/mL, concentrația de zinc minimă necesară pentru a furniza 2 ioni de zinc pe hexamer de insulină ar fi de aproximativ 0,2 mM, de aproximativ 0,4 mM, de aproximativ 0,6 mM sau respectiv de aproximativ 1 mM.

Includerea de zinc în exces - adică, mai mult zinc decât ar fi legat în cele 2 situsuri de legare ale zincului specifice, de afinitate ridicată în hexamerii de insulină descriși mai sus – poate fi totuși utilizată pentru a stabiliza suplimentar compoziția. Un astfel de zinc este referit uneori ca zinc „liber” sau „nelegat”. Formulările care conțin zinc disponibile în prezent includ între aproximativ 2 și 4 ioni de zinc pe hexamer de insulină. De exemplu, formulările de 100 U/mL de insulină lispro (HUMALOG®) și insulină aspart (NOVOLOG®) au aproximativ 3 ioni de zinc pe șase molecule de insulină, ceea ce corespunde cu o concentrație de aproximativ 0,3 mM. Formularea de 200 U/mL disponibilă în prezent de HUMALOG® are aproximativ 3,5 ioni de zinc pe șase molecule de insulină, ceea ce corespunde 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 și Company (HUMULIN® R) conține aproximativ 2,3 ioni de zinc pe șase molecule de insulină, ceea ce corespunde cu o concentrație de zinc de aproximativ 0,23 mM.

În anumite compoziții ale prezentei invenții, s-a descoperit că includerea zincului liber sau nelegat în exces - adică, zinc care nu este legat la cele 2 situsuri de legare la zinc specifice, de afinitate ridicată din hexamerii de insulină descriși mai sus – are un efect de stabilizare. S-a descoperit că, compozițiile care au aproximativ 100 U/mL de insulină lispro și concentrații de zinc de până la aproximativ 1 mM - care ar constitui aproximativ 0,2 mM zinc legat și aproximativ 0,8 mM zinc nelegat sau zinc liber, și acționează rapid și sunt stabile. Includerea de prea mult zinc liber sau nelegat, poate totuși atenua îmbunătățirile acțiunii în timp. De exemplu, s-a descoperit că, 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, nu a îmbunătățit acțiunea în timp văzută la compoziții cu concentrații mai scăzute de zinc. În anumite realizări, concentrația de zinc variază de la aproximativ 0,2 până la aproximativ 2 mM, de la aproximativ 0,3 până la aproximativ 1,7 mM, de la aproximativ 0,7 până la aproximativ 1,7 mM, de la aproximativ 0,4 până la aproximativ 1 mM, de la aproximativ 0,4 până la aproximativ 0,8 mM sau de la aproximativ 0,6 până la aproximativ 0,9 mM. În anumite realizări compoziția de zinc este de aproximativ 0,3, de aproximativ 0,4, de aproximativ 0,5, de aproximativ 0,6, de aproximativ 0,7, de aproximativ 0,8, de aproximativ 0,9, de aproximativ 1, de aproximativ 1,25 sau de aproximativ 1,7 mM. În anumite realizări care cuprind aproximativ 100 U/mL insulină lispro, concentrația de zinc este de aproximativ 0,6 mM. În anumite realizări care cuprind aproximativ 200 U/mL insulină lispro, concentrația de zinc este de aproximativ 0,8 mM.

Compozițiile pot cuprinde un surfactant. Exemplele de surfactanți divulgați pentru utilizare în compozițiile farmaceutice parenterale includ polisorbați, cum ar fi polisorbit 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 marca cu numele BRIJ®), acizi grași alcoxilați, cum ar fi MYRJ™, polipropilen glicoli, copolimeri bloc cum ar fi poloxamer 188 (număr CAS 9003-11-6, vândut sub marca cu numele PLURONIC® F-68) și poloxamer 407 (PLURONIC® F127), esterii alchil de sorbitan (de exemplu, SPAN®), ulei de ricin polietoxilat (de exemplu, KOLLIPHOR®, CREMOFOR®) și trehaloză și derivați ai acestora, cum ar fi esterul laurat de trehaloză. În anumite realizări, surfactantul este selectat din grupul constând din eter lauril de polioxietilen (23), poloxamer 188 și ester laurat de trehaloză. Cel mai preferat este poloxamerul 188. În anumite realizări, concentrația de surfactant variază de la aproximativ 0,003 până la aproximativ 2% m/v, de la aproximativ 0,003 până la aproximativ 0,3% m/v sau de la aproximativ 0,01 până la aproximativ 0,2% m/v. În realizările preferate în care surfactantul este poloxamer 188, concentrația de poloxamer 188

variază de la aproximativ 0,06 până la aproximativ 0,12 m/v. În anumite realizări, concentrația de poloxamer 188 este de aproximativ 0,06% m/v. În alte realizări, concentrația de poloxamer 188 este de aproximativ 0,09% m/v. În alte realizări, concentrația de poloxamer 188 este de aproximativ 0,12% m/v.

Un alt agent de stabilizare care poate fi utilizat în compozițiile prezentei invenții este magneziul, care poate fi furnizat de exemplu prin adăugarea unui compus care conține magneziu cum ar fi clorură de magneziu, care are formula moleculară MgCl_2 și masa moleculară de 95,211. În timp ce MgCl_2 poate avea efecte de stabilizare în anumite compoziții, concentrațiile ridicate de ioni clorură (Cl^-) pot conduce la cristalizarea insulinei la temperaturi scăzute, și concentrațiile de magneziu (Mg^{+2}) care depășesc concentrația de citrat vor conduce la precipitarea insulinei. Astfel, cantitatea maximă de clorură de magneziu care poate fi inclusă este limitată de cantitatea de citrat care este inclusă. În anumite realizări, când MgCl_2 este utilizată pentru a furniza magneziu ca agent de stabilizare în compozițiile prezentei invenții, raportul molar dintre clorura de magneziu și citrat variază de la aproximativ 1:2 până la aproximativ 1:10. În anumite realizări raportul de magneziu variază de la aproximativ 1:1 până la aproximativ 1:5. Preferabil raportul molar dintre clorura de magneziu și citrat variază de la aproximativ 1:3 până la aproximativ 1:5. 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 mM, de la aproximativ 5 până la aproximativ 10 mM sau de la aproximativ 10 până la aproximativ 15 mM. În anumite realizări, concentrația de magneziu este de aproximativ 2,5, de aproximativ 5, de aproximativ 7,5 sau de aproximativ 10 mM.

Un alt agent de stabilizare care poate fi utilizat în compozițiile prezentei invenții este un compus care conține clorură, cum ar fi clorură de sodiu, care are formula moleculară NaCl și masa moleculară de 58,44. Clorura de sodiu este utilizată în unele formulări disponibile în prezent de analogi de insulină care acționează rapid, cum ar fi APTDRA® (insulină glulizină), care cuprinde 5 mg/mL clorură de sodiu și NOVOLQG® (insulină aspart), care cuprinde 0,58 mg/mL clorură de sodiu. În anumite realizări din prezenta invenție în care este utilizată clorura de sodiu ca agent de stabilizare, concentrația de clorură de sodiu variază de la aproximativ 1 până la aproximativ 50 mM. În anumite realizări din prezenta invenție în care este utilizată clorura de sodiu ca agent de stabilizare, concentrația de clorură de sodiu variază de la aproximativ 10 până la aproximativ 40 mM. În anumite realizări, concentrația de clorură de sodiu variază de la aproximativ 15 până la aproximativ 25 mM. În anumite realizări, concentrația de clorură de sodiu este de aproximativ 1, de aproximativ 2, de aproximativ 3, de aproximativ 4, de aproximativ 5, de aproximativ 6, de aproximativ 7, de aproximativ 8, de aproximativ 9, de aproximativ 10, de aproximativ 11, de aproximativ 12, de aproximativ 13, de aproximativ 14, de aproximativ 15, de aproximativ 16, de aproximativ 17, de aproximativ 18, de aproximativ 19 sau de aproximativ 20 mM.

Ambele MgCl_2 și NaCl conduc la adăugarea de ioni de clorură (Cl^-), și dacă conținutul total de clorură al compoziției este prea ridicat, insulina din compoziție poate cristaliza la temperaturi scăzute și poate de asemenea conduce la instabilitate la temperaturi ridicate. Astfel, dacă MgCl_2 și/sau NaCl sunt utilizate ca agenți pentru stabilizare, trebuie să fie luat în considerație conținutul total de clorură al compoziției. Determinarea cantității totale de clorură prezente în compoziție dacă sunt utilizate MgCl_2 și/sau NaCl ca agenți pentru stabilizare, trebuie de asemenea să ia în considerare faptul că ionii de clorură pot fi de asemenea adăugați la compoziție prin adăugarea de alte componente, de exemplu cu ingredientul farmaceutic activ vrac al insulinei (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 forma unei soluții preparate prin solubilizarea oxidului de zinc (ZnO) cu HCl . Astfel, trebuie să fie luată în considerare concentrația totală de clorură din toate sursele dacă MgCl_2 și/sau NaCl trebuie să fie utilizate ca agenți pentru stabilizare. În termeni de concentrații, cristalizarea insulinei la temperatură scăzută a fost observată în compoziții conținând aproximativ 100 mM NaCl , dar astfel de probleme nu au fost observate la compozițiile conținând până la aproximativ 30 mM total clorură. În plus, s-a descoperit de asemenea că, problemele asociate cu cristalizarea la temperatură scăzută cu concentrații de clorură relativ ridicate, sunt sensibile la concentrațiile de citrat. Astfel, compozițiile prezentei invenții având concentrații de citrat la capătul inferior al intervalului furnizat aici

pot fi mai tolerante la concentrații de clorură relativ mai ridicate decât compozițiile care au concentrații de citrat la capătul superior al intervalului furnizat aici. De exemplu, s-a observat că adăugarea de concentrații de clorură de sodiu de până la 50-75 mM la formulările care conțin 25 mM citrat, conduce la probleme de cristalizare la temperatură scăzută, dar astfel de probleme nu au fost observate consistent nici când 50 mM clorură de sodiu a fost adăugată la o formulare de citrat de 15 mM sau nici când 25 mM clorură de sodiu a fost adăugată la o formulare de citrat de 25 mM. Clorura totală adăugată prin utilizarea de NaCl și/sau $MgCl_2$ ca agenți pentru stabilizare nu ar trebui să fie mai multă de aproximativ 50 mM. În anumite realizări din prezenta invenție, concentrația totală de clorură, din toate sursele, variază de la aproximativ 10 până la aproximativ 50 mM. În anumite realizări, concentrația totală de clorură variază de la aproximativ 13 până la aproximativ 45 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 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 15 mM, de aproximativ 16 mM, de aproximativ 17 mM, de aproximativ 18 mM, de aproximativ 19 mM, de aproximativ 20 mM, de aproximativ 21 mM, de aproximativ 22 mM, de aproximativ 23 mM, de aproximativ 24 mM sau de aproximativ 25 mM.

În anumite realizări, compoziția poate include mai mult de un agent de stabilizare suplimentar pentru a asigura că compoziția menține un profil de stabilitate acceptabil comercial. Compozițiile prezentei invenții pot include zinc și magneziu în exces. Compozițiile prezentei invenții pot include zinc, un surfactant, cum ar fi poloxamer 188, și clorură de magneziu sau clorură de sodiu.

Compozițiile prezentei invenții includ unul sau mai mulți conservanți, care furnizează proprietăți antimicrobiene și pot furniza suplimentar beneficii de stabilitate. Compozițiile sunt sterile când sunt produse prima dată, totuși, când compoziția este prevăzută într-o fiolă sau cartuș cu utilizare multiplă, un compus conservant antimicrobian sau amestec al compușilor care este compatibil cu celelalte componente ale formulării este adăugat de obicei la o concentrație suficientă pentru a îndeplini cerințele de conservare anti-microbiană de reglementare și farmacopee. 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; and U.S. Pharmacopeia general chapters. USP29-NF24. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention; 2005. Antimicrobial effectiveness testing; pag. 2499-2500. Conservanții preferați sunt acizii aril și compușii fenolici, sau amestecuri ale unor astfel de compuși. Concentrațiile eficiente pot fi stabilite cu ușurință utilizând metodele referite 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, formulă moleculară C_7H_8O , masă moleculară 108,14). Compozițiile comerciale din prezent, conțin de exemplu, 3,15 mg/mL m-cresol (HUMALOG® și APIDRA®), 1,72 mg/mL m-cresol și 1,50 mg/mL fenol (NOVOLQG®), și 2,5 mg/mL m-cresol (HUMULIN® R U-500). Într-o realizare, conservantul este selectat din grupul constând din fenol și m-cresol. Preferabil conservantul este m-cresol. În anumite realizări concentrația de m-cresol este de la aproximativ 2,5 până la aproximativ 3,8 mg/mL. Preferabil concentrația de m-cresol este de aproximativ 3,15 mg/mL.

Este de dorit o potrivire aproximativă a tonicității (adică, osmolalitatea) fluidelor corporale la locul injecției cât mai strânsă posibil când se administrează compozițiile, deoarece soluțiile care nu sunt aproximativ izotonice cu fluidele corporale pot produce o senzație de usturime dureroasă când sunt administrate. Astfel, este de dorit ca compozițiile să fie aproximativ izotonice cu fluidele corporale la situs-urile de injecție. Dacă osmolalitatea unei compoziții în absența unui agent de tonicitate este suficient de mică față de osmolalitatea țesutului (pentru sânge, aproximativ 300 mOsmol/kg; cerința Farmacopeii Europene pentru osmolalitate este > 240 mOsmol/kg), atunci ar trebui în general să fie adăugat un agent de tonicitate pentru a crește tonicitatea compoziției până la aproximativ 300 mOsmol/kg. Osmolalitatea compoziției este determinată de identitățile și concentrațiile altor excipienți din compoziție, incluzând agentul (agenții) de stabilizare. Astfel, concentrațiile tuturor diferiților excipienți dintr-o compoziție trebuie să fie evaluate pentru a determina dacă un agent de tonicitate trebuie să fie adăugat și astfel de evaluări și determinări sunt făcute cu ușurință utilizând tehnici standard. Vezi Remington: The Science and Practice of Pharmacy, David B. Troy și Paul Beringer,

eds., Lippincott Williams & Wilkins, 2006, pag. 257-259; Remington: Essentials of Pharmaceutics, Linda Ed Felton, Pharmaceutical Press, 2013, pag. 277-300. Agenții tipici pentru tonicitate includ glicerol (glicerină), manitol și clorură de sodiu. Dacă adăugarea unui agent de tonicitate este necesară, glicerolul este preferat. În anumite realizări, concentrația de glicerol este de la aproximativ 1 până la aproximativ 16 mg/mL. În anumite realizări, concentrația de glicerol este de la aproximativ 1 până la aproximativ 2 mg/mL, de la aproximativ 3 până la aproximativ 4 mg/mL, de la aproximativ 5 până la aproximativ 6 mg/mL, de la aproximativ 7 până la aproximativ 8 mg/mL, de la aproximativ 9 până la aproximativ 10 mg/mL, de la aproximativ 11 până la aproximativ 12 mg/mL, de la aproximativ 13 până la aproximativ 14 mg/mL, sau de la aproximativ 15 până la aproximativ 16 mg/mL. În anumite realizări, concentrația de glicerol este de aproximativ 5, de aproximativ 12 sau de aproximativ 16 mg/mL.

Citratul, care cum s-a notat mai sus se adaugă pentru a contribui la îmbunătățirile acțiunii în timp, este cunoscut de asemenea că are proprietăți de tamponare, dar dacă se dorește, poate fi inclus un compus de tamponare suplimentar. Exemple de astfel de compuși de tamponare sunt tampoanele cu fosfat, cum ar fi fosfatul de sodiu dibazic, acetatul de sodiu și tris(hidroximetil)aminometanul, sau TRIS. Dacă este necesar un compus de tamponare suplimentar, TRIS sau tampoanele cu fosfat 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 țintă comună a pH-ului. PH-ul din prezenta invenție este de la aproximativ 7,0 până la aproximativ 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 pompă de insulină, deși căile intravenoasă, intradermală, sau intraperitoneală pot fi de asemenea utilizate.

Cum s-a notat mai sus, prezenta invenție furnizează de asemenea un articol de fabricare cuprinzând o compoziție farmaceutică. În anumite realizări, articolul de fabricare este o fiolă cu utilizări multiple. În alte realizări, articolul de fabricare este un cartuș preumplut cu utilizări multiple. În alte realizări, articolul de fabricare este un injector stilou reutilizabil. În alte realizări, articolul de fabricare este un dispozitiv stilou de unică folosință. În alte realizări, articolul de fabricare este un dispozitiv pompă pentru terapia prin perfuzie subcutanată continuă cu insulină. În alte realizări, articolul de fabricare este un sistem de închidere al recipientului pentru utilizare într-un dispozitiv pompă pentru terapia prin perfuzie subcutanată continuă cu insulină.

Prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând: o insulină; citrat, într-o concentrație de la aproximativ 5 până la aproximativ 25 mM; treprostinil, într-o concentrație de la aproximativ 0,04 până la aproximativ 20 $\mu\text{g/mL}$; zinc, într-o concentrație suficientă pentru a furniza cel puțin 2 ioni de zinc pe șase molecule de insulină; un conservant; și unul sau mai mulți agenți suplimentari pentru stabilizare selectați dintre compuși care conțin magneziu și clorură de sodiu; și având un pH de la aproximativ 7,0 până la aproximativ 7,8 la temperatura camerei.

În anumite realizări, concentrația de zinc variază de la aproximativ 0,2 până la aproximativ 2 mM. În anumite realizări, concentrația de zinc este de la aproximativ 0,2 până la aproximativ 1 mM. În anumite realizări, concentrația de zinc este de la aproximativ 0,6 până la aproximativ 0,8 mM. În anumite realizări, concentrația de zinc este de aproximativ 0,6 mM. În anumite realizări, concentrația de zinc este de aproximativ 0,7 mM. În anumite realizări, concentrația de zinc este de aproximativ 0,8 mM. În anumite realizări, concentrația de zinc este de aproximativ 0,9 mM.

În anumite realizări, compoziția cuprinde un surfactant, care este prezent într-o concentrație de la aproximativ 0,003 până la aproximativ 2% m/v. În anumite realizări, surfactantul este poloxamer 188. În anumite realizări, concentrația de poloxamer 188 este de la aproximativ 0,06 până la aproximativ 0,12% m/v. În anumite realizări, concentrația de poloxamer 188 este de aproximativ 0,06% m/v. În anumite realizări, concentrația de poloxamer 188 este aproximativ 0,09% m/v. În anumite realizări, concentrația de poloxamer 188 este aproximativ 0,12% m/v.

În anumite realizări, unul sau mai mulți agenți suplimentari pentru stabilizare cuprind clorură de magneziu, care este prezentă într-o concentrație conducând la un raport molar dintre clorura de

magneziu și citrat de la aproximativ 1:2 până la aproximativ 1:10. În anumite realizări, raportul de magneziu variază de la aproximativ 1:1 până la aproximativ 1:5. În anumite realizări, raportul molar dintre clorura de magneziu și citrat este de la aproximativ 1:3 până la aproximativ 1:5. 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 mM, de la aproximativ 5 până la aproximativ 10 mM sau de la aproximativ 10 până la aproximativ 15 mM. În anumite realizări, concentrația de magneziu este de aproximativ 2,5, de aproximativ 5, de aproximativ 7,5 sau de aproximativ 10 mM.

În anumite realizări, unul sau mai mulți agenți suplimentari pentru stabilizare cuprind clorură de sodiu, care este prezentă într-o concentrație de aproximativ 10 până la aproximativ 40 mM. În anumite realizări, concentrația de clorură de sodiu este de la aproximativ 15 până la aproximativ 25 mM. În anumite realizări, concentrația totală de clorură nu este mai mare de aproximativ 50 mM. În anumite realizări, concentrația totală de clorură variază de la aproximativ 10 până la aproximativ 50 mM. În anumite realizări, concentrația totală de clorură variază de la aproximativ 13 până la aproximativ 45 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 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 15 mM, de aproximativ 16 mM, de aproximativ 17 mM, de aproximativ 18 mM, de aproximativ 19 mM, de aproximativ 20 mM, de aproximativ 21 mM, de aproximativ 22 mM, de aproximativ 23 mM, de aproximativ 24 mM sau de aproximativ 25 mM.

În anumite realizări, concentrația de insulină este de la aproximativ 100 până la aproximativ 500 U/mL. În anumite realizări, concentrația de insulină este de la aproximativ 100 până la aproximativ 300 U/mL. În anumite realizări, concentrația de insulină este fie de aproximativ 100 U/mL sau fie de aproximativ 200 U/mL. În anumite realizări, insulina este insulină lispro.

În anumite realizări, concentrația de citrat este de la aproximativ 10 până la aproximativ 25 mM. În anumite realizări, concentrația de citrat este de aproximativ 15 mM.

Compoziția cuprinde treprostinil într-o concentrație de la aproximativ 0,04 până la aproximativ 20 µg/mL. În anumite realizări, concentrația de treprostinil este de la aproximativ 0,04 până la aproximativ 10 µg/mL. În anumite realizări, concentrația de treprostinil este de la aproximativ 0,5 până la aproximativ 2 µg/mL. În anumite realizări, concentrația de treprostinil este de aproximativ 1 µg/mL.

În anumite realizări, conservantul este m-cresol. În anumite realizări, concentrația de m-cresol este de la aproximativ 2,5 până la aproximativ 3,8 mg/mL. În anumite realizări, concentrația de m-cresol este de aproximativ 3,15 mg/mL.

În anumite realizări, compoziția cuprinde în plus un agent de tonicitate. În anumite realizări, agentul de tonicitate este glicerol. În anumite realizări, concentrația de glicerol este de la aproximativ 1 până la aproximativ 15 mg/mL. În anumite realizări, concentrația de glicerol este de la aproximativ 1 până la aproximativ 2 mg/mL.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică prevede o absorbție de insulină în sânge, un debut de acțiune și/sau o durată de acțiune care sunt cu cel puțin 20% mai rapide decât pentru compozițiile care conțin aceeași insulină dar care nu conțin citrat sau treprostinil, 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 atinge jumătate din concentrația maximă de insulină ($\frac{1}{2} T_{max}$ timpuriu); timpul pentru a atinge jumătate din concentrația maximă de insulină în timpul fazei de scădere a curbei concentrației în timp ($\frac{1}{2} T_{max}$ târziu); timp dintre $\frac{1}{2} T_{max}$ timpuriu și târziu (T_{max} difuzare); procentajul dozei totale de insulină absorbite la diferite momente pe baza ariei fracționale de sub curba concentrației de insulină (de exemplu, $AUC_{0-30min}$, $AUC_{0-60min}$, $AUC_{0-200min}$, $AUC_{0-180min}$); timpul pentru a atinge o jumătate din concentrația totală de insulină (T_{50}); timpul pentru a atinge rata maximă de perfuzie cu glucoză (GIR_{max}), timpul pentru a atinge o jumătate din rata maximă de perfuzie cu glucoză ($\frac{1}{2} GIR_{max}$ timpurie); timpul pentru a atinge o jumătate din rata maximă de perfuzie cu glucoză în timpul fazei de scădere a curbei de concentrație în timp ($\frac{1}{2} GIR_{max}$ târzie); procentajul de glucoză totală perfuzată

la diferite momente pe baza ariei fracționale de sub curba GIR (de exemplu, $GIR_{0-30min}$, $GIR_{0-60min}$, $GIR_{0-120min}$, $GIR_{0-180min}$).

În anumite realizări, compoziția farmaceutică prevede o absorbție de insulină în sânge, debut de acțiune și/sau durată de acțiune care sunt cu cel puțin 30%, cu cel puțin 40% sau cu cel puțin 50% mai rapide decât pentru compozițiile care conțin aceeași insulină dar care nu conțin citrat sau treprostinil, când s-a măsurat printr-unul sau mai mulți parametri farmacocinetici sau farmacodinamici descriși mai sus.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică prevede o absorbție de insulină în sânge, debut de acțiune și/sau durată de acțiune care sunt între aproximativ 20 până la aproximativ 50%, între aproximativ 20 până la aproximativ 30%, între aproximativ 30 până la aproximativ 40% sau între aproximativ 40 până la aproximativ 50% mai rapide decât pentru compozițiile care conțin aceeași insulină dar care nu conțin citrat sau treprostinil, când s-a măsurat prin unul sau mai mulți parametri farmacocinetici sau farmacodinamici descriși mai sus.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică nu include nici un agent chelator suplimentar, cum ar fi EDTA, nici un agent vasodilatator suplimentar, cum ar fi nitroglicerina, și/sau orice oligozaharide.

În anumite realizări, compoziția farmaceutică este stabilă pentru a permite depozitarea cel puțin 24 luni la 2-8°C și până la 28 zile la temperaturi în-utilizare de până la 30°C pentru fiole sau cartușe în injectoare stilou reutilizabile. În anumite realizări, compoziția farmaceutică este stabilă pentru a permite depozitarea cel puțin 36 luni la 2-8°C și până la 28 zile la temperaturi în-utilizare de până la 30°C pentru fiole sau cartușe în injectoare stilou reutilizabile.

În anumite realizări, compoziția este stabilă pentru a permite utilizarea într-un dispozitiv pompă pentru terapia prin perfuzie cu insulină subcutanată continuă până la 7 zile.

Invenția este mai departe ilustrată prin următoarele exemple, care nu trebuie să fie interpretate ca limitative.

EXEMPLE

Studii farmacocinetice și farmacodinamice

Insulină lispro formulată cu 0,5 µg/ml treprostinil și/sau 15 mM citrat de sodiu

Porcii miniaturali Yucatan diabetici (indus cu Alloxan), castrați, masculi (vârsta medie de 23 luni, greutate corporală medie 45 kg) cu porturi de acces vascular ajustate anterior sunt utilizați sub supravegherea personalului și veterinarilor. Animalele diabetice sunt găzduite individual și au acces la apă proaspătă în orice moment. Ele sunt hrănite cu două mese pe zi conform unei diete standard și primesc întreținere adecvată de bază și insulină prandială de două ori pe zi pentru a gestiona afecțiunea lor diabetică.

Articolele de test (compozițiile A, B și C din tabelul de mai jos) sunt formulate prin adăugarea cantităților indicate de citrat și/sau treprostinil la o fiolă de Humalog®. Cantitatea necesară de treprostinil este extrasă dintr-o fiolă de 1 mg/mL de Remodulin®. Fiecare mL de Remodulin® conține de asemenea 3 mg m-cresol, 6,3 mg citrat de sodiu și 5,3 mg clorură de sodiu, astfel încât adăugarea de treprostinil la compozițiile de test conduce de asemenea la adăugarea de cantități mici din acești excipienți, precum și la o diluție ușoară a excipienților de Humalog®. Nu se crede că astfel de cantități mici afectează totuși proprietățile compozițiilor, și astfel nu sunt reflectate în Tabelul 1 de mai jos.

Tabelul 1.

Nume	Formulare
Compoziție de referință A	100 Unități/ml insulină lispro
	0,5 µg/ml treprostinil
	1,88 mg/ml fosfat
	3,15 mg/ml m-cresol

Nume	Formulare
	16 mg/ml glicerol
	0,3 mM Zn
	pH 7,4
Compoziție de referință B	98 Unități/ml insulină lispro
	15 mM citrat de sodiu
	1,88 mg/ml fosfat
	3,15 mg/ml m-cresol
	16 mg/ml glicerol
	0,3 mM Zn
	pH 7,4
Compoziție de referință C	98 Unități/ml insulină lispro
	15 mM citrat de sodiu
	0,5 µg/ml treprostinil
	1,88 mg/ml fosfat
	3,15 mg/ml m-cresol
	16 mg/ml glicerol
	0,3 mM Zn
Humalog®	pH 7,4
	100 U/mL insulină lispro
	1,88 mg/ml fosfat
	16 mg/mL glicerol
	3,15 mg/mL meta-cresol
	0,3 mM zinc
	pH 7,4

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

În dimineața studiului, toate animalele sunt plasate în hamuri pentru a restrânge și a accesa porturile lor de acces vascular (echipate pentru recoltarea unei mostre de sânge) și verificate pentru permeabilitate. Animalele sunt plasate aleator în grupurile de tratament.

Studiul este un concept complet încrucișat cu n=20. Un animal este reținut din două dintre cele patru părți din cauza nepermeabilității portului, astfel că compozițiile A și C sunt n=19 în timp ce compoziția B și Humalog® sunt n=20.

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

Probele de sânge seriale (2,0 mL fiecare) sunt colectate de la fiecare animal la următoarele momente de timp: -30, -20 (apoi sunt alimentate imediat), 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: nu [ser]) sunt menținute la temperatura ambiantă timp de cel puțin 30 minute dar nu mai mult de 2 ore pentru a permite coagularea. Serul este apoi separat prin centrifugare și divizat în două alicote și depozitat congelat la aproximativ -70°C.

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

Datele de glucoză serică sunt reprezentate în Tabelul 2 de mai jos ca medie (mg/dL) +/-eroare standard a mediei (SEM) în afară de cazul când se specifică altfel.

Tabelul 2.

	Humalog®		Compoziție A		Compoziție B		Compoziție C	
Timp (min)	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	290,2	8,6	286,8	9,0	289,2	8,1	283,2	8,4
-20	297,6	8,5	299,2	10,2	297,6	9,0	297,5	7,5
0	311,3	8,6	311,0	10,7	312,2	9,5	309,6	7,4
5	318,1	8,9	316,8	10,0	319,0	9,6	314,9	8,1
10	318,9	8,6	315,3	11,4	305,2	11,7	295,7	10,3
15	312,3	9,2	297,6	13,5	276,6	12,8	265,1	11,6
30	297,1	9,8	251,9	18,6	220,3	16,2	205,5	17,0
45	288,3	12,0	233,1	16,7	204,5	18,5	209,8	17,1
60	244,1	14,7	187,9	17,5	178,5	18,6	159,2	20,0
75	231,5	15,3	166,6	18,2	169,0	20,4	146,3	20,4
90	204,6	15,6	145,7	18,5	157,7	21,4	133,2	21,1
105	181,9	15,9	127,0	18,1	144,7	21,4	118,7	18,9
120	153,3	16,2	111,4	17,3	128,2	21,1	111,7	18,5
150	120,2	16,8	86,4	15,8	115,7	20,0	102,9	15,9
180	101,5	16,5	76,4	14,5	106,3	18,2	97,0	13,2
240	82,8	12,2	92,3	14,2	100,7	13,3	98,6	12,3
360	90,3	14,4	130,5	18,2	111,8	17,2	126,3	17,0

Concentrațiile de insulină serică pentru analiza PK sunt măsurate utilizând RIA de insulină totală. Limitele inferioară și superioară de cuantificare pentru test sunt de 20 pM și respectiv 5000 pM. Valorile sub limita inferioară de cuantificare sunt presupuse a fi 20 pM. Analizele farmacocinetice non-compartimentale sunt efectuate utilizând Phoenix WinNonlin v6.3. Parametrii PK derivați din concentrațiile de insulină serică sunt furnizați în Tabelul 3 de mai jos.

Tabelul 3.

Compoziție		Tmax (min)	½ Max timpuriu (min)	½ Max târziu (min)	Tmax difuzare (min)	T50 (min)
Humalog®	Medie (SE)	71,3 (7,3)	29,6 (4,1)	175 (14)	145 (14)	127 (6)
A	Medie (SE)	74,2 (7,6)	24,1 (3,8)	146(12)	122 (13)	102 (5)
B	Medie (SE)	55,5 (7,8)	16,5 (4,9)	130 (12)	113 (14)	100 (6)
C	Medie (SE)	2,1 (6,6)	15,9 (3,9)	98,5 (13,4)	82,6 (13,6)	83,4 (5,7)

Acest studiu susține că compozițiile prezentei invenții au o acțiune îmbunătățită a farmacocineticilor și/sau farmacodinamicilor în timp.

Insulină lispro formulată cu 10 mM citrat și/sau 10 mg/mL treprostinil

Un studiu pe compoziții care cuprind concentrații variabile de citrat și/sau 10 µg/mL treprostinil este efectuat pe porci miniaturali Yucatan diabetici (indus cu Alloxan), castrați, masculi (vârsta medie 24 luni, greutate corporală medie 43 kg) urmând procedurile generalele descrise mai sus.

Articolele de test (compozițiile D-H din tabelul de mai jos) sunt formulate prin adăugarea cantităților indicate de citrat și/sau treprostinil la o fiolă de Humalog®. Ca și în cazul studiului descris mai sus, cantitatea necesară de treprostinil este extrasă dintr-o fiolă de 1 mg/mL de Remodulin®, astfel că adăugarea de treprostinil la compozițiile de test conduce de asemenea la adăugarea de cantități mici de m-cresol, citrat de sodiu și clorură de sodiu, precum și la diluția ușoară a excipienților de Humalog®. Nu se crede totuși că astfel de cantități mici afectează proprietățile compozițiilor, și astfel nu sunt reflectate în Tabelul 4 de mai jos.

Tabelul 4.

Nume	Compoziția formulării
Compoziție de referință D	99,7 U/ml insulină lispro
	5 mM citrat
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL meta-cresol
	16 mg/ml glicerină
	1,88 mg/ml fosfat
Compoziție de referință E	99,2 U/ml insulină lispro
	10 mM citrat
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL meta-cresol
	16 mg/ml glicerină
	1,88 mg/ml fosfat
Compoziție de referință F	99,2 U/ml insulină lispro
	10 µg/ml treprostinil
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL meta-cresol

Nume	Compoziția formulării
Compoziție de referință G	16 mg/ml glicerină
	1,88 mg/ml fosfat
	100,2 U/ml insulină lispro
	5 mM citrat
	10 µg/ml treprostinil
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL meta-cresol
	16 mg/ml glicerină
Compoziție de referință H	1,88 mg/ml fosfat
	99,6 U/ml insulină lispro
	10 mM citrat
	10 µg/ml treprostinil
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL meta-cresol
	16 mg/ml glicerină
	1,88 mg/ml fosfat
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 un concept complet încrucișat cu 19 porci în care fiecare porc este studiat pe fiecare articol de test. Câteva animale nu au participat la studiu din cauza nepermeabilității portului, prin urmare formulările D și E sunt n=18 în timp ce formulările F-H sunt n=19 și Humalog® n=17.

Datele referitoare la glucoza serică sunt reprezentate în Tabelul 5 de mai jos ca medie (mg/dL) +/-SEM) în afară de cazul când se specifică altfel.

Tabelul 5.

	Humalog®		Compoziție D		Compoziție E		Compoziție F		Compoziție G		Compoziție H	
Timp (min)	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	340,5	8,2	340,2	8,9	321,2	7,3	335,2	8,5	337,4	7,5	331,8	10,1
-20	344,4	8,0	341,3	9,2	326,2	7,8	339,8	7,7	344,6	6,7	338,6	11,0
0	362,6	7,7	353,2	10,3	339,4	9,5	357,8	7,9	354,7	7,9	349,1	11,4
5	377,6	7,9	370,6	9,8	349,5	11,9	367,9	8,0	369,1	8,5	368,2	12,4
10	376,7	8,4	360,7	9,3	329,6	12,0	361,0	11,1	361,9	9,0	345,6	13,4
15	372,4	10,1	341,7	13,2	307,6	13,7	348,1	12,3	342,6	9,1	321,6	14,6

	Humalog®		Compoziție D		Compoziție E		Compoziție F		Compoziție G		Compoziție H	
Timp (min)	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
30	339,8	17,9	292,2	17,3	256,6	18,5	304,1	14,7	299,0	12,9	276,4	20,6
45	301,5	21,8	251,1	21,0	230,9	20,9	263,1	18,0	254,6	16,0	237,3	24,2
60	272,4	25,7	224,2	21,3	207,3	20,1	230,9	21,6	230,3	18,3	208,8	26,4
75	253,0	26,7	202,3	22,6	178,2	19,3	197,2	22,8	196,9	20,3	168,5	25,2
90	220,2	28,3	186,1	23,0	164,6	20,5	173,4	23,5	173,6	21,4	153,8	26,2
105	195,6	27,6	148,2	20,0	144,3	19,6	148,6	23,1	147,6	20,9	131,8	24,2
120	184,4	27,5	133,3	19,1	129,9	18,2	130,0	22,6	124,9	20,4	115,4	23,0
150	158,2	24,8	114,1	17,7	104,6	18,5	101,4	18,6	98,8	16,8	90,1	18,3
180	134,3	22,0	102,7	16,5	86,1	15,8	90,8	17,5	92,2	14,6	76,8	15,9
240	122,4	19,7	93,7	16,4	75,2	12,4	93,5	15,0	91,1	17,5	74,4	11,7
360	118,4	17,1	104,0	15,8	90,7	15,1	113,9	13,7	113,7	14,1	105,1	11,1

Concentrațiile de insulină serică și parametrii PK pentru controlul cu Humalog® și compozițiile E, F și H 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.

Compoziție	Tmax (min)	½ Max timpuriu (min)		½ Max târziu (min)	Difuzare (min)	T50 (min)
Humalog®	Medie (SE)	69,7 (12,5)	17,8 (4,1)	155 (16)	138 (16)	113 (7)
E	Medie (SE)	53,8 (10,3)	6,46 (0,55)	151 (15)	144 (15)	104 (5)
F	Medie (SE)	54,2 (7,29)	23,1 (4,8)	110 (11)	87,1 (10,8)	89,4 (5,7)
H	Medie (SE)	9,5 (4,95)	9,85 (1,77)	109 (11)	99,6 (11,5)	90,7 (5,5)

Acest studiu susține că compozițiile prezentei invenții au acțiune îmbunătățită a farmacocineticii și/sau farmacodinamicilor în timp.

Insulină lispro formulată cu 15 mM citrat și 0,6-9,3 µg/mL treprostinil

Un studiu pe compoziții cuprinzând 15 mM citrat și/sau concentrații variabile de treprostinil este efectuat pe porci miniaturali Yucatan diabetici (indus cu Alloxan), castrați, masculi (vârstă medie 25 luni, greutate corporală medie 43 kg) urmând procedurile generalele descris mai sus.

Articolele de test (compozițiile I-M din tabelul de mai jos) sunt formulate prin adăugarea cantităților indicate de citrat și/sau treprostinil, precum și de MgCl₂ și/sau NaCl în compozițiile specificate mai jos, la o fiolă de Humalog®. Ca și în studiul descris mai sus, cantitatea necesară de treprostinil este extrasă dintr-o fiolă de 1 mg/mL de Remodulin®, astfel că adăugarea de treprostinil la compozițiile de test conduce de asemenea la adăugarea de cantități mici de m-cresol, citrat de sodiu și clorură de sodiu, precum și la diluția ușoară a excipientilor de Humalog®. Nu se crede totuși că astfel de cantități mici afectează proprietățile compozițiilor, și astfel nu sunt reflectate în Tabelul 7 de mai jos.

Tabelul 7.

Nume	Compoziția formulării
Compoziție de referință I	99,1 U/ml insulină lispro
	15 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
	15 mM NaCl
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL meta-cresol
	1,88 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	16 mg/ml glicerină,
Compoziție de referință J	99,8 U/ml insulină lispro
	9,30 µg/ml treprostinil
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL meta-cresol
	1,88 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	16 mg/ml glicerină
Compoziție K	99,6 U/ml insulină lispro
	15 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
	15 mM NaCl
	0,60 µg/ml treprostinil
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL meta-cresol
	1,88 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	16 mg/ml glicerină
Compoziție L	100,4 U/ml insulină lispro
	15 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
	15 mM NaCl
	2,30 µg/ml treprostinil
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL meta-cresol
	1,88 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	16 mg/ml glicerină
Compoziție M	100,3 U/ml insulină lispro
	15 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
	15 mM NaCl
	9,30 µg/ml treprostinil

Nume	Compoziția formulării
	0,3 mM zinc
	3,15 mg/mL meta-cresol
	1,88 mg/mL fosfat de sodiu dibazic
	16 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 un concept încrucișat complet cu 17 porci în care fiecare porc este studiat pe fiecare articol de test. Unele animale nu au participat la studiu din cauza nepermeabilității portului sau a glucozei scăzute la linia de bază. Datele pentru Humalog® sunt n=17, pentru Compoziție I sunt n=17, pentru Compoziție J sunt n = 16, pentru Compoziție K sunt n=15, pentru Compoziție L sunt n=16 și pentru Compoziție M sunt n=16.

Datele referitoare la glucoza serică sunt reprezentate în Tabelul 8 de mai jos ca medie (mg/dL) +/-SEM în afară de cazul când se specifică altfel.

Tabelul 8.

	Humalog®		Compoziție I		Compoziție J		Compoziție K		Compoziție L		Compoziție M	
Timp (min)	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	302,5	7,0	324,0	7,2	322,4	11,0	319,6	10,4	337,6	13,6	321,6	7,9
-20	310,7	7,8	330,7	7,6	330,3	10,3	324,5	12,1	345,3	13,8	325,4	7,6
0	321,9	8,6	338,5	9,3	340,1	11,9	335,9	11,7	357,0	15,7	332,2	8,9
5	335,6	9,4	353,8	9,2	356,9	12,6	346,2	12,0	371,2	15,7	346,4	9,2
10	340,3	9,8	347,0	9,6	356,7	11,7	337,7	14,4	365,6	16,5	339,2	11,8
15	326,6	9,7	315,6	10,9	340,1	10,7	306,5	13,7	339,0	17,3	302,4	13,4
30	276,6	17,6	264,1	17,9	271,9	15,5	240,0	15,4	274,7	23,1	244,0	20,6
45	241,2	22,9	220,2	20,2	237,5	14,4	197,9	20,8	226,7	26,8	195,1	22,6
60	202,1	26,0	186,9	21,5	192,9	17,8	160,3	21,4	195,9	27,5	157,9	23,6
75	182,5	27,2	159,9	22,1	155,7	19,8	140,9	21,2	171,4	28,1	136,8	22,7
90	158,0	27,4	141,2	23,9	133,0	19,2	119,5	21,5	153,2	27,4	122,0	21,1
105	142,7	25,2	127,1	23,2	118,0	19,8	105,3	19,8	132,6	25,6	115,9	20,3
120	122,8	23,6	115,8	21,6	98,7	18,5	94,5	17,3	121,8	24,8	99,3	18,6
150	107,9	21,6	101,3	18,2	72,5	15,7	82,8	14,3	110,3	21,7	87,6	17,1
180	90,4	17,1	98,6	18,2	66,4	11,9	79,2	11,2	101,8	20,4	88,2	15,4
240	83,4	14,5	96,5	16,8	72,0	8,0	97,1	11,8	111,2	22,2	98,3	14,3
360	86,0	18,6	96,1	13,3	122,2	16,5	149,5	19,8	156,8	21,2	125,4	20,4

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.

Compoziție		Tmax (min)	½ Max timpuriu (min)	½ Max târziu (min)	Difuzare (min)	T50 (min)
Humalog®	Medie (SE)	60,0 (7,6)	22,9 (5,8)	152 (17)	129 (18)	107 (7)
I	Medie (SE)	57,1 (9,5)	16,0 (3,5)	144 (16)	128 (17)	102 (5)
J	Medie (SE)	55,3 (5,3)	13,7 (1,5)	139 (9)	125 (9)	96,8 (4,6)
K	Medie (SE)	55,0 (6,2)	15,8 (2,2)	136 (10)	120(11)	91,1 (4,8)
L	Medie (SE)	50,0 (7,2)	13,2 (2,1)	121 (10)	108 (10)	90,7 (6,6)
M	Medie (SE)	52,5 (7,4)	11,7 (1,5)	139 (18)	127 (18)	99,0 (7,4)

Acest studiu susține că compozițiile prezentei invenții au acțiune îmbunătățită a farmacocineticilor și/sau farmacodinamicilor în timp.

Insulină lispro formulată cu 10 µg/mL treprostinil și 15 sau 25 mM citrat

Un studiu pe compoziții care cuprind 10 µg/mL treprostinil și 15 sau 25 mM citrat este efectuat pe porci miniaturali Yucatan diabetici (indus cu Alloxan), castrați, masculi (vârsta medie 33 luni, greutate corporală medie 49 kg) urmând procedurile generale descrise mai sus.

Articolele de test (compozițiile N și O din tabelul mai jos) sunt formulate prin adăugarea cantităților indicate de citrat, treprostinil, NaCl și MgCl₂ la o fiolă de Humalog®. Ca și în studiul descris mai sus, cantitatea necesară de treprostinil este extrasă dintr-o fiolă de 1 mg/mL de Remodulin®, astfel că adăugarea de treprostinil la compozițiile de test conduce de asemenea la adăugarea de cantități mici de m-cresol, citrat de sodiu și clorură de sodiu, precum și diluția ușoară a excipienților de Humalog®. Nu se crede totuși că astfel de cantități mici afectează proprietățile compozițiilor, și astfel nu sunt reflectate în Tabelul 10 de mai jos.

Tabelul 10.

Nume	Compoziția formulării
Compoziție N	99,5 U/ml insulină lispro
	10 µg/ml treprostinil
	15 mM citrat
	5 mM MgCl ₂
	15 mM NaCl
	16 mg/ml glicerină
Compoziție O	99,6 U/ml insulină lispro
	10 µg/ml treprostinil
	25 mM citrat

Nume	Compoziția formulării
	5 mM MgCl ₂
	15 mM NaCl
	16 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 un concept încrucișat complet cu 20 de porci în care fiecare porc este studiat pe fiecare articol de test. Un animal nu a participat la grupul cu Compoziția N din cauza nepermeabilității portului sau glucozei scăzute la linia de bază, datele fiind n=19 pentru acel grup. Datele referitoare la glucoza serică sunt reprezentate în Tabelul 11 de mai jos ca medie (mg/dL) +/- SEM în afară de cazul când se specifică altfel.

Tabelul 11.

	Humalog®		Compoziție N		Compoziție O	
Timp (min)	AVG	SEM	AVG	SEM	AVG	SEM
-30	323,8	8,4	336,3	9,4	323,3	9,2
-20	332,6	9,1	344,7	9,5	336,0	9,2
0	343,1	8,8	354,0	9,9	346,6	10,2
5	353,3	9,8	364,5	10,8	355,2	10,9
10	355,8	9,8	357,1	9,1	342,3	11,4
15	355,2	10,6	340,7	11,6	325,6	13,8
30	317,9	12,9	293,3	15,9	270,0	17,9
45	291,4	19,1	254,8	19,2	239,7	21,0
60	255,6	21,1	220,9	21,3	216,1	22,8
75	239,8	23,9	195,2	21,7	193,8	22,8
90	205,7	23,7	173,8	22,6	172,6	22,7
105	184,4	22,8	156,0	21,5	158,6	22,7
120	162,0	21,7	139,1	19,4	145,9	21,7
150	135,3	20,5	107,1	18,2	116,8	19,4
180	119,2	18,4	86,1	16,5	104,8	18,3
240	84,1	13,3	83,3	13,1	80,8	14,8
360	63,4	11,4	108,6	14,2	86,1	10,8

Colectiv, studiile descrise mai sus susțin că, compozițiile prezentei invenții au acțiune farmacocinetică și/sau farmacodinamică mai rapidă decât formulările comerciale de produse de analogi de insulină existente.

Studii de stabilitate

Este evaluată stabilitatea insulinei lispro când este formulată cu un interval de concentrații de citrat, treprostinil și alți excipienți. Compozițiile din formulările exemplificative, prezentate în Tabelul 12 de mai jos, sunt preparate prin formularea ingredientului farmaceutic activ insulină lispro cu ceilalți excipienți indicați.

Tabelul 12.

Nume	Compoziție
Compoziție P	100 U/mL insulină lispro
	15 mM citrat
	10 µg/mL treprostinil
	0,65 mM zinc
	5 mM MgCl ₂
	0,06% poloxamer 188
	3,15 mg/mL m-cresol
	17,5 mM glicerol
	pH 7,4
Formulare Q	100 U/mL insulină lispro
	20 mM citrat
	10 µg/mL treprostinil
	0,65 mM zinc
	6,6 mM MgCl ₂
	0,06% poloxamer 188
	3,15 mg/mL m-cresol
	15,68 mM glicerol
	pH 7,4
Formulare R	100 U/mL insulină lispro
	25 mM citrat
	10 µg/mL treprostinil
	8,3 mM MgCl ₂
	0,65 mM zinc
	0,06% poloxamer 188
	3,15 mg/mL m-cresol
	13,82 mM glicerol
	pH 7,4

Soluțiile sunt filtrate utilizând un filtru cu vid de 50 ml Steriflip cu 0,22 µm membrană PES (Cat#: SCGP00525, EMD Millipore, Billerica, MD) și distribuite fie în fiole de 10 mL cu capac ondulat sau fie în cartușe de sticlă de 3 mL pentru insulină, apoi incubate la 4°C și respectiv 30°C. Mostrele de la 4°C sunt depozitate fără agitare timp de 64 zile, în timp ce mostrele de la 30°C sunt incubate fără agitare timp de 36 zile, urmate de o perioadă de simulare în-utilizare de 28 zile. În simularea în-utilizare recipientul este inversat și o mostră este extrasă din fiecare fiolă sau cartuș de trei ori pe zi timp de 28 zile. Două extrageri sunt făcute la fiecare moment de timp al zilei înainte sau după orice duminică, sâmbătă sau sărbătoare. Alicotele de 80 µL sunt extrase din fiecare fiolă utilizând seringă

pentru insulină Terumo U-100 (1/2 cc 27 G x 1/2") și 30 µL sunt extrași din fiecare cartuș utilizând HumaPen Luxura HD utilizând ace Comfort Point de 6mm (31 G x 1/4").

Mostrele sunt colectate din ziua 36 (ziua 1 a perioadei în-utilizare la 30°C), ziua 50 și ziua 64 pentru a fi analizate utilizând cromatografie de lichide de înaltă performanță cu fază inversă (RP-HPLC) și cromatografie analitică de excludere dimensională (SEC).

Toate formulările sunt de asemenea evaluate în cartușe de sticlă de 3 mL pentru insulină la 37°C în timp ce sunt agitate la ~100 rpm. Această condiție intenționează să fie un indicator de stabilitate în terapia prin perfuzie subcutanată continuă cu insulină. Mostrele finale din această condiție sunt analizate utilizând RP-HPLC și SEC.

Analiza RP-HPLC este efectuată pentru a evalua puritatea proteinei în fiecare formulare la momente de timp de stabilitate utilizând un detector UV la 214 nm. Fiecare mostră (5 µL) este separată utilizând o coloană Zorbax 300SB-C18, cu rezoluție rapidă 4,6 X 150 mm 3,5-microni (Part # 863973-902) la 40°C cu un debit de 0,6 mL/minut și fază mobilă A (50 mM sulfat, pH 2,3 + 20% acetonitril (v/v)) și fază mobilă B (50 mM sulfat, pH 2,3 + 50% acetonitril (v/v)). Gradientul de fază mobilă 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%. Conținutul de insulină este calculat utilizând RP-HPLC prin combinarea integrărilor ariei maxime principale de insulină și ariei A21, care apoi se împarte cu un standard de insulină lispro. Pierderea de insulină pentru mostrele formulării în comparație cu controlul cu Humalog® este mai mică de 5% pentru toate mostrele de până la 64 zile la 4°C și 30°C. Procentajul mostrei din afara maximumului principal cu A21 este calculat prin împărțirea ariei maxime principale cromatografice la aria maximă totală și scăzând acea arie și A21 din 100. Procentajul din afara ariei maxime principale este mai mic de 1,76% pentru toate mostrele la 4°C timp de 64 zile și mai mic de 2,48% pentru toate mostrele la 30°C timp de 64 zile.

Pentru analiza SEC, fiecare mostră (5 µL) este separată utilizând o coloană Sepax Zenix-C SEC-80, 7,8 x 300 mm, cu particule de 3 µm (catalog# 233080-7830) la 5°C și un debit de 1,0 mL/minut cu eluare izocratică a fazei mobile (0,1% TFA, 50% ACN) pentru un timp de rulare de 25 minute.

Procentajul de polimer cu masă moleculară mare (%HMWP) este calculat prin integrarea ariei procentuale totale a tuturor maximelor eluând înainte de maximumul principal. Rezultatele (% HMWP) sunt date în tabelele de mai jos. Formarea HMWP este mai mică de 1% pentru toate mostrele de până la 64 zile la 4°C și 30°C, și formarea HMWP în mostrele care conțin citrat este comparabilă cu formarea HMWP în mostrele de control cu Humalog®.

Tabelul 13. Fiole depozitate la 4°C: conținut de insulină, unități/mL.

Compoziție	Ziua 36	Ziua 50	Ziua 64
P	100,07	99,89	99,36
Q	100,06	99,88	99,38
R	100,03	99,85	99,29

Tabelul 14. Fiole depozitate la 4°C: alte substanțe înrudite, procente.

Compoziție	Ziua 36	Ziua 50	Ziua 64
P	0,92	1,05	1,17
Q	0,93	1,07	1,12
R	0,96	1,09	1,32

Tabelul 15. Fiole depozitate la 4°C: specii cu masă moleculară mare, procente.

Compoziție	Ziua 36	Ziua 50	Ziua 64
P	0,17	0,19	0,21
Q	0,16	0,20	0,22

Compoziție	Ziua 36	Ziua 50	Ziua 64
R	0,16	0,20	0,21

Tabelul 16. Fiole depozitate la 30°C: conținut de insulină, unități/mL.

Compoziție	Ziua 36	Ziua 50	Ziua 64
P	98,77	98,60	98,47
Q	98,67	98,50	98,46
R	98,82	98,65	98,46

Tabelul 17. Fiole depozitate la 30°C: alte substanțe înrudite, procente.

Compoziție	Ziua 36	Ziua 50	Ziua 64
P	1,23	1,40	1,53
Q	1,33	1,50	1,54
R	1,18	1,35	1,54

Tabelul 18. Fiole depozitate la 30 °C: specii cu masă moleculară mare, procente.

Compoziție	Ziua 36	Ziua 50	Ziua 64
P	0,33	0,41	0,46
Q	0,29	0,39	0,43
R	0,29	0,38	0,43

Tabelul 19. Cartușe de 3 mL depozitate 14 zile la 37°C cu agitare.

Compoziție	%HMW	Unități/ml	%Alte substanțe înrudite
P	0,33	98,24	1,32
Q	0,34	97,88	1,54
R	0,30	97,66	1,59

Este efectuat un studiu de stabilitate suplimentar în care formulările care conțin insulină lispro și diferite concentrații de citrat, treprostinil, zinc și alți excipienți sunt supuse la diferite condiții. Sunt preparate douăzeci și patru de formulări care conțin citrat și două formulări de control care nu conțin citrat. Concentrațiile de citrat, clorură de magneziu, Zn, clorură totală, treprostinil și poloxamer din formulări sunt indicate în Tabelul 20 de mai jos.

Tabelul 20. Formulări testate

Nr.	Citrat (mM)	MgCl ₂ (mM)	Zn total (mM)	Clorură totală (mM)	Treprostinil (μg/mL)	Poloxamer 188%
Referință S	0	0	0,3	10	0	0
Referință T	0	0	0,3	20	0	0
U	12	2,5	0,4	10	2	0
Referință V	12	2,5	0,8	13	0	0
Referință X	12	7,5	0,4	20	0	0
Y	12	7,5	0,8	23	2	0
Z	15	5	0,6	20	1	0
Referință AA	18	2,5	0,4	10	0	0

Nr.	Citrat (mM)	MgCl ₂ (mM)	Zn total (mM)	Clorură totală (mM)	Treprostinil (µg/mL)	Poloxamer 188%
BB	18	2,5	0,8	13	2	0
CC	18	7,5	0,4	20	2	0
Referință DD	18	7,5	0,8	23	0	0
EE	15	5	0,6	16	1	0,045
FF	15	5	0,6	16	1	0,045
GG	15	5	0,6	25	1	0,045
HH	15	5	0,6	30	1	0,045
II	15	5	0,6	50	1	0,045
JJ	15	5	0,6	100	1	0,045
KK	15	5	0,6	20	1	0,06
Referință LL	12	2,5	0,4	10	0	0,09
MM	12	2,5	0,8	13	2	0,09
NN	12	7,5	0,4	20	2	0,09
Referință OO	12	7,5	0,8	23	0	0,090
PP	18	2,5	0,4	10	2	0,09
Referință QQ	18	2,5	0,8	13	0	0,09
Referință RR	18	7,5	0,4	20	0	0,090
SS	18	7,5	0,8	23	2	0,090

Pentru a prepara formulările, se prepară o soluție stoc concentrată de lispro care conține 200 unități de insulină lispro/mL, 24,2 mg glicerină/mL, 6,30 mg metacresol/mL, și 0,6 mM zinc în apă pentru operațiuni sterile vrac. Această soluție stoc este ajustată la pH cu acid clorhidric pentru a dizolva insulina lispro și apoi ajustată cu hidroxid de sodiu la pH de 7,40.

Formulările care conțin citrat sunt preparate prin diluarea concentratului lispro cu volumele adecvate de soluții stoc excipient: citrat de sodiu, clorură de magneziu, oxid de zinc, treprostinil, și poloxamer 188. Pentru a obține conținutul țintă de clorură, se adaugă o soluție stoc de clorură de sodiu la unele formulări. Soluția este ajustată la pH până la 7,30 - 7,50 cu acid clorhidric sau hidroxid de sodiu urmată de q.s. cu apă pentru operațiuni sterile vrac.

Formulările non-citrat sunt preparate prin diluarea concentratului lispro cu volumele adecvate de apă pentru operațiuni sterile vrac sau apă pentru operațiuni sterile vrac și soluție de clorură de sodiu. Soluția este ajustată la pH până la 7,30- 7,50 cu acid clorhidric sau hidroxid de sodiu urmată de q.s. 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, acoperite cu dop, și etanșate prin sertizare. Sunt umplute douăzeci de fiole pe lot.

Studiul include supunerea fiolelor fiecărei formulări la una din trei condiții diferite, cum s-a descris mai jos.

Tabelul 21.

Condiție	Descriere
Control (n=5)	Depozitare statică verticală la 5°C timp de 39 zile
Stres termic (n=5)	Simulare abreviată a stresului de transport urmată de depozitare verticală statică la 30°C timp de 32 zile
Stres cumulativ (n=5)	Simulare abreviată a stresului de transport urmată de un pacient simulat 32 de zile în-utilizare cu depozitare verticală la 30°C între dozări

Cum s-a indicat în tabelul de mai sus, condițiile de stres termic și stres cumulativ includ mai întâi supunerea fiolelor la o simulare abreviată a stresului de transport, care este efectuată cum s-a descris în procedura 3A a International Safe Transit Association (ISTA) (2008). Pentru condițiile de stres termic, fiolele sunt apoi plasate în depozitare verticală statică la 30°C. Pentru condițiile de stres cumulativ, fiolele sunt apoi supuse la simularea unui pacient în-utilizare. Simularea pacientului în-utilizare este efectuată prin extragerea a 8 unități de aer în orice seringă pentru insulină, introducerea acului în fiolă în timp ce fiola este în poziție verticală, asigurând că vârful acului nu atinge soluția de insulină, injectarea aerului în fiolă, inversarea fiolei și seringii, extragerea a 8 unități de soluție de produs, eliminarea oricăror bule de aer din seringă prin mișcarea înceată a plonjorului pentru a împinge bulele înapoi în fiolă (repetând dacă este necesar) și ajustarea plonjorului seringii astfel încât dozajul final să fie de 8 unități, îndepărtarea seringii, și plasarea fiolei înapoi în incubator la 30°C. Acest proces este repetat pentru trei doze pe zi timp de 32 zile. Când nu sunt dozate, fiolele sunt depozitate vertical la 30°C.

Stabilitatea chimică este testată prin cromatografie de excludere dimensională (SEC) și HPLC cu fază inversă (RP-HPLC). Analiza RP-HPLC este efectuată pentru a evalua puritatea proteinei în fiecare formulare utilizând un detector UV la 214 nm. Fiecare mostră (5 µL) este separată utilizând o coloană Halo Peptide ES-C18, 4,6 X 150 mm 2,7-microni (Part # 92124-702) la 40°C cu un debit de 1,0 mL/minut și fază mobilă A (50 mM sulfat, pH 2,3 + 20% acetonitril (v/v)) și fază mobilă B (50 mM sulfat, pH 2,3 + 50% acetonitril (v/v)). Gradientul fazei mobile B la 0, 2, 17, 22, 25, 29, 29,5, și 35 minute este 25, 25, 27, 40, 90, 90, 25 și respectiv 25%. Conținutul de insulină este calculat prin combinarea integrărilor ariilor maxime principale de insulină și maxime B3, care apoi se împarte cu un standard de insulină lispro. Pentru SEC, fiecare mostră (50 µL) este separată utilizând o coloană Sepax Zenix-C SEC-80, 7,8 x 300 mm, cu particule de 3 µm (catalog# 233080-7830) la 5°C și un debit de 1,0 mL/minut cu eluare izocratică a fazei mobile (0,1% TFA, 50% ACN) pentru un timp de rulare de 25 minute. Procentajul de polimer cu masă moleculară mare (%HMWP) este calculat prin integrarea ariei procentuale totale a tuturor maximelor care eluează înainte de maximum principal. O fiolă a fiecăreia dintre formulările PP și QQ supusă la condiții de stres cumulativ ar putea să nu fie prelevată din cauza formării de particule. Toate celelalte fiole au fost testate, și toate rezultatele au fost în cadrul criteriilor de acceptare pentru insulina lispro, atât pentru potență (95 - 105 U/mL) cât și pentru HMWP (NMT 1,5%).

Stabilitate fizică este evaluată prin testarea aspectului vizual în care mostrele sunt inspectate vizual. Mostrele sunt clasificate ca fiind clare, incolore, și în mod esențial fără particule vizibile. Toate mostrele din toate formulările trec testarea aspectului vizual la toate momentele de timp din condițiile de control și stres termic. Rezultatele testării aspectului vizual pentru condițiile de stres cumulativ sunt furnizate în Tabelul 22 de mai jos.

Tabelul 22.

Formulare	Ziua 21 (n=5)	Ziua 24 (n=5)	Ziua 28 (n=5)	Ziua 32 (n=5)
S	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
T	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
U	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
V	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută

Formulare	Ziua 21 (n=5)	Ziua 24 (n=5)	Ziua 28 (n=5)	Ziua 32 (n=5)
X	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
Y	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
Z	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
AA	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
BB	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
CC	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
DD	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
EE	100% Trecută	100% Trecută	40% Trecută	0% Trecută
FF	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	0% Trecută
GG	100% Trecută	80% Trecută	0% Trecută	0% Trecută
HH	100% Trecută	100% Trecută	0% Trecută	0% Trecută
II	100% Trecută	100% Trecută	0% Trecută	0% Trecută
JJ	100% Trecută	100% Trecută	0% Trecută	0% Trecută
KK	100% Trecută	100% Trecută	0% Trecută	0% Trecută
LL	60% Trecută	60% Trecută	40% Trecută	0% Trecută
MM	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	20% Trecută
NN	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	80% Trecută
OO	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută
PP	20% Trecută	0% Trecută	0% Trecută	0% Trecută
QQ	80% Trecută	80% Trecută	20% Trecută	0% Trecută
RR	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	0% Trecută
SS	100% Trecută	100% Trecută	100% Trecută	0% Trecută

Toate fiolele formulărilor U, V, X, Y, Z, AA, BB, CC DD și OO au trecut testul de stres cumulativ din ziua 32 a simulării pacientului în-utilizare. Toate fiolele formulărilor FF, MM, NN, RR și SS au trecut testul de stres cumulativ de până în ziua 28. Toate fiolele formulărilor EE, HH, II, JJ și KK au trecut ziua 24. Toate fiolele cu formularea GG au trecut prin ziua 21.

Studiile descrise mai sus susțin că compozițiile sunt stabile chimic și fizic sub condiții de stres frigorific și termic, și că anumite compoziții ale prezentei invenții sunt suficient de stabile pentru utilizare comercială chiar și în timpul testării de utilizare simulate de până la 32 zile.