

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 580**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/28** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2009 E 12158390 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2476430**

54 Título: **Compuestos de insulina lispro pegilados**

30 Prioridad:

**13.06.2008 US 61281 P**  
**10.12.2008 US 121394 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.07.2014**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)**  
**Lilly Corporate Center**  
**Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**BEALS, JOHN MICHAEL;**  
**CUTLER, GORDON BUTLER;**  
**DOYLE, BRANDON;**  
**HANSEN, RYAN JOHN;**  
**LI, SHUN;**  
**SHIRANI, SHAHRIAR y**  
**ZHANG, LIANSHAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 473 580 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Compuestos de insulina lispro pegilados

La presente invención se refiere al campo de la diabetes. Más particularmente, la invención se refiere a compuestos de insulina lispro PEGilados que son muy solubles y que tienen un perfil de acción extendido, a procedimientos de proporcionar dichas moléculas, a composiciones farmacéuticas que las contienen y al uso terapéutico de dichos compuestos.

Con el fin de alcanzar una glucemia normal, se ha diseñado una terapia de sustitución de insulina en paralelo lo más cercano posible al patrón de secreción de insulina endógena en individuos normales. La demanda fisiológica diaria de insulina fluctúa y se puede separar en dos fases: (a) la fase de absorción que requiere un pulso de insulina para deshacerse del pico de glucosa en sangre relacionada con la comida, y (b) la fase postabsorción que requiere una cantidad sostenida de insulina para regular la salida de glucosa hepática para mantener una glucemia en ayunas óptima. De acuerdo con esto, la terapia eficaz con insulina para diabéticos normalmente implica el uso combinado de dos tipos de formulaciones de insulina exógena: una insulina a la hora de las comidas de acción rápida suministrada en inyecciones de bolos y una insulina de acción más prolongada que se administra mediante inyección una o dos veces al día para controlar los niveles de glucosa en sangre entre comidas.

Las terapias de sustitución de insulina disponibles actualmente son deficientes en uno o más aspectos clínicamente importantes. Por ejemplo, las formulaciones de insulina tradicionales de acción intermedia y larga, como el análogo de la insulina basal, la insulina detemir, poseen una duración de actividad que no es suficiente para proporcionar un control de la glucosa basa para todo un día cuando se administran diariamente. Como resultado, la duración de la acción de la insulina basal suele ser insuficiente para controlar adecuadamente la hiperglucemia y, más específicamente, los requisitos de la fase postadsorción, con una única inyección diaria. Además, la omisión de una sola inyección de las terapias actuales puede conducir a un incremento significativo de los niveles "pico a valle" del fármaco, lo que da lugar a un control alterado de la glucosa. Además, la utilización de estrategias de insolubilidad para prolongar la liberación de insulina en las formulaciones tradicionales de acción intermedia y larga, por ejemplo suspensiones cristalinas de insulina Neutral Protamine Hagedorn (NPH) y ULTRALENTE®, o la estrategia de precipitación in vivo de la insulina glargina, aumentan la variabilidad intra-inyección, que tiene como resultado un incremento de la variabilidad del perfil dosis-respuesta. Más específicamente, las suspensiones NPH y ULTRALENTE requieren mezclado mecánico para asegurar la uniformidad del producto, presentan mayor variabilidad intra-sujeto y tienden a un pico en lugar de proporcionar un perfil farmacodinámico "plano" necesario para mantener la glucemia óptima en ayunas durante un periodo de tiempo extendido entre comidas. Por tanto, las formulaciones de insulina que dependen de un estado de insoluble para prolongar el mantenimiento de la insulina son, inherentemente, menos predecibles que las formulaciones solubles y tienen como resultado un control menos que adecuado de la glucemia y una mayor susceptibilidad a episodios hipoglucémicos que amenazan la vida. Adicionalmente, los modernos análogos de la insulina basal no se pueden mezclar fácilmente con formulaciones de insulina de acción rápida o inmediata. Por tanto, las actuales terapias de sustitución de insulina todavía dejan pacientes diabéticos susceptibles a episodios hipoglucémicos que amenazan la vida, las serias complicaciones médicas a largo plazo de la diabetes y/o imponen considerables inconvenientes y desventajas sobre la calidad de vida del paciente.

La patente de EE.UU. n° 4.179.337 titulada "Polipéptidos no inmunogénicos" divulga insulina conjugada a moléculas PEG lineales que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 500 y aproximadamente 20.000 Da. Hinds y Kim divulgaron insulina conjugada con peso molecular bajo (600 Da, 750 Da y 2000 Da) monometoxipoli(etilenglicol) (Hinds, K.D., y Kim, y col., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:505-530 (2002)). En dicho artículo, los autores indicaron que restringían su estudio a conjugados de insulina mPEG de bajo peso molecular "porque anteriormente se había encontrado que la fijación de mPEG de peso molecular más alto (5.000 Da) deprimía considerablemente la bioactividad del conjugado". La publicación de solicitud de patente internacional PCT n° WO 2006/079641 divulga la conjugación de derivados de insulina, incluida la insulina lispro, con polímeros ramificados pequeños. La publicación de solicitud de patente internacional PCT n° WO 2004/091494 divulga, entre otras, moléculas de insulina conjugada a moléculas PEG lineales y ramificadas que tienen un peso molecular total del PEG de hasta y aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 20 kDa, respectivamente. Las publicaciones de solicitud de patente internacional PCT n° WO 2008/015099 (publicada el 7 de febrero de 2008) y WO 2008/084051 (publicado el 17 de julio de 2008) divulgan, entre otros, varios análogos de insulina conjugada a moléculas de PEG que tienen un peso molecular nominal en el intervalo de aproximadamente 200 a aproximadamente 40.000 Da.

Claramente, todavía existe una necesidad crítica de insulinas de duración larga que están más adecuados para regímenes de sustitución de insulina basal. En concreto, se necesitan insulinas basales solubles que se pueden mezclar con formulaciones de insulina prandial tienen perfiles de acción-tiempo extendidos (es decir, pueden controlar adecuadamente los niveles de glucosa e sangre con una inyección una vez al día o con menor frecuencia), actividad más plana, perfiles de farmacocinética (es decir, proporciones "pico a valle" menores), menor variabilidad intra-paciente (es decir, perfil de tiempo-acción más predecible que se traduce en una menor "incidencia de la hipoglucemia y/o ganancia de peso) y/o menor irritación o dolor en el sitio de la inyección tras la inyección.

Los inventores informan en la presente memoria del descubrimiento de que la insulina lispro se puede PEGilar con

derivados de poli(etilenglicol) de peso molecular alto para proporcionar compuestos de insulina lispro PEGilada que tienen una actividad de insulina basal terapéuticamente eficaz, perfiles de acción-tiempo extendidos, son muy solubles a pH fisiológico y/o son miscibles con otras formulaciones de insulina prandial usadas.

5 De acuerdo la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina lispro PEGilado de la fórmula I: P-[(A)-(B)], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que P es un PEG que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 17,5 kDa a aproximadamente 40 kDa; A es la cadena A de la insulina lispro (SEC ID N° 1) B es la cadena B de la insulina lispro (SEC ID N° 3) y en la que A y B están adecuadamente reticulados y P está unido a través de un enlace covalente de uretano al grupo Epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de B; uno o más excipientes, diluyentes o vehículos; y una cantidad  
10 terapéuticamente eficaz de insulina lispro.

Preferentemente, la composición farmacéutica comprende además una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que además comprende un conservante fenólico farmacéuticamente aceptable y una cantidad de cinc suficiente para hacer que los compuestos de insulina lispro PEGilados hexamericen.

15 La presente invención también proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de compuestos de insulina lispro mono y di PEGilados, en los que más del 75 % de los compuestos de insulina lispro PEGilados en la composición son compuestos monoPEGilados de Fórmula I.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden compuestos de insulina monoPEGilados de Fórmula I en los que más de aproximadamente el 50 % de los compuestos monoPEGilados en la composición tienen un PEG unido covalentemente directa o indirectamente al grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B.  
20

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden insulina lispro PEGilada de Fórmula I y uno o más conservantes, agentes de isotonicidad, iones metálicos o tampones farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones de la invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden insulina lispro PEGilada de Fórmula I y uno o más conservantes, agentes de isotonicidad, iones metálicos o tampones farmacéuticamente  
25 aceptables junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de la insulina.

La presente invención también proporciona procedimientos de tratar la hiperglucemia, la diabetes mellitus o la diabetes gestacional, que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina lispro PEGilado de la presente invención.

La presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende el compuesto de insulina lispro PEGilado de la presente invención para uso en terapia.  
30

La presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina lispro PEGilado de la presente invención para uso en terapia para uso en el tratamiento de la hipoglucemia, la diabetes mellitus o la diabetes gestacional.

### **Breve descripción de las figuras**

35 La Figura 1 representa gráficamente los perfiles de FC humanos simulados para PEG-B28-insulina lispro de 20 kDa, PEG-B2-insulina lispro de 40 kDa e insulina detemir, en base al escalado alométrico de los parámetros FC de ratas y perros. Los perfiles representan un intervalo de dosificación tras una semana de dosificación. Los números son las proporciones medias pico-valle.

40 La Figura 2 es un gráfico de las velocidades de infusión de glucosa (GIR) en seres humanos tras una dosis subcutánea de PEG<sub>20kDa</sub>-B28(≥-95 %)/A1(≤-5-5%)-insulina lispro (LY; 0,225 mg/kg) o insulina glargina (0,5 U/kg). Los perfiles GIR se basan en datos observados y una función "loess smooth" Splus 2000. Professional Edition, MathSoft, Inc) desarrollada en Lilly Research Laboratories se usó para ajustar los datos observados.

### **Descripción detallada de la invención**

45 En la presente memoria descriptiva se usan las abreviaturas siguientes: ACN: acetonitrilo. Boc: terc-butoxicarbonilo. BSA: seroalbúmina bovina. DCM: diclorometano, metilencloruro. DMF: N,N-dimetilformamida. DMSO: Dimetilsulfóxido. DTT: Ditiotreitól. EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético. Et: Etilo. EtOH: Etanol. Fmoc: 9-Fluorenilmetiloxycarbonilo. HCl: ácido clorhídrico. Da: Dalton. kDa: kilodalton. Lilly: Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN). mAb: Anticuerpo monoclonal. Me: Metilo. MeOH: Metanol. PBS: solución salina tamponada con fosfato. RP-HPLC: cromatografía de líquidos de fase inversa de alto rendimiento. SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño. SEM: error estándar de la media. SPA: ensayo de centelleo por proximidad. TFA: ácido trifluoroacético.  
50 Todas las abreviaturas de aminoácidos usadas en esta divulgación son las aceptadas por la Oficina de Patentes y Marcas de EE.UU., como se indica en 37 C.F.R. § 1.822.(B)(2).

Con el término "insulina" se pretende abarcar insulina silvestre de cualquier especie, incluidas, entre otras, insulina porcina, insulina bovina e insulina humana. La insulina nativa o silvestre se refiere a insulina que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la insulina tal como se encuentra en la  
55

naturaleza. Las secuencias de polinucleótidos y de aminoácidos que codifican la insulina de una serie de especies diferentes con bien conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la insulina humana tiene una cadena A de veintiún aminoácidos y una cadena B de treinta aminoácidos (SEC ID N° 1 y 2, respectivamente). La insulina puede ser natural (es decir aislada de una fuente natural), o producirse de forma biosintética o sintética. Con el término "insulina" también se pretende incluir cualquier derivado de insulina y/o análogo de la insulina.

Un "análogo de la insulina" o "derivado de la insulina" se define en el presente documento como una proteína que tiene actividad de insulina y sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos como insulina humana, pero difiere de la insulina humana en una modificación relativa a la insulina humana, incluidas una o más sustituciones, deleciones, inversiones o adiciones. Dichos compuestos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional PCT n° WO 96/15804 y WO 03/053339; las patentes de EE.UU. n° 3.528.960, 5.514.646, 5.618.913, 5.750.497, 6.011.007, 6.251.856; y las patentes EP N° 254.516 y 280.534. Una lista de ejemplo pero no exhaustiva de análogos de la insulina conocidos para un experto en la técnica incluye insulina aspart, insulina iispro, insulina glargina, insulina detemir e insulina glulisina. Además, el término "insulina" del presente documento también cubre compuestos que se pueden considerar como un derivado de insulina y como un análogo de la insulina. Ejemplos de dichos compuestos se describen en las patentes de EE.UU. N° 5,750,497, y 6,011,007. Un ejemplo específico de dicho compuesto conocido para el experto en la técnica es la insulina detemir.

Se sabe que varios análogos de la insulina y/o derivados son análogos de la insulina de "acción rápida". En el presente documento, los términos "de acción rápida" y "de acción veloz" se usan de forma intercambiable. Un "análogo de la insulina de acción rápida" produce un efecto de glucosa prandial que (a) comienza antes tras la administración subcutánea que la insulina humana y/o (b) exhibe una duración de acción más corta que la insulina humana tras la administración subcutánea. Ejemplos de análogos de la insulina de acción rápida incluyen "análogos monoméricos de la insulina" que son de acción rápida porque, en general, son menos propensos a la dimerización o autoasociación en condiciones fisiológicas. Los análogos monoméricos de la insulina se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.700.662 y la patente europea n° 214 826. La insulina lispro es un análogo monomérico de la insulina de acción rápida en el que la prolina de la posición 28 en la cadena B de la insulina silvestre (SEC ID N° 2) y la lisina de la posición 29 en la cadena B de la insulina silvestre (SEC ID N° 2) se han cambiado. De acuerdo con esto, La insulina lispro se conoce en la técnica con varias designaciones, incluidas, entre otras, LysB28ProB29-insulina humana, LysB28ProB29-insulina humana y B28Lys, B29Pro insulina humana.

El término "reticulado" significa que existen enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína. Por ejemplo, la insulina humana reticulada adecuadamente contiene un enlace disulfuro entre la cisteína en la posición 7 de la SEC ID N° 1 y la cisteína en la posición 7 de la SEC ID N° 2, entre la cisteína en la posición 20 de la SEC ID N° 1 y cisteína en la posición 19 de la SEC ID N° 2 y entre la cisteína en la posición 6 de la SEC ID N° 1 y la cisteína en la posición 11 de la SEC ID N° 1. De forma similar, un compuesto de insulina lispro reticulado adecuadamente contiene un enlace disulfuro entre la cisteína en la posición 7 de la SEC ID N° 1 y la cisteína en la posición 7 de la SEC ID N° 3, entre la cisteína en la posición 20 de la SEC ID N° 1 y cisteína en la posición 19 de la SEC ID N° 3 y entre la cisteína en la posición 6 de la SEC ID N° 1 y la cisteína en la posición 11 de la SEC ID N° 1.

Como se usa en el presente documento "insulina lispro conjugada con PEG" o "insulina lispro PEGilada" se refiere a insulina lispro humana o a un derivado de la misma unida covalentemente a al menos un PEG y que posee actividad de insulina in vivo.

Las actividades biológicas de la insulina y la insulina lispro están bien establecidas. Con la frase "actividad de insulina2 con respecto a un compuesto de insulina lispro PEGilada de la presente invención se pretende significar la capacidad para disminuir significativamente los niveles de glucosa en sangre en al menos un modelo animal in vivo aceptado generalmente, incluidos, entre otros, modelos animales de diabetes de tipo 1 y de tipo 2 que se describen más adelante en el Ejemplo 5 y el Ejemplo 6, respectivamente. Por tanto, la actividad de insulina incluye la capacidad de un compuesto de insulina lispro PEGilada para disminuir los niveles de glucosa en sangre a un nivel de 100 mg/dl o inferior en una rata tratada con STZ durante un periodo que varía de aproximadamente 4 horas a al menos aproximadamente 36 horas tras una única inyección subcutánea a una dosis de 568 nmol/kg.

El término "polietilenglicol" o "PEG" se refiere a un compuesto de polialquilenglicol o derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento, o derivatización con restos de acoplamiento o de activación. En su forma típica, el PEG es un polímero lineal con grupos hidroxilo terminales y tiene la fórmula HO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH. El número de subunidades de repetición "n" en el PEG se aproxima para la masa molecular descrita en Dalton. Normalmente,, los reactivos de PEG usados para preparar compuestos PEGilados comprenden una mezcla heterogénea de PEG que tienen un número diferente (n) de subunidades de etilenglicol en el polímero PEG. Una única subunidad de etilenglicol (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) de PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 44 Dalton. Por tanto, el peso molecular del polímero PEG depende del número (n). Los PEG unidos a los compuestos de insulina lispro PEGilados de la presente invención tendrán una n en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 1000 subunidades. Preferentemente, los PEG unidos a los compuestos de insulina lispro PEGilados de la presente invención tendrán una n en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 750. Más preferentemente, los PEG unidos a los compuestos de insulina lispro PEGilados de la presente invención tendrán una n en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 550. Más preferentemente, los PEG unidos a los compuestos de insulina lispro PEGilados de la presente invención tendrán una n en el intervalo de

aproximadamente 400 y aproximadamente 500.

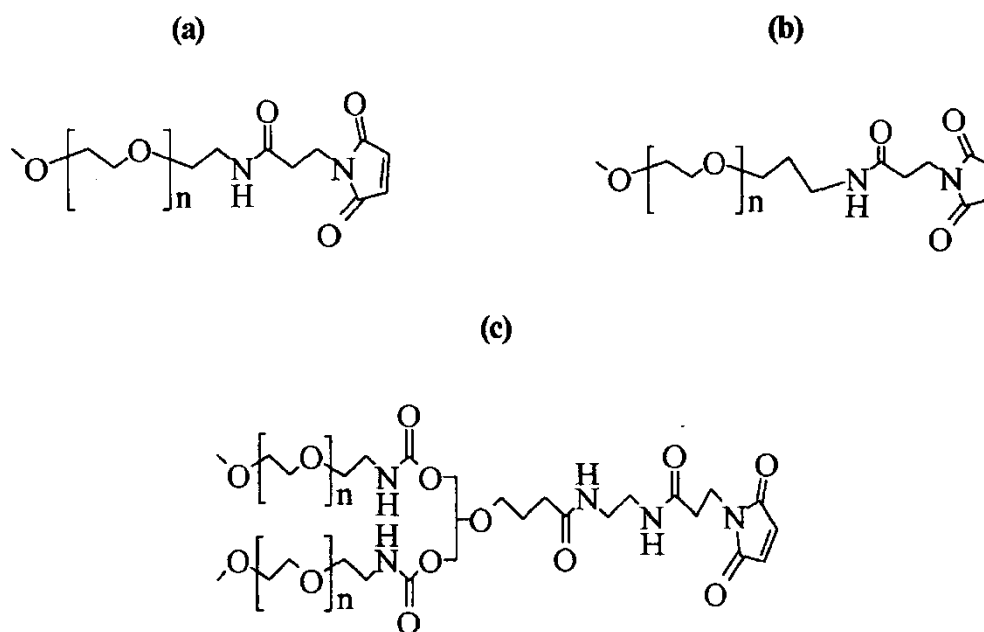
En la técnica se conocen numerosos derivados de PEG y procedimientos para fabricarlos y conjugarlos a una proteína, tal como insulina o insulina lispro, y son adecuados para usar en la presente invención. Véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacional N° WO 01/62827, WO 2006/028745, WO 2006/096535, WO 2006/036825; Zalipsky, S. *Bioconjugate Chem.* 6:150-165, 1995; Veronese, y col., *Applied Biochem. and Biotech.* 11:141-152, 1985; y Roberts, M. y col., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:459-476, 2002. Un PEG particularmente preferido para usar en la invención es un PEG que tiene un extremo del polímero que termina con un grupo relativamente inerte, tal como un grupo alcoxi C<sub>1-6</sub> menor. Preferentemente, el PEG es un monometoxi-PEG (habitualmente denominado mPEG), que es una forma lineal del PEG en el que un extremo del polímero es un grupo metoxi (-OCH<sub>3</sub>). Incluso más preferentemente, el PEG usado en la invención es un "mPEG activado" en el que un extremo del PEG lineal termina con un grupo metoxi y el otro extremo termina con un grupo reactivo adecuado para acoplar a un sitio deseado sobre la insulina lispro o sobre un derivado de insulina lispro derivado con el fin de facilitar la PEGilación con un mPEG activado deseado en un sitio específico de la molécula de insulina lispro.

Dado que los PEG normalmente se generan y usan como mezclas de compuestos PEG que varían en cierto grado en su peso molecular, un experto en la técnica describe, generalmente, el peso molecular de un PEG unido a un compuesto describiendo el tamaño medio del reactivo de PEG usado en la reacción de PEGilación que generó el compuesto PEGilado concreto. Entre los muchos posibles modos de indicar las medias, normalmente se usan tres: el número promedio, el peso promedio y los pesos moleculares promedio z. Como se usa en el presente documento, con la expresión "peso molecular promedio" se pretende hacer referencia al peso molecular promedio en peso que se puede medir usando técnicas bien conocidas en la materia, incluidas, entre otras, espectrometría de masas asistida por láser en matriz con desorción ionización-tiempo de vuelo (MALDI-TOF), cromatografía de permeación en gel u otras técnicas de cromatografía líquida, técnicas de dispersión de luz, ultracentrifugación y viscosimetría. La fórmula para calcular el peso molecular promedio en peso se pueden representar como  $\frac{\sum(M_i^2 N_i)}{\sum(M_i N_i)}$ , en la que N<sub>i</sub> es la fracción molar (o la fracción en número) de moléculas con peso molecular M<sub>i</sub> en la mezcla. La fórmula para calcular el peso molecular promedio en número se puede representar como  $\frac{\sum(M_i N_i)}{\sum(N_i)}$ , en la que N<sub>i</sub> es la fracción molar (o la fracción en número) de moléculas con peso molecular M<sub>i</sub> en la mezcla. La proporción entre el peso molecular promedio en peso y el peso molecular promedio en número se conoce como el índice de polidispersidad (IPD) y proporciona una indicación aproximada de la anchura de la distribución. Los reactivos PEG adecuados para preparar los compuestos de insulina lispro PEGilada de la invención son, normalmente, polidispersos (es decir, el peso molecular promedio en peso y el peso molecular promedio en número de los polímeros no son iguales). Preferentemente, el IPD para los reactivos de PEG usados para preparar los compuestos o composiciones de la presente invención es inferior a aproximadamente 1,1. Más preferentemente, el IPD para los reactivos de PEG usados para preparar los compuestos o composiciones de la presente invención es inferior a aproximadamente 1,05.

Con respecto a los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención, el PEG unido covalentemente a una molécula de insulina lispro tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 17,5 kDa a aproximadamente 40 kDa (n está en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 1000) o el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17,5 kDa a aproximadamente 40 kDa. Preferentemente, el PEG unido covalentemente a una molécula de insulina lispro tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 30 kDa (n está en el intervalo de aproximadamente 450 a aproximadamente 750) o el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 30 kDa. Más preferentemente, el PEG unido covalentemente a una molécula de insulina lispro tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 17,5 kDa a aproximadamente 25 kDa (n está en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 550) o el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17,5 kDa a aproximadamente 25 kDa. Lo más preferentemente, el PEG unido covalentemente a una molécula de insulina lispro tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 17,5 kDa a aproximadamente 20 kDa (n está en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 500) o el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17,5 kDa a aproximadamente 20 kDa.

En ciertas realizaciones, los compuestos de insulina lispro PEGilados de la presente invención se preparan uniendo covalentemente un mPEG activado de un peso molecular promedio deseado a la insulina lispro. Las condiciones de la reacción para la PEGilación de la insulina lispro varían en función del PEG concreto usado, el sitio de la unión sobre la insulina lispro, el tipo concreto de grupo reactivo sobre la insulina lispro que es la diana de la unión, el grado deseado de PEGilación y similares, y puede determinarlas fácilmente un experto en la técnica. Las condiciones experimentales optimizadas para una estrategia de PEGilación concreta pueden ser determinadas fácilmente, habitualmente mediante experimentación de rutina, por un experto en la técnica.

En el presente documento se describen compuestos de insulina lispro PEGilados preparados conjugando indirectamente un mPEG activado que es relativamente tiol-selectivo, tal como mPEG-maleimida (mPEG-MAL) o un a mPEG-tiol (mPEG-SH) a la insulina lispro conjugando el mPEG activado que es relativamente tiol-selectivo a una funcionalidad tiol que se ha introducido en la insulina lispro usando modificadores de "amina-a-tiol", tales como N-succinimidil-S-acetiltiopropionato (SATP) y N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA). Más preferentemente, el mPEG activado empleado para unir covalentemente un PEG a un grupo tiol (sulfhidrilo) sobre la insulina lispro es un mPEG-maleimida tal como **(a)**, **(b)** o **(c)** que se muestran más adelante.



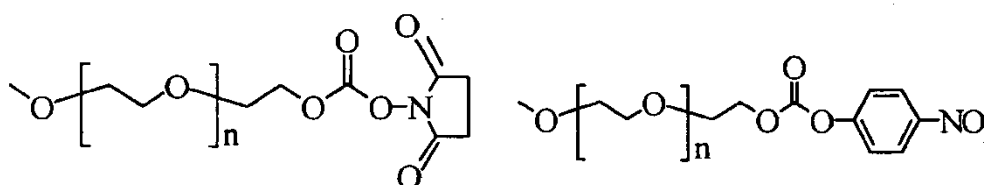
Un procedimiento preferido de preparar compuestos de insulina lispro PEGilados usa adición de Michael para formar un enlace tioéter estable. La reacción es altamente específica y tiene lugar en condiciones suaves en presencia de otros grupos funcionales. Por ejemplo, el mPEG-maleimida es útil como mPEG activado para preparar conjugados de insulina lispro PEGilados de la presente invención. Preferentemente, el procedimiento de PEGilación usa un exceso molar de una insulina lispro derivada con tiol respecto al mPEG-maleimida para dirigir la reacción hasta su finalización. Preferentemente, las reacciones también se realizan a un pH entre 4,0 y 9,0, a temperatura ambiente durante de 1 a 40 horas. El exceso de péptido que contiene tiol no PEGilado se separa fácilmente del producto PEGilado mediante procedimientos de separación convencionales. Ejemplos de condiciones que se requieren para la PEGilación de la insulina lispro usando mPEG-maleimida activado se describen en el Ejemplo 1.

En el presente documento se describen compuestos de insulina lispro PEGilados preparados conjugando un mPEG activado que es relativamente específico de las aminas. Los mPEG activados adecuados para PEGilación específica principalmente de aminas de insulina lispro incluyen mPEG-succinimidil propionato (mPEG-SPA), mPEG succinimidil butanoato (mPEG-SBA), mPEG-succinimidil  $\alpha$ -metilbutanoato (mPEG-SMB), mPEG-succinimidil carbonato (mPEG-SC), mPEG-benzotriazol carbonato, y mPEG-p-nitrofenil carbonato (mPEG-NPC).

En realizaciones preferidas de la invención, los mPEG activados usados para PEGilación de la insulina lispro tienen como resultado una insulina lispro unida covalentemente a un mPEG a través de un enlace uretano covalente hidrolíticamente estable (también conocido como carbamato). Más preferentemente, el mPEG activado usado para PEGilación de la insulina lispro es mPEG-SC o mPEG-NPC, que tienen ambos como resultado una insulina lispro unida covalentemente a al PEG a través de un enlace uretano (o carbamato). Ejemplos de condiciones útiles que se requieren para la PEGilación de la insulina lispro usando mPEG-NPC de varios pesos moleculares se indican en el Ejemplo 2.

mPEG-SC:

mPEG-NPC:



Los compuestos de insulina lispro PEGilados de la invención normalmente se purifican usando una o más técnicas de purificación, tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica y/o cromatografía de fase inversa. La

heterogeneidad global de los compuestos de insulina lispro PEGilados (número y proporción de los compuestos de insulina lispro PEGilados generados a partir de una reacción de PEGilación) en una muestra se puede evaluar usando uno o más de los procedimientos siguientes: cromatografía, electroforesis, espectrometría de masas y, en concreto, MALD-EM y espectroscopia RMN.

- 5 La insulina lispro usada para preparar compuestos de insulina lispro PEGilados de la presente invención se puede preparar mediante cualquiera de diversas técnicas de síntesis peptídica reconocidas, incluidos procedimientos de fase en solución, procedimientos de fase sólida, procedimientos semisintéticos y procedimientos de ADN recombinante. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.700.662 (Chance, y col.) y la patente europea n° 214 826 (Brange, y col.) divulgan la preparación de varios análogos de la insulina. Las cadenas A y B de la insulina lispro también se pueden preparar mediante una molécula precursora de tipo proinsulina usando técnicas de ADN recombinante. En realizaciones preferidas, el precursor de tipo proinsulina se usa para fabricar la insulina lispro usada para fabricar la insulina lispro PEGilada de la presente invención.

La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:

P-[(A)-(B)], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

- 15 A es la cadena A de la insulina lispro (SEC ID N° 1);

B es la cadena B de la insulina lispro (SEC ID N° 3); y

- P es un PEG que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 17,5 kDa a aproximadamente 40 kDa, y en el que A y B están adecuadamente reticuladas y P está unido directamente mediante un enlace covalente al grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B. En el presente documento se describen compuestos en los que (a) P está unido covalentemente a la insulina lispro a través de un enlace uretano o tioéter; y (b) el compuesto se caracteriza por tener una  $K_i$  por el receptor de la insulina humana de aproximadamente 30 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 10 nM, o aproximadamente 5 nM o menor, una semivida de eliminación superior a aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, o aproximadamente 14 horas en una rata tratada con STZ a una dosis de aproximadamente 568 nmol/kg, o mediante la actividad de disminuir la glucosa en sangre hasta un nivel de aproximadamente 100 mg/dl o menor en una rata tratada con STZ durante un periodo que varía de aproximadamente 4 horas a al menos aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 108 horas, o aproximadamente 120 horas tras una única inyección subcutánea del compuesto a una dosis de aproximadamente 568 nmol/kg. Compuestos preferidos son aquellos en los que: (a) P está unido covalentemente a la insulina lispro a través de un enlace uretano; (b) el compuesto se caracteriza por tener una  $K_i$  por el receptor de la insulina humana de aproximadamente 10 nM, o menor; (c) el compuesto se caracteriza por tener una semivida de eliminación superior a aproximadamente 6 horas en una rata tratada con STZ a una dosis de aproximadamente 568 nmol/kg; y (d) el compuesto se caracteriza por tener actividad de disminuir la glucosa en sangre hasta un nivel de aproximadamente 100 mg/dl en una rata tratada con STZ durante un periodo que varía de aproximadamente 4 horas a al menos aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 108 horas, o aproximadamente 120 horas tras una única inyección subcutánea del compuesto a una dosis de aproximadamente 568 nmol/kg. Los compuestos más preferidos son aquellos en los que: (a) P está unido covalentemente a la insulina lispro a través de un enlace uretano; (b) el compuesto se caracteriza por tener una  $K_i$  por el receptor de la insulina humana de aproximadamente 10 nM, o menor; (c) el compuesto se caracteriza por tener una semivida de eliminación superior a aproximadamente 6 horas en una rata tratada con STZ a una dosis de aproximadamente 568 nmol/kg; y (d) el compuesto se caracteriza por tener actividad de disminuir la glucosa en sangre hasta un nivel de aproximadamente 100 mg/dl en una rata tratada con STZ durante un periodo que varía de aproximadamente 4 horas a al menos aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 108 horas, o aproximadamente 120 horas tras una única inyección subcutánea del compuesto a una dosis de aproximadamente 568 nmol/kg, y (e) el compuesto se caracteriza por tener una semivida de eliminación superior a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 36 horas, 38 horas, aproximadamente 40 horas, o aproximadamente 42 horas en un ser humano tras la administración de una única dosis parenteral de 0,225 mg/kg.

- De acuerdo con las características y principios consistentes con la invención, una realización de la invención proporciona un compuesto de insulina lispro mono-PEGilado que comprende un PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17,5 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, o aproximadamente 40 kDa unido covalentemente directamente al grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de la insulina lispro (PEG-LysB28 insulina lispro). En el presente documento se describen compuestos de insulina lispro mono-PEGilado que comprende un PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17,5 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente

30 kDa, o aproximadamente 40 kDa unidos bien directamente o indirectamente al grupo alfa-amino de la fenilalanina en la posición 1 de la cadena B de la insulina o grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de la insulina lispro. Más preferentemente, el compuesto de insulina lispro mono-PEGilado comprende un PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17,5 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, o aproximadamente 40 kDa unido covalentemente directamente al grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de la insulina lispro. Incluso más preferentemente, el compuesto de insulina lispro mono-PEGilado comprende un PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17,5 kDa o aproximadamente 20 kDa unido al grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de la insulina lispro (20 kDa-PEG-LysB28 insulina lispro). Más preferentemente, el compuesto de insulina lispro mono-PEGilado comprende un PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa unido al grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de la insulina lispro (es decir, PEG<sub>20 kDa</sub>-LysB28 insulina lispro).

En el presente documento se describen compuestos de insulina lispro mono-PEGilado que comprende un PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17,5 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, o aproximadamente 40 kDa unidos covalentemente directa o indirectamente al grupo alfa-amino de la glicina en la posición 1 de la cadena A de la insulina lispro, al grupo alfa-amino de la fenilalanina en la posición 1 de la cadena B de la insulina o al grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de la insulina lispro. Preferentemente, la insulina lispro mono-PEGilada comprende un PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 17,5 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, o aproximadamente 40 kDa unidos bien directamente o indirectamente al grupo alfa-amino de la fenilalanina en la posición 1 de la cadena B de la insulina o grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de la insulina lispro. Más preferentemente, la insulina lispro mono-PEGilada comprende un PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 17,5 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 30 kDa o aproximadamente 40 kDa unido covalentemente directamente al grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de la insulina lispro. Más preferentemente, la insulina lispro mono-PEGilada comprende un PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 unido al grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de la insulina lispro y la PEG-LysB28-insulina lispro se caracteriza por tener una semivida de eliminación mayor de aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 40 horas, o aproximadamente 42 horas en un ser humano tras la administración de una única dosis subcutánea de la composición a 0,225 mg/kg.

En el presente documento se describen composiciones que comprende una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilados en los que la unión del PEG se produce en sitios diferentes y/o una mezcla de de insulina lispro mono-PEGilados, di-PEGilados y tri-PEGilados. Ejemplos de composiciones son aquéllos que comprenden más de un compuesto de insulina lispro PEGilado seleccionado del grupo que consiste en: i) PEG-GlyA1 I insulina lispro, ii) PEG-PheB1 insulina lispro, iii) PEG-LysB28 insulina lispro, iv) di-PEG-GlyA1PheB1-insulina lispro, v) di-PEG-GlyA1LysB28-insulina lispro, vi) di-PEG-PheB1LysB28-insulina lispro, y vii) di-PEG-GlyA1PheB1-insulina lispro. Más preferentemente, las composiciones comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilados en los que más de aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o aproximadamente 97 % de los compuestos de insulina lispro PEGilados son compuestos de insulina lispro mono-PEGilados de Fórmula I. Incluso Más preferentemente, las composiciones comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilados en los que más de aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o aproximadamente 97 % de los compuestos de insulina lispro PEGilados son compuestos de insulina lispro mono-PEGilados y menos de aproximadamente 20 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 5 %, o aproximadamente 3 % de los compuestos de insulina lispro PEGilados están di-PEGilados. Incluso más preferentemente, las composiciones comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilados en los que más de aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o aproximadamente 97 % de los compuestos de insulina lispro PEGilados son PEG-LysB28-insulina lispro. Incluso más preferentemente, las composiciones comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilados en los que más de aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o aproximadamente 97 % de los compuestos de insulina lispro PEGilados son PEG-LysB28insulina lispro y menos de aproximadamente 20 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 5 % o aproximadamente 3 % de los compuestos de insulina lispro PEGilados totales son PEG-GlyA1-insulina lispro. Incluso más preferentemente, las composiciones comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilados en los que más de aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o aproximadamente 97 % de los compuestos de insulina lispro PEGilados son PEG-LysB28insulina lispro, menos de aproximadamente 20 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 5 % o aproximadamente 3 % de los compuestos de insulina lispro PEGilados totales son compuestos de insulina lispro di-PEGilados. Incluso más preferentemente, las composiciones comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilados en los que aproximadamente el 80 % de los compuestos de insulina lispro PEGilados totales son PEG-LysB28-insulina lispro, aproximadamente el 10 % son PEG-GlyA1-insulina lispro y aproximadamente el 10 % es di-PEG-GlyA1LysB28-insulina lispro. Incluso más preferentemente, las composiciones comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilados en los que aproximadamente el 90 % o más de los compuestos de insulina lispro PEGilados totales son PEG-LysB28-



insulina lispro y aproximadamente el 5 % o menos son PEG-GlyA1-insulina lispro y aproximadamente el 5 % o menos es di-PEG-GlyA1LysB28-insulina lispro. Incluso más preferentemente, las composiciones comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilados en los que aproximadamente el 90% o más de los compuestos de insulina lispro PEGilados totales son PEG-LysB28-insulina lispro, aproximadamente el 5% o menos son PEG-GlyA1-insulina lispro, aproximadamente el 5% o menos es di-PEG-GlyA1LysB28-insulina lispro, y en las que PEG-LysB28-insulina lispro se caracteriza por tener una semivida de eliminación superior a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 40 horas, o aproximadamente 42 horas en un ser humano tras la administración de una única dosis subcutánea de la composición a 0,225 mg/kg. Lo más preferentemente, las composiciones comprende una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilados, en los que aproximadamente el 95 % o más de los compuestos de insulina lispro PEGilados totales son PEG-LysB28-insulina lispro, aproximadamente el 5% o menos es PEG-GlyA1-insulina lispro y la PEG-LysB28-insulina lispro se caracteriza por tener una semivida de eliminación superior a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 36, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 40 horas, o aproximadamente 42 horas en un ser humano tras la administración de una única dosis subcutánea de la composición a 0,225 mg/kg.

El término "condiciones básicas", como se usa en el presente documento, se refiere a la basicidad de la reacción de PEGilación. Par PEGilar más selectivamente la insulina lispro en la lisina en la posición 28 de la cadena B de la insulina lispro, la reacción deberá llevarse a cabo con los grupos alfa-amino de la insulina lispro desprotonados sustancialmente. En un disolvente o co-disolvente acuoso, condiciones básicas significa que la reacción se lleva a cabo a un pH superior a 7,0. Preferentemente, la reacción de PEGilación se realiza a un pH de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 11,5. En un disolvente orgánico, la reacción se lleva a cabo en presencia de una base con una basicidad equivalente a una pKa superior o igual a 10,75 en agua.

La presente invención también incluye un procedimiento de fabricar un compuesto de insulina lispro PEGilado de la fórmula:

P-[(A)-(B)], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

A es la cadena A de la insulina lispro (SEC ID N° 1);

B es la cadena B de la insulina lispro (SEC ID N° 3); y

P es un PEG que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 40 kDa, y en el que A y B están reticulados adecuadamente y P está unida a través de un enlace covalente de uretano al grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de B que comprende hacer reaccionar el grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de B con monometoxipoli (etilenglicol) p-nitrofenilcarbonato (mPEG-NPC) que tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 40 kDa en un disolvente acuoso a un pH entre aproximadamente 8,5 y aproximadamente 11,5 y a una temperatura de reacción entre aproximadamente 25° C y aproximadamente 30° C. Preferentemente, el pH de la reacción se mantiene entre aproximadamente 10,5 y aproximadamente 11,1, la reacción de pegilación se realiza a una temperatura entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 30°C durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 2 y aproximadamente 12 horas, y la proporción de mPEG-NPC e insulina lispro está en el intervalo entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 5,0. Más preferentemente, la proporción molar media de PEG-NPC es de aproximadamente 20 kDa, el pH de la reacción se mantiene entre aproximadamente 10,5 y aproximadamente 11,1, la reacción de pegilación se realiza a una temperatura entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 30°C durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 2 y aproximadamente 12 horas, y la proporción de mPEG-NPC e insulina lispro está en el intervalo entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 5,0. Incluso más preferentemente, la proporción molar PEG:insulina lispro molar está en el intervalo entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 4,5, el peso molecular promedio en peso de mPEG-NPC es de aproximadamente 20kDa, el pH de la reacción de pegilación se mantiene entre aproximadamente 10,5 y aproximadamente 11,1, la temperatura de la pegilación se mantiene entre aproximadamente 25° C y aproximadamente 30° C durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6 horas. Más preferentemente, la proporción molar PEG:insulina lispro molar está en el intervalo entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 4,5, el peso molecular promedio en peso de mPEG-NPC es de aproximadamente 20kDa, el pH de la reacción de pegilación se mantiene entre aproximadamente 10,5 y aproximadamente 11,0, la temperatura de la reacción se mantiene entre aproximadamente 25° C y aproximadamente 30° C durante aproximadamente 3 horas.

Si se desea, los compuestos de insulina lispro PEGilados de la presente invención que tienen diferentes pesos moleculares se pueden aislar usando varias técnicas conocidas para el experto en la técnica, incluidas, entre otras, filtración en gel, cromatografía y/o cromatografía de intercambio iónico. Es decir, la cromatografía de filtración en gel se puede usar para fraccionar los compuestos de insulina lispro mono-PEGilados, di-PEGilados y tri-PEGilados en base a sus diferentes pesos moleculares (en los que la diferencia corresponde esencialmente al peso molecular promedio del PEG usado en la reacción de PEGilación). Por ejemplo, en una reacción de ejemplo en la que la insulina lispro se conjuga con un mPEG activado que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa, la mezcla de reacción resultante puede contener insulina lispro sin modificar que tiene un peso molecular de

aproximadamente 5,808 Dalton, insulina lispro mono-PEGilada que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 25,808 Dalton, insulina lispro di-PEGilada que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 45,808 Dalton kDa e insulina lispro tri-PEGilada que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 65,808 Dalton. No obstante, dado que las técnicas en filtración en gel separan compuestos en base al tamaño hidrodinámico, la insulina lispro mono-PEGilada conjugada con un mPEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa migrará durante la filtración en gel como una proteína de aproximadamente 82 kDa a pesar de tener un peso molecular promedio de aproximadamente 25,808 Dalton. Un experto en la técnica se esperaría que una especie di y tri-PEGilada pegilada con un mPEG de peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa tuviera una migración muy diferente o tiempos de retención que permitieran su purificación y/o cuantificación.

La expresión "semivida en plasma" se refiere al tiempo necesario para que la concentración plasmática del fármaco en el cuerpo caiga a la mitad. Una alternativa usada es "semivida de eliminación", que corresponde a la velocidad de eliminación log-lineal terminal. Los expertos en la técnica apreciarán que la semivida es un parámetro derivado que cambia como función del aclaramiento y del volumen de distribución. Los términos "extendido", "prolongado" o "amentado" usados en el contexto de semivida en plasma o semivida de eliminación se usan de forma intercambiable en el presente documento y se pretende que indiquen que existe un incremento estadísticamente significativo en la semivida de un compuesto de ensayo (p. ej., una insulina lispro PEGilada) respecto a la de la molécula de referencia (p. ej., la insulina lispro), como se determina en condiciones comparables.

El aclaramiento es la medida de la capacidad del cuerpo para eliminar un fármaco. A medida que el aclaramiento disminuye debido a, por ejemplo, modificaciones en un fármaco, cabría esperar que la semivida aumentara. No obstante, esta relación recíproca sólo es exacta cuando no hay cambios en el volumen de distribución. Una relación aproximada útil entre la semivida terminal log-lineal ( $t_{1/2}$ ), el aclaramiento (CL) y el volumen de distribución (V) viene dada por la ecuación:  $t_{1/2} \sim 0,693 (V/CL)$ . El aclaramiento no indica cuánto fármaco se está eliminando sino el volumen de fluido biológico, como sangre o plasma, que tendría que estar completamente libre de fármaco para representar la eliminación. El aclaramiento se expresa en forma de volumen por unidad de tiempo.

Los términos "tratamiento" y "tratar", como se usan en el presente documento, se refieren a la gestión y la atención de un paciente que tiene diabetes o hiperglucemia y otra afección para la cual está indicada la administración de insulina con el fin de combatir o aliviar los síntomas y las complicaciones de dichas afecciones. Tratar incluye administrar compuestos o composiciones de la presente invención para prevenir el inicio de los síntomas o complicaciones, aliviar los síntomas o complicaciones o eliminar la enfermedad, afección o trastorno. Preferentemente, el paciente que se va a tratar es un mamífero, en particular un ser humano.

Los compuestos de insulina lispro PEGilados de Fórmula I usados en la presente invención son eficaces en el tratamiento de la hiperglucemia administrando a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de Fórmula I. Como se usa en el presente documento, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto de insulina lispro PEGilados de Fórmula I o composiciones del mismo suficiente para regular la glucosa en sangre en un paciente. Preferentemente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de insulina lispro PEGilado de Fórmula I es de aproximadamente 0,01 nmol/kg a aproximadamente 100 nmol/kg. Más preferentemente, una cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 nmol/kg. Incluso más preferentemente, una cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 nmol/kg. Incluso más preferentemente, una cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 nmol/kg. Incluso más preferentemente, una cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 7,5 nmol/kg. Incluso más preferentemente, una cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 nmol/kg. Más preferentemente, una cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 nmol/kg. No obstante, debe entenderse que la cantidad de un compuesto de insulina lispro PEGilado o de una composición que comprende uno o más compuestos de insulina lispro PEGilado realmente administrada será determinada por un profesional médico a la luz de las circunstancias relevantes, incluía la afección que se está tratando (es decir, la causa de la hiperglucemia), la especie concreta de la especie de insulina lispro PEGilada o la mezcla concreta de compuestos de insulina lispro PEGilados, otros fármacos, insulinas que se van a administrar o, de otro modo, co-administrar, la vía de administración parenteral escogida, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual y la gravedad de los síntomas del paciente. Por tanto, con los intervalos de dosificación anteriores no se pretende limitar el alcance de la invención de ningún modo.

La frase "suficiente para regular la glucosa en sangre" significa que la administración de un compuesto o composición a un paciente tiene como resultado un nivel de glucosa en sangre en ayunas normal. Un nivel de glucosa en sangre en ayunas clínicamente normal es de 70-110 mg/dl. Un nivel de glucosa plasmática posprandial clínicamente normal es inferior a 140 mg/dl.

Después del almacenamiento se sabe que se producen cambios químicos covalentes en la estructura de la insulina. Esto puede conducir a la formación de moléculas que son menos activas y potencialmente inmunogénicas, tales como productos de desamidación y productos de transformación de peso molecular más alto (p. ej., dímeros, oligómeros, polímeros). Un estudio exhaustivo de la estabilidad química de la insulina se proporciona en "Stability of Insulin", Kluwer Academic Publishers, 1994, de Jens Brange. La vida durante el almacenamiento de los productos de

insulina está comprometida principalmente por la formación de agregados solubles (dímeros, oligómeros y polímeros) en el tiempo, a pesar del hecho de que las composiciones de insulina normalmente se almacenan a una temperatura baja no superior a aproximadamente 2-8 °C, que mejora considerablemente la vida durante el almacenamiento en comparación con el almacenamiento a, por ejemplo, temperatura ambiente. Además, los productos de insulina están sujetos a la formación de agregados insolubles (fibrillas) como resultado de agitación, por ejemplo cuando los lleva el paciente en el bolsillo o durante el transporte. Es esencial para la calidad de un producto de insulina que la tendencia a formar dichos agregados solubles e insolubles como resultado de influencias químicas o físicas se reduce a un mínimo absoluto. Por tanto, las composiciones de insulina deben demostrar una estabilidad química y física aceptables con el fin de que se puedan usar terapéuticamente.

El término "estabilidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la estabilidad física y/o química de las formulaciones de los compuestos de insulina lispro PEGilados. Inestabilidad física de una formulación de insulina lispro puede deberse a la agregación de las moléculas proteicas para formar polímeros de mayor orden o incluso precipitados. Una formulación "estable" es una en la que el grado de agregación de las proteínas está aceptablemente controlado y no aumenta la inaceptabilidad con el tiempo. En ciertas realizaciones de la invención, la formulación de insulina lispro PEGilada se considera estable durante un periodo de tiempo determinado si el grado de agregación está dentro de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o 30 % del grado de agregación observado en el material de partida. En ciertas realizaciones de la invención, la formulación de insulina lispro PEGilada se considera estable durante un periodo de tiempo determinado si la actividad biológica del polipéptido es de al menos aproximadamente 99 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 % o 50 % de la actividad observada con el material de partida.

La expresión "estabilidad química", como se usa en el presente documento, se refiere a la tendencia de una composición de insulina lispro PEGilada para formar agregados proteicos solubles durante el almacenamiento en condiciones estáticas, incluido el almacenamiento a temperaturas bajas de aproximadamente 2-8 °C o a temperaturas elevadas de aproximadamente 20-40 °C. La estabilidad química de un compuesto de insulina lispro PEGilada de la invención se puede medir determinando las características analíticas en la formulación en condiciones específicas, tal como a unas condiciones de temperatura y humedad concretas en un determinado periodo de tiempo. Las características analíticas que se pueden medir incluyen la formación de especies de alto peso molecular usando, por ejemplo, HPLC de exclusión por tamaño. Los resultados se pueden monitorizar después y comparar contra parámetros previamente especificados.

La expresión "estabilidad física", como se usa en el presente documento, se refiere a la tendencia de una composición de insulina lispro PEGilada para formar agregados proteicos insolubles como resultado de una acción física, tal como agitando una composición de insulina lispro PEGilada. La estabilidad física de los compuestos de insulina lispro PEGilada de la invención tras el almacenamiento para un periodo de tiempo definido a varias temperaturas en varias formulaciones farmacéuticas se puede evaluar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, incluida la medición de la atenuación de luz aparente de la muestra (absorbancia o densidad óptica). Dicha medición de la atenuación de la luz se refiere a la turbidez de una formulación. La turbidez se produce mediante agregación o precipitación de proteínas o complejos en la formulación. Otros procedimientos para evaluar la estabilidad física son bien conocidos en la técnica, incluidas evaluaciones visuales de presencia o ausencia de partículas o mediante la detección de formación de fibrillas/geles mediante microscopia de fluorescencia T tioflavina.

Otras realizaciones de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un paciente, en particular a un ser humano, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de insulina lispro PEGilada de fórmula 1 y uno o más excipientes, diluyentes, tampones, iones metálicos o vehículos farmacéuticamente aceptables. Normalmente, dichas composiciones farmacéuticas son de naturaleza parenteral, aunque no necesariamente, y pueden prepararse mediante cualquiera de diversas técnicas usando excipientes, tampones, diluyentes, iones metálicos o vehículos convencionales para productos parenterales que son bien conocidos en la técnica.

Dado que los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención son muy hidrosolubles, una composición farmacéutica de la presente invención incluye una composición que comprende agua como disolvente principal, los compuestos de insulina lispro PEGilada a una concentración total de al menos 1 mg/ml, al menos 2 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 20 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 35 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 45 mg/ml, al menos 50 mg/ml, o mayor y un tampón farmacéuticamente aceptable, en el que la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,5. Preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención tiene un pH de aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,5. Más preferentemente, una composición farmacéutica de la invención comprende compuestos de insulina lispro PEGilada a una concentración total en el intervalo de aproximadamente 2,5 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml y un tampón en el que la composición tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,5. Más preferentemente, una composición farmacéutica de la invención comprende compuestos de insulina lispro PEGilada a una concentración total en el intervalo de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml y un tampón en el que la composición farmacéutica tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. Incluso más preferentemente, una composición farmacéutica de la invención comprende compuestos de insulina lispro PEGilada a una concentración total en el intervalo de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml y un tampón en el que la composición farmacéutica tiene

un pH en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. Incluso más preferentemente, una composición farmacéutica de la invención comprende compuestos de insulina lispro PEGilada a una concentración total en el intervalo de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml y un tampón en el que la composición farmacéutica tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5 o de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0. Incluso más preferentemente, una composición farmacéutica de la invención comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina. Incluso más preferentemente, la insulina es un análogo de la insulina. Incluso más preferentemente, el análogo de la insulina es un análogo de la insulina de acción rápida. Más preferentemente, el análogo de la insulina de acción rápida es insulina lispro.

El término "tampón" se refiere a una solución que resiste los cambios en el pH por acción de sus componentes de conjugado ácido-base. Preferentemente, los tampones usados son tampones farmacéuticamente aceptables. La frase "tampón farmacéuticamente aceptable" se refiere a una solución que es seguro usar en formulaciones de insulina y que tiene el efecto de controlar el pH de la composición farmacéutica al pH deseado. En realizaciones preferidas, el tampón tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,5. Más preferentemente, el tampón tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0. Tampones farmacéuticamente aceptables para controlar el pH de las composiciones de la presente invención en este intervalo incluyen, entre otros, agentes tales como tampones fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS e histidina, así como combinaciones de los mismos. "TRIS" se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-1,3,-propanodiol y a cualquier sal farmacológicamente aceptable del mismo. La base libre y la forma clorhidrato (es decir, TRIS-HCl) son dos formas frecuentes de TRIS. Tris también es conocido en la técnica como trimetilaminometano, trometamina y tris(hidroximetil)aminometano. Preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende tampón fosfato o TRIS de aproximadamente 2,5 mM a aproximadamente 50 mM. Más preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende tampón fosfato o TRIS de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM. Incluso más preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende tampón fosfato de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM. Incluso más preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende tampón fosfato de aproximadamente 5 mM. Incluso más preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende tampón TRIS de aproximadamente 7,5 mM a aproximadamente 50 mM. Incluso más preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende tampón TRIS de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM. Incluso más preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende tampón TRIS de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 20 mM. Más preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende tampón TRIS de aproximadamente 16 mM.

Los compuestos y composiciones de insulina lispro PEGilada de la invención se pueden formular de un modo análogo a las formulaciones conocidas de insulinas que se administran a los pacientes por vía parenteral. Dichas formulaciones son conocidas para el experto en la técnica. Preferentemente, los compuestos de insulina lispro PEGilada de fórmula I se formulan de un modo análogo a la formulación de insulina lispro HUMALOG® o Humulin®. Por tanto, una composición farmacéutica preferida de la presente invención puede comprender agua, un compuesto de insulina lispro PEGilada de Fórmula I, un agente de isotonicidad y un tampón farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, una composición farmacéutica de la invención comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. Más preferentemente, una composición farmacéutica de la invención comprende además un catión divalente tal como cinc y/o cobalto, que pueden facilitar la hexamerización de la insulina. Incluso más preferentemente, una composición farmacéutica de la invención comprende además al menos un agente de estabilización de hexámero. Además, para ajustar el pH se puede añadir ácido clorhídrico y/o hidróxido sódico.

Un "agente de isotonicidad" es un compuesto que es fisiológicamente tolerado e imparte una tonicidad adecuada a una formulación para prevenir el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con una composición farmacéutica administrada. El glicerol, que se conoce como glicerina, normalmente se usa como agente de isotonicidad. Otros agentes de isotonicidad incluyen i) otros alcoholes de azúcar, tales como, entre otros, manitol y sorbitol, ii) sales tales como, entre otras, NaCl, iii) monosacáridos, incluidos, entre otros, dextrosa, y iv) disacáridos, incluidos, entre otros, lactosa, sacarosa y trehalosa. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir uno o más agentes de isotonicidad. Preferentemente, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención tienen uno o más agentes de isotonicidad que producen una formulación con una isotonicidad en el intervalo de aproximadamente 270 y aproximadamente 330 mOsm. Más preferentemente el(los) agente(s) de isotonicidad es glicerol, sorbitol, sacarosa, NaCl, trehalosa, y/o manitol. Incluso más preferentemente el agente de isotonicidad es glicerol, sorbitol, sacarosa, NaCl y/o trehalosa. Incluso más preferentemente el glicerol, el sorbitol, la sacarosa, el NaCl o la trehalosa a una concentración de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 nM está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Incluso más preferentemente el glicerol a una concentración de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 nM está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Incluso más preferentemente el glicerol a una concentración de aproximadamente 150 a aproximadamente 180 nM está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Incluso más preferentemente el glicerol a una concentración de aproximadamente 130 a aproximadamente 175 nM está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Incluso más preferentemente el NaCl a una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 nM está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Incluso más preferentemente el NaCl a una concentración de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 nM está presente en las composiciones

farmacéuticas de la presente invención. Más preferentemente el NaCl a una concentración de aproximadamente 150 mM está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden también contener un compuesto estabilizante de hexámeros. Las frases "compuesto estabilizante de hexámeros" se refiere a u compuesto no proteináceo de bajo peso molecular que estabiliza los compuestos de insulina lispro PEGilados de la presente invención en un estado de asociación hexamérica. Iones de calcio, de cinc, cobalto, cobre, níquel, hierro, magnesio, manganeso, aniones, particularmente cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato y compuestos fenólicos, particularmente fenol, conservantes fenólicos, resorcinol, 4'-hidroxiacetanilida, 4-hidroxibenzamida y 2,7-dihidroxi-naftaleno son conocidos compuestos estabilizantes de hexámero para moléculas de insulina. Preferentemente, el compuestos estabilizante de hexámero es fenol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, metilparaben, calcio, cloruro, o una combinación de dos o más de estos compuestos. Más preferentemente, el compuestos estabilizante de hexámero es fenol, m-cresol, calcio, cloruro, o una combinación de los mismos. Preferentemente, una composición farmacéutica de la invención comprende calcio entre aproximadamente 1 mM y 75 mM, calcio entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 50 mM, calcio entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 25 mM, calcio entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 25 mM, calcio entre aproximadamente 2,5 mM y aproximadamente 30 mM, calcio entre aproximadamente 2,5 mM y aproximadamente 15 mM, calcio entre aproximadamente 2,5 mM y aproximadamente 10 mM, calcio entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 30 mM, calcio entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 15 mM. Más preferentemente, una composición farmacéutica de la invención comprende calcio entre aproximadamente 2,5 mM y 10 mM.

20 Las formulaciones multiuso de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden también contener un conservante. El término "conservante" se refiere a un compuesto añadido a una formulación farmacéutica para actuar como agente antimicrobiano. Entre los conservantes conocidos en la técnica como eficaces y aceptables en formulaciones parenterales son cloruro de benzalconio, bencetonio, clorohexidina, fenol, m-cresol, alcohol bencílico, metilparaben, propilparaben, clorobutanol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, nitrato fenilmercurio, timerosal, ácido benzoico y varias mezclas de los mismos. Se sabe que ciertos conservantes fenólicos, tales como metilparaben, fenol y m-creso, se unen a la insulina y a moléculas de tipo insulina, y, de este modo, inducen cambios conformacionales que aumentan su estabilidad física o química, o ambos (véase, por ejemplo, Birnbaum, D. T., y col., Pharmaceutical. Res. 14:25-36 (1997); Rahuel-Clermont, S., y col., Biochemistry 36: 5837-5845 (1997)). "Conservante fenólico" incluye los compuestos fenol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, metilparaben y mezclas de los mismos. El conservante usado en las formulaciones de los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención puede ser un conservante fenólico y puede ser el mismo, o diferente, del compuesto estabilizante de hexámeros. Preferentemente, el conservante fenólico es m-cresol o fenol. Más preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende fenol y/o m-cresol a una concentración de aproximadamente 0, 1 a aproximadamente 75 mM como conservante a un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente pH 8,0. Incluso más preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende fenol y/o m-cresol a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 mM como conservante a un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente pH 8,0. Incluso más preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende fenol y/o m-cresol a una concentración de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 mM como conservante a un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente pH 8,0. Incluso más preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende fenol y/o m-cresol a una concentración de aproximadamente 30 mM a un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente pH 8,0. Lo más preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende fenol y/o m-cresol a una concentración de aproximadamente 30 mM a un pH de aproximadamente 7,3 a aproximadamente pH 7,5.

45 Como se ha mencionado anteriormente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender cationes de metales divalentes, tales como cinc o cobalto que impulsan la hexamerización de insulina o, de otro modo, estabilizan los compuestos de insulina. "Cation de metal divalente" significa el ion o iones que participan para formar un complejo con una multiplicidad de moléculas de proteínas. Los metales de transición, los metales alcalinos y los metales alcalino-térreos son ejemplos de metales que se sabe que forman complejos con los compuestos de insulina. Se prefieren metales de transición. Preferentemente, el cation de metales divalentes es uno o más de los cationes seleccionados del grupo que consiste en cinc, cobre, cobalto, níquel, manganeos, calcio y hierro. Más preferentemente, el cinc es el cation de metales divalentes. Se sabe que el cinc facilita la formación de hexámeros de insulina y de diversos análogos y/o derivados de la insulina, incluida la insulina lispro. El papel principal de los cationes divalentes, tales como cinc o cobalto, en las composiciones farmacéuticas de la presente invención es facilitar la formación de hexámeros de los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención y/o cualquier otra insulina o análogo de insulina en una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina lispro PEGilada de la presente invención. En presencia de un conservante fenólico, la formación de hexámeros se puede facilitar llevando el pH de una solución que comprende composiciones farmacéuticas de la presente invención en la región neutra en presencia de iones de Zn(II) o añadiendo Zn(II) después de ajustar el pH en la región neutral. Preferentemente, la proporción entre el cinc y el compuesto de insulina, análogo de insulina o compuesto de insulina lispro PEGilada está en el límite inferior en aproximadamente 0,33, es decir dos átomos de cinc por hexámero de insulina, hexámero de análogo de insulina y/o hexámero de insulina lispro PEGilada. Más preferentemente, la proporción entre el cinc y el compuesto de insulina, el análogo de

insulina y/o el compuesto de insulina lispro PEGilada es de aproximadamente 0,33 a aproximadamente 0,67. Se puede usar todavía más cinc durante el proceso si un compuesto que compite con la proteína por la unión al cinc, tal como citrato o fosfato, está presente. Puede ser deseable más cinc que la cantidad necesaria para la hexamerización, para estimular con más fuerza la hexamerización, por ejemplo una proporción entre el cinc y el compuesto de insulina, análogo de insulina y/o el compuesto de insulina lispro PEGilada de aproximadamente 0,33 a aproximadamente 0,83. También puede estar presente en una composición farmacéutica de la presente invención un exceso de cinc por encima de la cantidad necesaria para la hexamerización y puede ser deseable mejorar la estabilidad química y física para mejorar la "capacidad de suspensión" y, posiblemente, extender más el tiempo-acción. Por otro lado, cantidades excesivas de cinc en tampones de citrato o fosfato podrían conducir a la precipitación de citrato de cinc o de fosfato de cinc, respectivamente, así como de insulina.

De acuerdo con la presente invención, puede haber cinc presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente 0,3 moles a aproximadamente 3 moles de insulina, análogo de insulina y hexámero de insulina lispro PEGilada. Más preferentemente, el cinc está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,3 moles a aproximadamente 1 mol de insulina total, análogo de insulina y hexámero de insulina lispro PEGilada. Incluso más preferentemente, el cinc está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,3 moles a aproximadamente 0,7 mol de insulina total, análogo de insulina y hexámero de insulina lispro PEGilada. Más preferentemente, el cinc está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,3 moles a aproximadamente 0,55 mol de insulina, análogo de insulina y hexámero de insulina lispro PEGilada. El compuesto de cinc que proporciona cinc para la presente invención puede ser cualquier compuesto de cinc farmacéuticamente aceptable. La adición de cinc a las preparaciones de insulina se conoce en la técnica, ya que son fuentes farmacéuticamente aceptables de cinc. Preferentemente el cinc se proporciona como una sal, tal como sulfato de cinc, cloruro de cinc, acetato de cinc, citrato de cinc, óxido de cinc o nitrato de cinc.

En una realización adicional de la invención, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además uno o más tensioactivos. El término "tensioactivo", como se usa en el presente documento, incluye agentes que reducen la tensión superficial de un líquido mediante adsorción en la interfaz aire-líquido. Ejemplos de tensioactivos incluyen, sin limitaciones, tensioactivos no iónico, tales como polisorbatos (p. ej., polisorbato 80 o polisorbato 20); poloxámeros (p. ej., poloxámero 188); Triton™ (p. ej., Triton™ X-100); polietilglicol; polipropilglicol; y copolímeros de etilen y propilenglicol (p. ej., pluronics, PF68). Por ejemplo, el tensioactivo puede estar presente en una composición farmacéutica de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,001-0,5 %, por ejemplo de aproximadamente 0,05-0,3 %. Preferentemente, el tensioactivo usado en la composición farmacéutica de la presente invención es poloxámero 188. Más preferentemente, el tensioactivo es poloxámero 188 a una concentración entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 10 mg/ml, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg/ml, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 mg/ml, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10 mg/ml, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10 mg/ml, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 mg/ml, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 mg/ml, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 mg/ml y entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5 mg/ml.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina lispro PEGilado de la presente invención para uso en el tratamiento de la hiperglucemia y/o la diabetes, preferentemente en seres humanos.

La invención también proporciona una composición farmacéutica de un compuesto de insulina lispro PEGilado de la presente invención para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hiperglucemia y/o la diabetes, preferentemente en seres humanos.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden insulina lispro PEGilada de acuerdo con la presente invención se pueden administrar por vía parenteral a pacientes que necesiten dicho tratamiento. La administración parenteral se puede realizar por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, por medio de una jeringuilla, opcionalmente una jeringuilla de tipo lápiz, o un inyector mecánico. Como alternativa, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión.

#### Preparación 1

##### GlyA1-HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-insulina lispro (3) y LysB28-HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-insulina lispro (4)

Un mol de cada Trt-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OH, N-hidroxisuccinimida (NHS) y diisopropilcarbodiimida (DIC) se mezcla en 2 ml de DMF durante 30 minutos para preparar el éster de Trt-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-NHS. Un décimo mmol de insulina lispro se disuelve en 10 ml de trietilamina al 5 % (TEA) en DMSO. A la solución se añaden 0,2 mmol de Trt-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-NHS activada. Tras 2 horas a temperatura ambiente se añaden 0,2 ml de etanolamina para terminar la reacción. Después, la mezcla de reacción se diluye con 90 ml de H<sub>2</sub>O y se aplican a una columna RP-C18 para purificación. Las fracciones deseadas de LysB28-Trt-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-insulina lispro (2) se combinan y se liofilizan. Por separado, las fracciones deseadas de GlyA1-Trt-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-insulina lispro (1) se combinan y se liofilizan. Un décimo mmol de (1) o (2) se disuelve en 5 ml de TFA que contienen 0,2 ml de tioanisol y 0,4 ml de triisopropilsilano. Tras 30 minutos se elimina el TFA mediante evaporación y el péptido residual se suspende en 50 ml de ACN al 10 % en H<sub>2</sub>O. La solución resultante se aplica a una columna RP-C18 para purificación. Las fracciones deseadas de (3) o (4) se

combinan y, opcionalmente, se liofilizan.

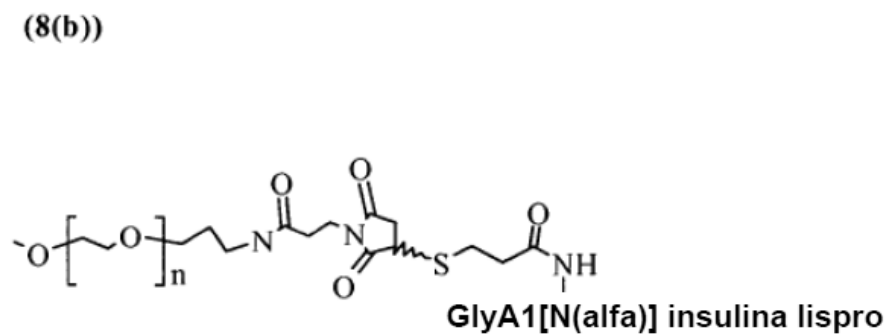
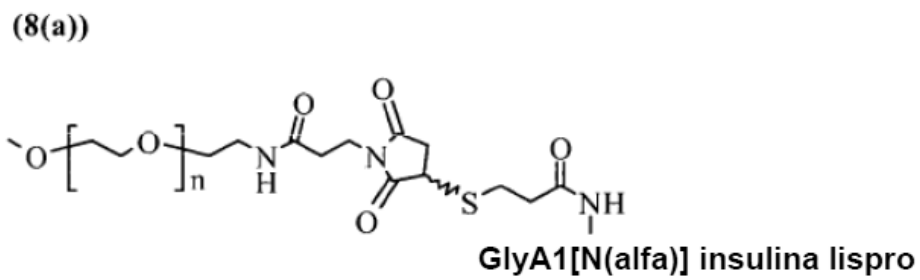
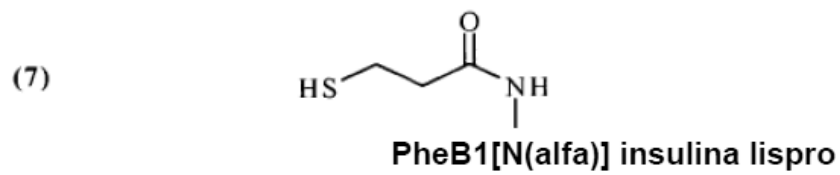
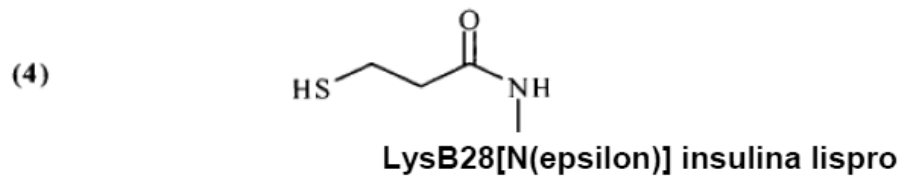
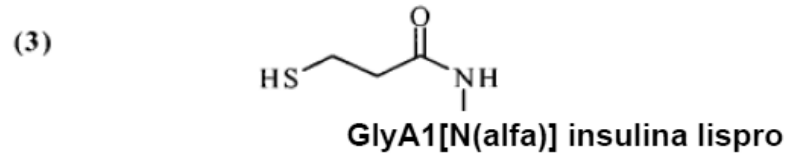
## Preparación 2

### PheB1-HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-insulina lispro (7)

5 Un décimo mmol de insulina lispro se disuelve en 10 ml de TEA al 5 % en DMSO. A la solución se añaden 0,2 mmol de di-terc-butilcarbonato en DMSO. Tras 1 hora a temperatura ambiente se añaden 0,2 ml de etanolamina para terminar la reacción. Después, la mezcla de reacción se diluye con 90 ml de H<sub>2</sub>O y se aplican a una columna RP-C18 para purificación. Las fracciones deseadas de Boc-GlyAl, Boc-LysB28-insulina lispro se combinan y se liofilizan para dar (5). Un décimo mmol de (5) se disuelve en 10 ml de TEA al 5 % en DMSO. A la solución se añaden 0,2 mmol de Trt-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-NHS activada. Tras 2 horas a temperatura ambiente se añaden 0,2 ml de etanolamina para terminar la reacción. Después, la mezcla de reacción se diluye con 90 ml de H<sub>2</sub>O y se aplican a una columna RP-C18 para purificación. Las fracciones deseadas se combinan y se liofilizan para dar Trt-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-PheB1, Boc-GlyA1, Boc-LysB28-insulina lispro (6). Un décimo mmol de (6) se disuelve en 5 ml de TFA que contienen 0,2 ml de tioanisol y 0,4 ml de triisopropilsilano. Tras 30 minutos se elimina el TFA mediante evaporación y el péptido residual se suspende en 50 ml de ACN al 10 % en H<sub>2</sub>O. La solución resultante se aplica a una columna RP-C18 para purificación. Las fracciones deseadas se combinan y liofilizan para dar (7).

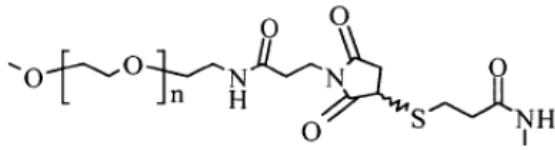
### **Ejemplo 1: PEGilación de intermedios de insulina lispro derivados de tiol**

20 Monometoxi-PEG-MAL que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa (b), 30 kDa (a), 40 kDa (a), o 60 kDa (c) se disuelve en una mezcla 1:1 de tampón NH<sub>4</sub>Ac 100 mM (pH 4,69) y ACN. A la solución se añade un polvo liofilizado de una insulina lispro tioderivada, por ejemplo el compuesto (3), (4), o (7). A la reacción le puede seguir RP-HPLC analítica. Cuando la reacción ha finalizado (normalmente tras aproximadamente 4 horas), la mezcla se diluye con H<sub>2</sub>O y se aplican a una columna RP-HPLC para purificación. Las fracciones deseadas se combinan y liofilizan para dar los compuestos insulina lispro PEGilados. Ejemplos de compuestos insulina lispro PEGilados preparados como se describe en el Ejemplo 1 se muestran más adelante como (8(a)), (8(b)), (9(a)), (9(b)), (10(a)), (10(b)), y (15(c)). Preferentemente, estos compuestos insulina lispro PEGilados tendrán n en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 1000. Más preferentemente, estos compuestos insulina lispro PEGilados tendrán n en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 750. Más preferentemente, estos compuestos insulina lispro PEGilados tendrán n en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 550. Incluso más preferentemente, estos compuestos insulina lispro PEGilados tendrán n en el intervalo de aproximadamente 400 y aproximadamente 500. Incluso más preferentemente, estos compuestos insulina lispro PEGilados tendrán n en el intervalo de aproximadamente 450 y aproximadamente 500. Más preferentemente, estos compuestos insulina lispro PEGilados tendrán n de aproximadamente 450.



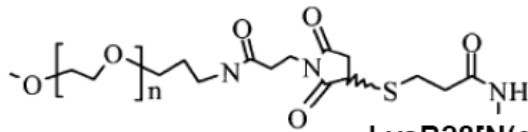


**(9(a))**



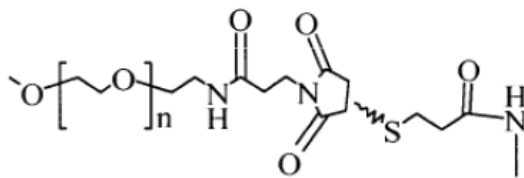
**LysB28[N(epsilon)] insulina lispro**

**(9(b))**



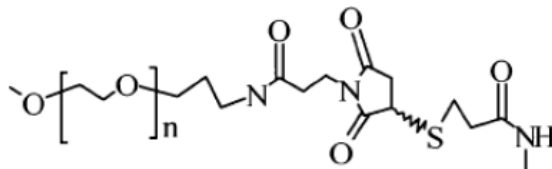
**LysB28[N(epsilon)] insulina lispro**

**(10(a))**



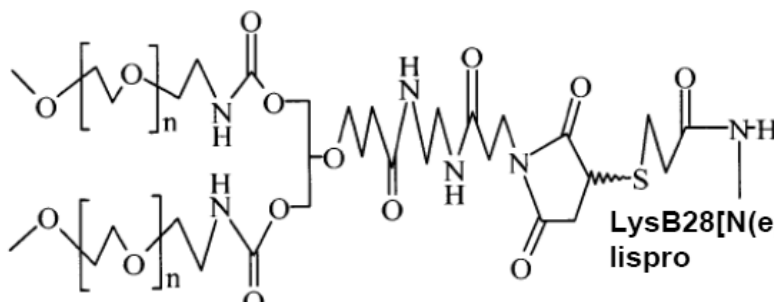
**PheB1[N(alfa)] insulina lispro**

**(10(b))**



**PheB1[N(alfa)] insulina lispro**

**(15(c))**

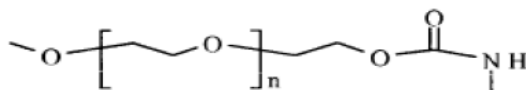
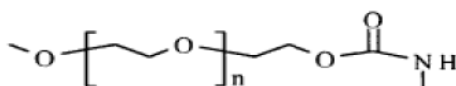
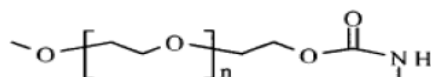
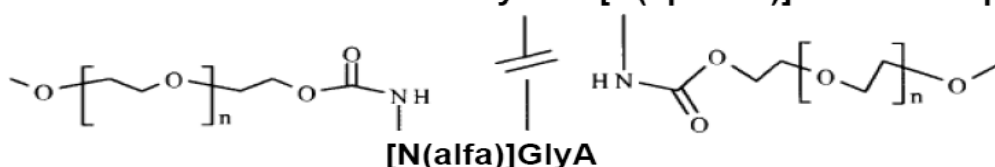


**LysB28[N(epsilon)] insulina lispro**

**Ejemplo 2: PEGilación de insulina lispro usando carbonato de monometoxipoli(etilenglicol) p-nitrofenilo (mPEG-NPC)**

Un décimo de mmol de insulina lispro se disuelve en 20 ml de tampón borato 0,2 M, pH 10,5 y a la solución se añaden 1,98 g de mPEG-NPC que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa en 20 ml de ACN con agitación enérgica. La reacción se monitoriza mediante RP-HPLC y SEC. Tras aproximadamente 4 horas, la mezcla de reacción se acidifica hasta un pH de 5-7 usando ácido acético y se aplica sobre una columna RP-HPLC para purificación. Las fracciones deseadas se combinan y liofilizan para dar PEG20K-insulina lispro mono-PEGilados en un rendimiento que varía de 20 a 45 %. La identidad y la pureza se confirman mediante RP-HPLC, SEC, y MALDI-MS. La proporción de mPEG unido a la cadena A o la cadena B se determina mediante las integraciones en el área de la cadena A o la cadena B libres liberadas tras el tratamiento del conjugado resultante con tris(2-carboxietil) fosfina clorhidrato (TCEP). La proporción entre mPEG-NPC e insulina lispro determina la distribución del producto de especies mono-PEGiladas y di-PEGiladas. El pH de la reacción dirige la especificidad de sitio de la PEGilación. A medida que el pH aumenta de aproximadamente 8 a aproximadamente 12, el compuesto **(11)** se convierte en el producto principal. Cuando la reacción se lleva a cabo a pH 10,5 con mPEG-NPC de peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa (n es de aproximadamente 450), la proporción de **(11)** a **(12)** es de aproximadamente 85:15.

La reacción de PEGilación descrita anteriormente también se puede realizar en una solución acuosa no tamponada manteniendo el pH de la mezcla de reacción mediante adición continua de NaOH 0,2M. Cuando se realiza en una solución acuosa no tamponada usando mPEG-NPC que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa mientras el pH se mantiene a aproximadamente pH 11,5, los productos de la reacción de PEGilación incluyen **(11)** y **(12)** en una proporción de aproximadamente 92,8. Preferentemente, el compuesto **(11)** tendrá n en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 750. Incluso más preferentemente, el compuesto **(11)** tendrá n en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 550. Incluso más preferentemente, el compuesto **(11)** tendrá n en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 500. Incluso más preferentemente, el compuesto **(11)** tendrá n en el intervalo de aproximadamente 450 a aproximadamente 500. Más preferentemente, el compuesto **(11)** tendrá n de aproximadamente 450.

**(11)****LysB28[N(epsilon)] insulina lispro****(12)****GlyA1[N(alfa)] insulina lispro****(13)****PheB1[N(alfa)] insulina lispro****(14)**

**Ejemplo 3: Afinidad por el receptor *in vitro***

Los ensayos de unión al receptor se realizan con membranas P1 preparadas a partir de células 293 EBNA HEK transfeccionadas de forma estable que sobreexpresan el receptor de la insulina humana (hIR) o el receptor de IGF-1 humano (hIGF-1R). Las afinidades de unión se determinan a partir de un ensayo competitivo de unión a radioligando usando (3-[<sup>125</sup>I]yodotirosil A<sup>14</sup>)-Insulina recombinante humana (2000 Ci/mmol) o el factor 1 de crecimiento similar a la insulina-[<sup>125</sup>I] recombinante humano. El ensayo se realizó con un procedimiento SPA usando aglutinina de germen de trigo de tipo A tratado con PEI de PVT acoplada a perlas de SPA. El tampón de ensayo de SPA (TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, BSA al 0,1 %) se usó para todas las preparaciones de reactivo. Se preparan tres diluciones en serie de compuestos (100 nM a 2 pM) en tampón de ensayo usando un robot Freedom/Evo (Tecan) y se añaden a microplacas de fondo transparente de cinta blanca de 96 pocillos (Corning/Costar) con una Multimek (Beckman Coulter). EL radioligando, las membranas y las perlas de SPA se añaden usando un instrumento multigotas (Titertek). Tras una incubación de 10 horas a temperatura ambiente, la radioactividad se determina usando un contador de centelleo Microbeta Trilux. En cada experimento se incluyen insulina lispro sin marcar e IGF-1 sin marcar como controles positivos y negativos, respectivamente. Los valores de CI<sub>50</sub> se determinan mediante análisis de regresión no lineal logístico de 4 parámetros. La constante de afinidad (K<sub>i</sub>) se calcula a partir del valor de CI<sub>50</sub> en base a la ecuación  $K_i = CI_{50}/(1 + D/K_d)$ , en la que D es igual a la concentración de radioligando usada en el experimento y K<sub>d</sub> es igual a la constante de afinidad en el equilibrio del radioligando determinada a partir de ensayos de unión de saturación (K<sub>d</sub> para hIR e hIGF-1R es 0,124 y 0,130 nM, respectivamente). La K<sub>i</sub> media geométrica indicada más adelante es 10<sup>^(K<sub>i</sub> log media)</sup>, en la que K<sub>i</sub> log media= Promedio (K<sub>i</sub>1+ K<sub>i</sub>2 + K<sub>i</sub>3 ...K<sub>i</sub>n) y el número de experimentos independientes (n) es superior a dos. No obstante, como se indica más adelante con respecto al IGF-1 humano, n es dos.

Los siguientes compuestos insulina lispro PEGilados preparados como se ha descrito en el Ejemplo 1 tienen una K<sub>i</sub> media geométrica inferior a 30 nM en el ensayo de unión de hIR descrito anteriormente. compuesto 10(a) preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, compuesto 8(a) preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, compuesto 15(c) preparado usando mPEG-MAL bifurcado que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 60 kDa, compuesto 9(a) preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30 kDa, compuesto 9(a) preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, y compuesto 9(b) preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa. En los ensayos de unión hIR e hIGFR, el compuesto 9(a) preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa tiene una K<sub>i</sub> media geométrica de 3,07 nM ± 0,32 nM ( ± S.E.M; n = 6) y mayor que 84.3 nM (SEM = no determinada; n=6), respectivamente. Adicionalmente, los productos de insulina lispro PEGilados heterogéneos generados como se ha descrito en el Ejemplo 2 usando una mPEG-NPC lineal de 40, 30 o 20 kDa tienen una K<sub>i</sub> media geométrica inferior a 30 nM en el ensayo de unión de hIR descrito anteriormente. En el ensayo de unión de descrito anteriormente, la insulina lispro tiene una K<sub>i</sub> media geométrica de 0,22 ± 0,072 nM ( ± SEM; n = 4). En el ensayo de unión de hIGFR, todos los compuestos mencionados anteriormente tienen una K<sub>i</sub> media geométrica superior a 75 nM y el IFG-1 humano tiene una K<sub>i</sub> media geométrica de 1,51 ± 0,23 nM ( ± SEM; n = 2).

Estos datos muestran que PEGilar la posición B28 reduce la afinidad de hIR en aproximadamente 10 veces, lo que hace de estas especies PEGiladas de insulina lispro débiles agonistas del hIR. La especie de insulina lispro PEGilada tampoco posee propiedades de unión a IGFR-1 mensurables en este ensayo en estas condiciones.

**Ejemplo 4: Evaluación de la potencia de la insulina lispro PEGilada usando un ensayo en células enteras de fosforilación del receptor de la insulina**

Los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención se pueden evaluar por su actividad funcional usando DELFIA®, un procedimiento heterogéneo de ensayo fluorométrico resuelto en el tiempo disponible comercialmente (Perkin-Elmer). Brevemente, las células 293HEK que sobreexpresan el receptor de la insulina humana se someten a tripsinización a 60.000 células/pocillo de placas Costar de cultivo tisular de 96 pocillos con media área revestida con poli-D-lisina en medio sin suero (SFM), DMEM con BSA al 0,1 % sin ácidos grasos). Las placas de cultivo celular se incuban durante la noche a 37 °C en un incubador con 37° de CO<sub>2</sub>. También se preparan placas con mAb 8314 anti-cadena A del receptor de la insulina la noche antes de usar la placa de microtitulación de 96 pocillos con ½ área de color negro, se tratan durante la noche a 4 °C con 30 µl de mAb 8314 anti-cadena A del receptor de la insulina (Soos, M.A., y col. Biochem J 235:199-208 (1986); disponible comercialmente en Abcam, Inc., Cambridge, MA), diluidos a 1 µg/ml en carbonato sódico 10mM. Las placas de captura del mAb 8314 se lavan cuatro veces con TRIS 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween (TBST) al 0,1 % para eliminar todo el mAb 8314 no unido. La placa e captura con mAb 8314 se bloquea después más de 1 hora a 4 °C con BSA al 1 % en TBST. Después de bloquear, la placa de captura se lava dos veces con TBST para eliminar el exceso de solución BSA. Una vez que la placa de captura está en el tampón de bloqueo, las placas de cultivo celular se retiran del incubador y se equilibran a temperatura ambiente. Los compuestos de ensayo se diluyen en serie en SFM. Para estimular la autofosforilación del receptor de insulina se añaden 50 µl del agente de ensayo diluido a la monocapa celular. Tras 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detiene aspirando los compuestos de ensayo y añadiendo de nuevo 50 µl de un tampón de lisis 2x (NP<sub>4</sub>O al 2 %, TRIS 100 mM pH 7, 4, NaCl 300 mM, inhibidores de proteasa Roche Complete™ con EDTA y vanadato 4 mM). Tras 30 minutos en tampón de lisis a temperatura ambiente, 30 µl del

lisado se transfieren a la placa de captura bloqueada que contiene 30  $\mu$ l de anticuerpo PT20 Europeo-N1-anti-fosfotirosina, Eu-N1-PY20 (Perkin Elmer), diluido a 50 ng/ml en Hepes 10 mM, NaCl 140 mM y Tween al 0,1 %. Esta mezcla se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, seguida de 6 lavados con TBST para eliminar el Eu-N1-PY20 sin unir y el lisado celular. Tras incubación con 50  $\mu$ l de solución de potenciación (Perkin Elmer) durante 10 minutos con agitación intermitente a medida que la señal de desarrolla. El receptor fosforilado de la insulina se cuantifica usando un Wallac Victor con parámetros de fluorescencia de europio de resolución en el tiempo. El nivel de fosforilación se calcula como un % de la respuesta para una dosis máxima de estimulación de insulina (100 nM). Las potencias de los análogos de insulina se calculan como la dosis  $CE_{50}$  usando un ajuste de cuatro parámetros de la respuesta a la dosis. Los compuestos de insulina lispro PEGilados preparados como se describe en el Ejemplo 1 que tienen una  $CR_{50}$  inferior a 15 nM en el ensayo descrito en el Ejemplo 4 incluyen **10(a)** preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, **9(a)** preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, **9(a)** preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30 kDa, y **9(b)** preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa. En el ensayo descrito en el Ejemplo 4, el compuesto **9(a)** preparado usando un mPEG-MAL lineal tiene una  $CE_{50}$  de 10,88 nM. Los productos heterogéneos insulina lispro PEGilados generados como se describe en el Ejemplo 2 usando un mPEG-NPC lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40, aproximadamente 30 o aproximadamente 20 kDa también tiene una  $CE_{50}$  inferior a 15 nM en el ensayo descrito en el Ejemplo 4. Una mezcla de 50:50 y 70:30 del compuesto **8(a)** preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa y el compuesto **9(a)** reparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa también tienen una  $CE_{50}$  inferior a 15 nM en el ensayo descrito en el Ejemplo 4. En el mismo ensayo, la insulina humana y la insulina lispro tienen una  $CE_{50}$  de 2,3 y 0,7 nM, respectivamente.

Estos datos muestran que PEGilar la posición B28 reduce la actividad in vitro de hIR en aproximadamente 10-20 veces, lo que hace de estas especies PEGiladas de insulina lispro débiles agonistas del hIR. La especie de insulina lispro PEGilada tampoco posee propiedades de unión a IGFR-1.

#### **Ejemplo 5: Evaluación de la potencia in vivo y los perfiles farmacocinéticos de la insulina lispro PEGilada en un modelo de rata de diabetes de tipo 1**

Ratas macho Harlan Sprague de diez semanas de edad (Harlan, Indianapolis) de 250-280 g de peso reciben dosis intravenosas por la vena de la cola de 45 mg/kg de estreptozocotina (STZ) en ácido cítrico 0,5M a pH 4,5, tres días antes del inicio del estudio. Al principio del estudio se asigna a los animales a grupos en base a su peso corporal y su nivel de glucosa. Solo los animales con glucosa en sangre entre 400-550 mg/dl se incluyen en el estudio. Por la mañana del inicio del estudio, los animales reciben una sola inyección subcutánea del compuesto de ensayo a una de varias dosis predeterminadas. Periódicamente se extraen muestras de sangre por duplicado de la vena de la cola y se introducen en tubos que contienen EDTA disódico. Los niveles de glucosa en sangre se miden con un glucosímetro. Asimismo, el plasma se obtiene de las muestras de sangre de la vena y se usó un radioinmunoensayo de insulina disponible comercialmente para determinar los niveles del fármaco administrado en el plasma. Se calcula el área bajo la curva de glucosa en sangre-tiempo ( $mg \cdot h/dl$ ) para cada animal individual y se usa para una regresión logística de cuatro parámetros para determinar la  $DE_{50}$ . En este ensayo, el compuesto **9(a)** preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, el compuesto **9(a)** preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30 kDa y el compuesto **9(b)** preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa tiene una potencia ( $DE_{50}$ ) de 241, 138, y 69 nmol/kg, respectivamente, a partir de una curva típica de respuesta a la dosis. Adicionalmente, dichos compuestos pudieron reducir la glucosa en sangre en ratas tratadas con STZ hasta un nivel que es normal en esta cepa de ratas (100 mg/dl o menor) durante al menos 36 horas con una única inyección subcutánea de 568 nmol/kg. Por otro lado, la insulina detemir normaliza la glucosa en 5-6 horas en el ensayo anterior, con una única dosis de 568 nmol/kg.

Además de la evaluación de los parámetros farmacodinámicos, los valores medios del parámetro farmacocinético en ratas para los compuestos de ensayo se determinan usando la muestra de sangre duplicada. Los parámetros farmacocinéticos se calculan usando procedimientos independientes de modelo (WinNonlin Pro). Los valores de los parámetros farmacocinéticos resultantes muestran no linealidad como función de la dosis. El intervalo de valores notificado corresponde a los valores de los parámetros farmacocinéticos entre la dosis más alta analizada (568 nmol/kg) y la dosis más baja (5,6 nmol/kg).

Los resultados farmacocinéticas para el compuesto **9(b)** preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa indicaron un tiempo hasta la concentración máxima ( $T_{max}$ ) que varía de 6-12 horas, una tasa de aclaramiento aparente  $CL/F$  que varía de 0,05-0,14 L/h/kg, un volumen de distribución aparente ( $V/F$ ) que varía de 0,6-7,2 l/kg y una semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ) que varía 8,5-34,5 horas.

Los resultados farmacocinéticos para el compuesto **9(a)** preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30 kDa indicaron un  $T_{max}$  de 12 horas, un  $CL/F$  que varía de 0,05-0,13 L/h/kg, un  $V/F$  que varía de 0,6-7,2 l/kg y una  $t_{1/2}$  que varía 8,3-11,0 horas.

Los resultados farmacocinéticos para el compuesto **9(a)** preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso

molecular promedio de aproximadamente 40 kDa indicaron un  $T_{max}$  que varía de 12-24 horas, un CL/F que varía de 0,06-0,2 L/h/kg, un V/F que varía de 1,0-7,2 l/kg y una  $t_{1/2}$  que varía 11,1-48,5 horas.

Cuando se administra de forma similar insulina lispro a ratas macho tratadas con STZ a 568 nmol/kg, se mide una  $t_{1/2}$  de aproximadamente 1 h y un CL/F de aproximadamente 1,2 L/h/kg.

- 5 Cuando se administra de forma similar insulina detemir a ratas macho tratadas con STZ a dosis variables de 18,9 a 568 nmol/kg, se observa una  $t_{1/2}$  que varía de 1,9-3,1 h y un CL/F de aproximadamente 0,8-1,7 l/h/kg.

Debido a las complejidades de la farmacocinética, las proporciones de CL aparente entre detemir y los compuestos de insulina lispro PEGilados son diferentes en función de la dosis usada para la determinación. No obstante, los estudios descritos en el Ejemplo 5 indican que los compuestos de insulina lispro PEGILADOS conjugados a PEG de 20- o 40 kDa tienen un aclaramiento aparente aproximadamente 5-30 veces más lento que detemir en ratas diabéticas inducidas con STZ.

#### **Ejemplo 6: Evaluación de la duración de acción in vivo y las características farmacocinéticas de la insulina lispro PEGilada en un modelo de rata de diabetes de tipo 2**

15 La actividad glucodinámica del compuesto **9(a)** con un PEG lineal de 40 kDa se evalúa en ratas macho ZDF fa/fa (n=4 ratas/grupo) tras una inyección subcutánea única de vehículo control (PBS) o 517 nmol/kg de **9(a)** preparadas usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa. Se recogen muestras en serie para caracterización farmacocinética y farmacodinámica. Una única administración subcutánea de 517 nmol/kg de **9(a)** preparada usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa en ratas ZDF macho fa/fa se asocia con una disminución estadísticamente significativa de la glucosa que se mantiene durante al menos siete días (respecto al placebo,  $p < 0,05$ ). El compuesto **9(a)** preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, la exposición es también verificable durante siete días.

#### **Ejemplo 7: Titulación del conservante fenólico de PEG-B28(92,4 %)/A1(7,6 %)-insulina lispro, insulina lispro, o una mezcla (70 % PEG<sub>20kDa</sub>-B28(92,4 %)A1(7,6 %)-insulina lispro:30 % insulina lispro) del mismo con fenol en presencia de iones de cobalto**

25 PEG<sub>20kDa</sub>-B28 (92,4%) A1 (7,6%) -insulina lispro o insulina lispro se disuelve en una solución que contiene KSCN 20mM y TRIS-ClO4 50 mM a pH 8, 0. La concentración diana para cualquier proteína es -4 mg/ml, en base al contenido proteico ( $\epsilon_{280} = 1,05$  (mg/ml)  $\cdot$  1cm<sup>-1</sup>). Se disuelve cloruro de cobalto (41.9 mg) con 1 ml de agua para dar una solución madre con una concentración de iones de cobalto de 0,176 M. A 0,8 ml de la solución de proteínas se añade una alícuota de la solución madre de cobalto (2  $\mu$ l dependiendo de la concentración de la proteína), de modo que la proporción molar final entre los iones de cobalto y el hexámero de insulina es igual a 4. Para evaluar la hexamerización se monitorizaron las distorsiones en la química de coordinación del cobalto a 574 nm en función de la concentración del conservante fenólico. Específicamente, una solución de fenol concentrado (0,564 M) se titula en 0,8 ml de solución proteica usando alícuotas de microlitros de modo que el volumen final de la titulación no supere los 0,84 ml. La solución final se agita durante un mínimo de 20 minutos tras cada alícuota de fenol y el espectro visible de la solución se recoge de 400 nm a 800 nm, La absorbancia registrada 574 nm se convierte en el coeficiente de extracción molar dividiendo la absorbancia por la concentración molar del cobalto coordinado con HisB10, es decir la concentración de la proteína hexamérica multiplicada por dos en base al conocimiento de que los restos HisB10 de hexámeros de insulina coordinan dos iones metálicos divalentes. Para la preparación de formulaciones de mezclas 70/30 (mol:mol) de PEG<sub>20kDa</sub>-B28(92,4 %)/A1(7,6 %)-insulina lispro e insulina lispro, la proteína se mezcla primero y después se añade cobalto, seguido de titulación con conservante fenólico.

35 En la insulina lispro, la secuencia natural de prolina en la posición B28 y de la lisina en la posición B29 se invierte en comparación con la insulina humana silvestre. Esta inversión conduce a un cambio conformacional en el extremo C-terminal de la cadena B que dificulta estéricamente la capacidad de los monómeros de insulina lispro para formar dímeros. Por tanto, la constante de la asociación del dímero se reduce por un factor de 300 en comparación con la de la insulina huma silvestre. Los resultados, mostrados en la Tabla 1, indican que PEG<sub>20kDa</sub>-B28(92,4 %)/A1(7,6 %)-insulina lispro puede, sorprendente e inesperadamente, asociarse como un complejo hexamérico en presencia de iones metálicos divalentes y análogos conservantes fenólicos en las condiciones de formulación usadas en Humalog®, a pesar de la presencia de seis restos PEG de 20 kDa conjugados cerca del ya debilitado dominio de dimerización de la insulina humana silvestre de la insulina lispro. Además, mezclas 70/30 de PEG<sub>20kDa</sub>-B28(92,4 %)/A1(7,6 %)-insulina lispro e insulina lispro también demuestran la capacidad para formar complejos hexaméricos que soportan la preparación de formulaciones extemporáneas y/o premezcladas estables de una insulina basal e insulina de acción rápida.

55

Tabla I:

Fenol (mM)	$\epsilon_{574nm}$ insulina lispro	$\epsilon_{574nm}$ PEG <sub>20kDa</sub> -B28 <sub>(92,4 %)</sub> /A1 <sub>(7,6 %)</sub> .insulina lispro	$\epsilon_{574nm}$ Mezcla 70/30
0,0	0	0	0
0,1	181	5	
0,2			42
0,3	259		93
0,4	329		125
0,6	347	26	
0,7	391	45	182
0,9	468		
1,1	514	88	244
1,4	628	146	
1,8	744		399
2,1	765	220	462
2,5	760		
2,8	799	358	535
3,5	826	413	567
4,2	828		600
4,9		392	614
5,6			635
6,3		500	
7,0	812		656
7,7		582	
9,0		596	
10,4		610	676
11,7		630	
13,8	865	648	
17,1		662	707
20,4	886	696	
23,7			736
26,9	903	725	764

**Ejemplo 8: Análisis del estado hexamérico de PEG<sub>20kDa</sub>-B28<sub>(92,4 %)</sub>/A1<sub>(7,6 %)</sub>-insulina lispro formulada con Zn, fenol y/o calcio**

- 5 La vida de almacenamiento química y las estabilidades durante el uso de la insulina y algunos análogos de la insulina se benefician de la capacidad para formar pequeños complejos hexaméricos en solución. La capacidad para hexamerizar la insulina o la insulina lispro en presencia de iones metálicos divalentes ( $Zn^{+2}$  o  $Co^{+2}$ ) y conservantes fenólicos (fenol o m-cresol) ralentiza la desamidación de AsnA21 y, posteriormente, minimiza la formación de partículas de alto peso molecular (PAPM).
- 10 Para evaluar la capacidad de PEG<sub>20kDa</sub>-LysB28-insulina lispro para formar hexámeros, PEG<sub>20kDa</sub>-B28<sub>(92,4 %)</sub>/A1<sub>(7,6 %)</sub>-insulina lispro, con una concentración proteica de partida basada en la  $A_{276nm} = 8,6$  mg insulina lispro/ml o 38,2 mg

de conjugado de insulina lispro PEGilada/ml a pH 6,7 se dializa en agua durante la noche. La proteína dializada se diluye después con agua para ajustar la concentración proteica a 4,6 mg/ml o 20,6 mg o del conjugado de proteína PEGilada/ml. Se prepara una solución madre de tampón 4x a pH 7,0, con las concentraciones finales del tampón fosfato a 40 mM y m-cresol a 12,8 mg/ml. La solución madre de óxido de cinc se prepara disolviendo óxido de zinc en 0,5 ml de HCl 1N, diluyendo después con agua hasta una concentración final de cinc de 0,097 M. Las muestras de solución para análisis de óxido de cinc en el UV cercano se prepararon con concentraciones variables de cinc (0 de a 400  $\mu$ M) mezclando 450  $\mu$ l de PEG<sub>20kDa</sub>-B28<sub>(92,4 %)</sub>/A1<sub>(7,6 %)</sub>-insulina a una concentración proteica de 4,6 mg/ml con alícuotas de la solución madre de cinc (volumen total máximo de la solución madre de cinc añadida= 2,5  $\mu$ l o equivalente a 4 iones de cinc por hexámero de PEG<sub>20kDa</sub>-B28<sub>(92,4 %)</sub>/A1<sub>(7,6 %)</sub>-insulina) y 150  $\mu$ l de la solución madre del tampón fosfato 4x. El pH final se ajusta, en caso necesario, a pH ~7, 0. La asociación hexamérica de PEG<sub>20kDa</sub>-B28<sub>(96 %)</sub>/A1<sub>(4 %)</sub>-insulina lispro o insulina lispro se monitoriza en el óxido de cinc en el UV cercano a 250 nm, una región sensible a los cambios disulfuro, usando una celda de 0,2 cm. La elipticidad media del residuo se representa frente a una proporción de moles de cinc por moles de hexámero.

Los resultados, mostrados en la Tabla II, indican además que PEG<sub>20kDa</sub>-B28<sub>(92,4 %)</sub>/A1<sub>(7,6 %)</sub>-insulina lispro puede, sorprendente e inesperadamente, asociarse como un complejo hexamérico en presencia de iones metálicos divalentes y análogos conservantes fenólicos en las condiciones de formulación usadas en Humalog®, a pesar de la presencia de seis restos PEG de 20 kDa conjugados cerca del ya debilitado dominio de dimerización de la insulina humana silvestre de la insulina lispro.

El impacto de la hexamerización y la unión del ligando sobre la estabilidad térmica de PEG<sub>20kDa</sub>-B28<sub>(92,4 %)</sub>/A1<sub>(7,6 %)</sub>-insulina en las formulaciones de ensayo que estimulan los hexámeros también se investigó con experimentos de desnaturalización térmica con DC. La longitud de onda usada para los estudios de desnaturalización térmica fue 240 nm porque se encontró que el cambio de la señal global era mayor a 240 nm que a 250 nm usados en los estudios de unión a Zn<sup>2+</sup>, aunque la absorbancia de la solución total sería lo bastante baja como para obtener datos de DC de alta calidad. Los datos del escáner térmico a 240 nm en una cubeta de 1 mm se recogieron de 5 °C a aproximadamente 95 °C (la temperatura final varió ligeramente para cada muestra), con una velocidad de escaneo o extremos de los datos de 1 °C/minuto, un ancho de banda de 1,5 mm y un tiempo de respuesta de 8 segundos. Los datos de desnaturalización térmica se pueden representar tanto como la señal bruta (mdeg a 240 nm) como la fracción aparente sin plegar (F<sub>unf</sub>), que viene dada por:

$$[Y_{unf}(T) - Y_{nat}(T)]$$

en la que Y<sub>obs</sub>(T) es la señal observada como función de la temperatura y Y<sub>nat</sub>(T) y Y<sub>unf</sub>(T) son extrapolaciones lineales de las basales nativas y sin plegar, respectivamente. La temperatura de inicio del despliegue se define como la temperatura a la cual comienza la F<sub>unf</sub> a aumentar desde el valor basal nativo (F<sub>unf</sub> = 0), y la temperatura del punto medio es la temperatura a la cual F<sub>unf</sub> = 0,5.

Los experimentos de desnaturalización térmica DC se realizaron esencialmente como se ha descrito anteriormente indicando que la estabilidad térmica de los hexámeros de PEG<sub>20kDa</sub>-B28<sub>(92,4 %)</sub>/A1<sub>(7,6 %)</sub>-insulina están sustancialmente reducidos en comparación con los hexámeros de insulina lispro cuando ambos se formulan de forma similar en TRIS 16 mM, pH 7,2, 3,1 mg/ml de m-cresol y cinc. Además, los estudios de desnaturalización térmica DC detectaron un incremento significativo dependiente de la concentración de iones de calcio y de cloro en la temperatura de fusión de PEG<sub>20kDa</sub>-B28<sub>(92,4 %)</sub>/A1<sub>(7,6 %)</sub>-insulina lispro (datos no mostrados). Más específicamente, la temperatura de inicio del desplegamiento se observó que era ~30° C en TRIS 16 mM a pH 7,2, 3,1 mg/ml de m-cresol y cinc, pero aumenta espectacularmente hasta ~50° C en la misma formulación con cloruro cálcico 75 mM. Se observó un efecto similar con la adición a la formulación de NaCl (NaCl 25 mM a 150 mM) en lugar de cloruro cálcico. Por tanto, el calcio y/o el cloro pueden ser excipientes de estimulación de hexámeros muy útiles en las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos PEG<sub>20kDa</sub>-B28-insulina lispro con el fin de incrementar la estabilidad química y/o física de la composición farmacéutica tras almacenamiento.

**Tabla II: Cambios en la elipticidad media del residuo (EMR) como función de la proporción Zn/hexámero**

Zn por hexámero (mol/mol)	EMR PEG <sub>20kDa</sub> - B28 <sub>(96 %)</sub> /A1 <sub>(4 %)</sub> -insulina lispro (grados cm <sup>2</sup> d mol <sup>-1</sup> residuo <sup>-1</sup> )	EMR Insulina lispro (grados cm <sup>2</sup> d mol <sup>-1</sup> residuo <sup>-1</sup> )
0	-116,103	-172,545
0,5	-135,764	-209,347
1	-158,861	-268,082
1,5	-190,81	-315,972

Zn por hexámero (mol/mol)	EMR PEG <sub>20kDa</sub> - B28 <sub>(96 %)</sub> /A1 <sub>(4 %)</sub> -insulina lispro (grados cm <sup>2</sup> dmo <sup>l</sup> <sup>-1</sup> residuo <sup>-1</sup> )	EMR Insulina lispro (grados cm <sup>2</sup> dmo <sup>l</sup> <sup>-1</sup> residuo <sup>-1</sup> )
2	-213,12	-378,179
3	-255,23	-426,872
4	-298,729	-471,587

#### Ejemplo 9: Generación de PEG<sub>20kDa</sub>-B28<sub>(~95 %)</sub>/A1<sub>(~5 %)</sub>-insulina lispro

Una solución tampón que contiene fosfato sódico dibásico 150 mM y EDTA 50 mM se mezcla con fosfato sódico tribásico 150 mM, para dar una solución tampón con un pH entre 10,85 y 11,10 a una temperatura entre aproximadamente 4 y 6 °C. A una temperatura entre aproximadamente 4 y 6 °C, lentamente se añaden cristales de insulina lispro 30-60 mg/ml al tampón, con agitación suave para evitar la formación de aglomerados durante la disolución del cristal.

Carbonato de monometoxipoli(etilenglicol) p-nitrofenilo (mPEG-NPC) que tiene PEG de un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 20 kDa ± aproximadamente 2 kDa se disuelve a una concentración de 60-120 mg/ml en agua refrigerada (4-6 °C) introduciendo la cantidad requerida de agua refrigerada en un vaso, agitando para crear un vórtex y vertiendo lentamente el polvo de mPEG-NPC en el ojo del remolino para garantizar una dispersión rápida y adecuada. El polvo de mPEG-NPC es un polvo fino y, tras dispersión, se liberan considerables burbujas de aire en el vaso. La solución mPEG-NPC en el vaso se deja desairear entre de 30 a 60 minutos, en función del volumen.

La solución de insulina lispro preparada anteriormente se transfiere a un vaso con camisa agitado mecánicamente, El vaso está instrumentado para la medición de la temperatura y del pH. La agitación se proporciona mediante un impulsor estándar que opera con un número de Reynolds en el régimen de turbulencia. La solución de mPEG-NPC (PEG) se mide en el vaso a una velocidad tal para dar un tiempo de adición total de PEG de entre 3 a 5 horas. La temperatura de la camisa se mantiene entre 4 °C y 6 °C y se continúa la mezcla. El pH de la reacción se mantiene entre 10,85 y 11,10 mediante la adición de la cantidad requerida del tampón fosfato sódico tribásico 150 mM El PEG se añade hasta que la proporción molar final de PEG:insulina lispro está en el intervalo entre 2,5 y 4,5.

Al final de la adición de PEG, la temperatura de la camisa se eleva en 60 minutos a entre 25 °C y 30 °C y la mezcla de reacción se incuba a dicha temperatura durante aproximadamente 3 a aproximadamente 6 horas manteniendo el pH entre aproximadamente 10,7 y aproximadamente 11,0. Al final del periodo de incubación, la mezcla de reacción se inactiva mediante la adición de tampón 2 x (ácido acético/acetato sódico 10 mM, pH 4,0) y se diluye con el mismo tampón 2x para ajustar su conductividad (2,5 mS/cm) y concentración (3-5 mg/ml).

La mezcla de reacción se purifica usando una columna de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) empacutada con una resina adecuada (p. ej., resina de sefarosa SP de flujo rápido). La columna se empacuta con la resina a una altura de lecho entre aproximadamente 15 a aproximadamente 30 cm, equilibrado con acetato Na 100 mM (tampón A) y se carga con la mezcla de reacción diluida (5-8 g de producto/ de resina) a pH bajo (aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,0) a un caudal adecuado de entre aproximadamente 50 a aproximadamente 90 cm/h. El producto mono-PEGilado y la proteína sin reaccionar se unen, preferentemente, sobre la resina, mientras que los subproductos multi-PEGilados y los reactivos en exceso atraviesan en su mayoría la columna. El tampón A, con concentración de sal diluida (20-30 mM), se usa para eliminar mediante lavado todos los subproductos multi-PEGilados de adsorción débil, seguido de elución por gradiente usando un tampón (8-12 CV) con mayor concentración de sales (50-70 mM) para eliminar preferentemente el producto PEGilado de la resina al tiempo que se mantiene en la columna toda la proteína que no ha reaccionado. El producto se recoge (3-5 CV) y la columna se lava con tampón A con concentración de sales elevada (100 mM) para eliminar la proteína que no ha reaccionado.

La corriente principal de la columna CEX (3-5 CV) a 3-5 mg/ml se somete a una filtración de flujo tangencial para incrementar su concentración a 40-80 mg/ml usando una membrana de lámina plana estándar (corte de peso molecular 3-5 kDa). El procedimiento se lleva a cabo mediante una concentración inicial, seguida de intercambios con tampón y concentración final a la concentración requerida. El flujo de operación a lo largo del procedimiento se mantiene entre 10-20 litros por metro cuadrado de área de filtro por hora (LMH) y la presión transmembrana (TMP) entre aproximadamente 102 a aproximadamente 238 kPa.

La solución con el ingrediente farmacéutico activo concentrado se congela a una temperatura adecuada (-20° a -70°) y se almacena a una temperatura adecuada (-20° a -70 °C).

#### Ejemplo 10: Perfiles farmacocinéticas de Insulina Lispro PEGilada en perros

A dos perras sabueso (Beagle) de cuatro años de edad y 7-10 kg de peso se les administra dosis subcutánea de 18,9 nmol/kg de los compuestos de ensayo de ejemplo. Periódicamente se extraen muestras de sangre de la vena



cefálica o safena y se introducen en tubos que contienen EDTA disódico. El plasma se obtiene de las muestras de sangre de la vena y se usó un radioinmunoensayo de insulina disponible comercialmente para determinar los niveles del fármaco administrado en el plasma. Los perfiles farmacocinéticos y los parámetros se determinaron para cada uno de los compuestos de ejemplo preparados esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. el compuesto 11 preparado usando mPEG-NPC lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, aproximadamente 30 kDa y aproximadamente 20 kDa.

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando procedimientos independientes de modelo (WinNonlin Pro). El compuesto 11 preparado usando mPEG-NPC lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa exhibió un tiempo hasta la concentración máxima ( $T_{m\acute{a}x}$ ) de aproximadamente 12 horas, una tasa de aclaramiento aparente (CL/F) de aproximadamente 0,046 l/h/kg, una concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) de aproximadamente 14 nM y una semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ) de aproximadamente 14 horas.

El compuesto 11 preparado usando mPEG-NPC lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30 kDa exhibió un tiempo  $T_{m\acute{a}x}$  de aproximadamente 24 horas, una CL/F de aproximadamente 0,027 l/h/kg, una  $C_{m\acute{a}x}$  de aproximadamente 18 nM y una  $t_{1/2}$  de aproximadamente 23 horas.

El compuesto 11 preparado usando mPEG-NPC lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa exhibió un tiempo  $T_{m\acute{a}x}$  de aproximadamente 24 horas, una CL/F de aproximadamente 0,026 l/h/kg, una  $C_{m\acute{a}x}$  de aproximadamente 15 nM y una  $t_{1/2}$  de aproximadamente 20 horas.

La insulina detemir se administró de un modo similar a perras sabueso a una dosis de 18,9 nmol/kg y exhibió un  $T_{m\acute{a}x}$  de aproximadamente 1,3 horas, una CL/F de aproximadamente 0,12 L/h/kg, una  $C_{m\acute{a}x}$  de aproximadamente 23 nM y una  $t_{1/2}$  de aproximadamente 3,5 horas. La Tabla III enumera los parámetros comparables en el perro. El RIA específico para insulina usado para estos estudios detecta insulina lispro PEGilada e insulina endógena.

**Tabla III. Parámetros FC para insulina Lispro PEGilada en perros**

Parámetro	PEG-compuesto 11 20kDa	PEG-compuesto 11 30kDa	PEG-compuesto 11 40kDa	Insulin detemir
$C_{m\acute{a}x}$ (nM)	14 ± 1	18 ± 3	15 ± 1	23 ± 2
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	12 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	1,3 ± 0,6
$T_{1/2}$ (h)	14 ± 3	23 ± 6	20 ± 1	3,5 ± 0,7
AUC (nM h)	419 ± 43	727 ± 118	729 ± 86	161 ± 20
CL/F (L/h/kg)	0,046 ± 0,005	0,027 ± 0,004	0,026 ± 0,003	0,12 ± 0,02
<b>Dosis subcutánea, 18,9 nmol/kg; n = 3/grupo</b>				

#### **Ejemplo 11: Proyección de “plano” medio y dosis en seres humanos**

Un criterio clave para mejorar la terapia con insulina basal es la capacidad de obtener un perfil verdaderamente plano, favorable para la dosis de una vez al día en pacientes. Suficientemente plano se define como una proporción pico-valle (PV) < 2 para los fines de comparación, las proporciones de PV calculadas a partir de los perfiles de FC publicados varían de -4-9 para detemir y ~1,2-2,6 para glargina. Los datos FC de ratas y perros (véanse los Ejemplos 5 y 10, respectivamente) para la dosis de 18,9 nmol/kg de compuestos de ejemplo y de insulina detemir se ajustaron a modelos FC 1-CMT, se parametrizaron en términos de  $k_a$ , CL/F y V/F. Cada parámetro de FC (P) se ajusta después a una ecuación alométrica de la forma  $P = aBW^b$ , en la que b se corrige a -0,25, 0,75 y 1 para  $k_a$ , CL/F y V/F, respectivamente, y es un parámetro ajustado. Se obtienen estimaciones medias humanas para cada parámetro FC y se generan simulaciones de perfiles medios tras la dosificación diaria en seres humanos. Dadas las similitudes entre los conjugados de insulina lispro PEGilada de 30 kDa y 40 kDa, las simulaciones solo se muestran para la insulina lispro PEGilada de 20 kDa, la insulina lispro PEGilada de 40 kDa y la insulina detemir. Las simulaciones generadas indican que las proporciones pico-valle (PV) para los compuestos de insulina lispro PEGilada de 20 kDa y la insulina lispro PEGilada de 40 kDa son espectacularmente más planas que para insulina detemir. Los resultados de las simulaciones se muestran en la Figura 1.

Una estrategia para estimar la dosis humana de una insulina lispro PEGilada requerida para la eficacia es usar un comparación clínico conocido (insulina detemir) como control interno en el modelo de eficacia en ratas, con la asunción de que la potencia relativa entre insulina lispro PEGilada e insulina detemir en el modelo de ratas es similar a la potencia relativa en la clínica. La dosis diaria requerida de insulina lispro PEGilada en la clínica se puede obtener usando la ecuación siguiente:

$$\frac{Dosis_{det}}{Dosis_{PEG}} = \frac{CE_{50,det}}{CE_{50,PEG}} \times \frac{CL/F_{det}}{CL/F_{PEG}}$$

La proporción de la potencia relativa para cada uno de los conjugados de insulina lispro PEGilada se puede obtener en la Tabla IV. Las proporciones de aclaramiento aparente relativas para insulina lispro PEGilada/detemir de ejemplo en ratas, perros y seres humanos (proyectadas) se recopilan en la Tabla V.

5 **Tabla IV. Potencia relativa basada en la concentración de conjugados de insulina lispro PEGilada e insulina detemir en rata**

Compuesto 11	Proporción de la potencia de detemir/insulina lispro PEGilada
20 kDa PEG-insulina lispro	1,34 ± 0,68
30 kDa PEG-insulina lispro	0,68 ± 0,35
40 kDa PEG-insulina lispro	0,65 ± 0,36

10

**Tabla V. Proporciones relativas CL/F para insulina detemir/compuestos de insulina lispro PEGilada**

Compuesto 11	CL/F de rata	CL/F de perro	CL/F de ser humano (proyectada)
PEG-insulina lispro 20 kDa	5,5	2,6	3,3
PEG-insulina lispro 40 kDa	4,8	4,6	4,1

15

20

Usando las estimaciones de la potencia relativa de la Tabla IV y las estimaciones de CL/F relativa de la Tabla V, las proyecciones de la dosis media para conjugados de insulina lispro PEGilada en seres humanos es 4,2 y 6,9 nnol/kg para los compuestos de insulina lispro PEGilada de 20 kDa y 40 kDa, respectivamente. Estas proyecciones se basan en una dosis clínica media diaria de 18,5 nmol/kg de insulina detemir como se indica para pacientes diabéticos de tipo 2 en la indicación de detemir. Cuando se consideran la acción del tiempo y la potencia, la predicción para la dosis clínica media máxima es ~3 veces menor que la insulina detemir. En el mejor caso, la dosis clínica media estimada para el conjugado insulina lispro PEGilada de 20 kDa, 30 kDa, y 40 kDa es de aproximadamente 20 y aproximadamente 45 veces menor que la insulina detemir.

**Ejemplo 12: Tasas de infusión de glucosa tras administración única en voluntarios sanos: Administración de de PEG<sub>20kDa</sub>-B28<sub>(≥-95 %)/A1<sub>(≤-5 %)</sub>-insulina lispro y glargina</sub>**

25

30

Se realizó un estudio de primera dosis en seres humanos de tres partes usando una única dosis de EG<sub>20kDa</sub>-B28<sub>(≥-95 %)/A1<sub>(≤-5 %)</sub> insulina lispro (LY) preparada esencialmente como se describe en el Ejemplo 9. La parte A incluyó tres periodos de estudio en los que los sujetos recibieron una inyección subcutánea (SC) de la dosis de LY en el primer periodo, seguido de una inyección de insulina glargina (0,5 U/kg) en el segundo periodo, y seguido después de una inyección de otra dosis de LY en el tercer periodo. La parte B era un estudio abierto de dosis única y dos periodos duplicados en el que los sujetos recibieron una dosis única de LY en ambos periodos usando pinzas de glucosa de 24 y 36 horas. La parte C era un estudio abierto, de dos periodos, de dosis única, secuencia fija y controlado con fármaco comparador en el que los sujetos recibieron una única dosis de 0,5 mg/kg de LY en un periodo y una única dosis de 0,8 U/kg de insulina glargina en el otro periodo. Los sujetos fueron sometidos a un procedimiento de pinza de glucosa de 24 horas en cada periodo de las Partes A y C y a un procedimiento de pinza de glucosa de una duración mayor (hasta 36 horas) en cada periodo de la Parte B. LY se administró por vía subcutánea como una sola dosis en las Partes A, B y C de siguiente modo:</sub>

35

Dosis de la Parte A: 0,0025, 0,0125, 0,075, 0,325 mg/kg de peso corporal

Dosis de la Parte B: 0,15, 0,225 mg/kg

Dosis de la Parte C: 0,5 mg/kg

A los sujetos se administra una única dosis del compuesto de insulina lispro PEGilada o una única dosis de insulina glargina (0,5 U/kg) como comparador y otra dosis única de LY en el 3er periodo. En todos los procedimientos, los sujetos sufren un procedimiento de pinza euglucémica durante hasta 24/36 horas tras cada inyección del compuesto de insulina. Las velocidades de infusión de glucosa (GIR) se ajustan para mantener la euglucemia, con la GIR documentada en el tiempo proporcionando la medida de GD de la acción de la insulina. El objetivo de la pinza de glucosa euglucémica es mantener la euglucemia a través de la infusión de glucosa tras la administración de una dosis de un compuesto de insulina. Se asume que la secreción de insulina endógena y el gasto de glucosa hepática son mínimos y que cualquier glucosa que se transloque fuera del espacio de la glucosa (es decir, glucosa metabolizada) es la consecuencia directa de la insulina exógena administrada. La GIR, en este caso, será la medida glucodinámica (GD) de la acción de la insulina en el tiempo. Todos los estudios de pinza de glucosa se realizan tras una noche en ayunas de aproximadamente 8 horas. La mañana del estudio se introduce un catéter pequeño en una vena de un brazo, idealmente en la fosa antecubital, para administración de solución al 20 % de dextrosa (tamponada a un pH casi neutro) bajo el control de una bomba volumétrica. Se coloca otro catéter, idealmente en la muñeca o la mano para obtención de muestras venosas para glucosa. Esta área se calienta con un dispositivo de calentamiento hasta aproximadamente 55-60 °C para la obtención de muestras de sangre venosa arterializada. Las muestras de sangre se obtienen a pie de cama para la determinación inmediata de concentraciones de glucosa en sangre entera usando una técnica automática de glucosa oxidasa. Tras la obtención de muestras de sangre basal y un periodo de estabilización de aproximadamente 30 minutos, cada sujeto recibe una dosis de compuesto de insulina administrada por vía subcutánea. El inicio de la inyección subcutánea de un compuesto de insulina se define como el tiempo cero. Tras la finalización de la dosis, junto con frecuentes obtenciones de muestras de sangre para medir la glucosa en sangre, se infunde glucosa por vía intravenosa a una velocidad variable con el fin de mantener la euglucemia durante hasta 24 o 35 horas tras administración de insulina.

Las obtenciones de muestras de sangre se producen aproximadamente cada 10 minutos durante aproximadamente 30 minutos antes de la dosis y continúan cada 5-10 minutos para las primeras 2 horas tras la dosis (con la opción de obtener muestras con una frecuencia de incluso cada 2,5 minutos) y, después, se reducen a intervalos de 10-30 minutos hasta el final de la pinza.

Durante la pinza de glucosa, la velocidad de la infusión de glucosa se ajusta para mantener una concentración de glucosa en sangre diana predeterminada. Preferentemente, la concentración diana es cercana a la glucosa en sangre en ayunas. El objetivo del procedimiento de la pinza de glucosa es mantener las concentraciones de glucosa en sangre dentro de +5 % del valor diana previo a la dosis, que se define como 5 mg/dl por debajo de la glucosa media en sangre en ayunas. Por tanto, las concentraciones de glucosa en sangre se mantienen constantes mientras que la GIR varía. Por tanto, la velocidad variable de la infusión de glucosa refleja la actividad del compuesto de insulina de ensayo.

Los niveles de glucosa en sangre de las muestras y los cambios de la velocidad de infusión durante la pinza se documentan.

Un estudio realizado esencialmente como se describe en el Ejemplo 12 demostró, en seres humanos, que LY tiene características de una insulina "basal" ideal. una duración de la acción larga, una semivida aparente que varía de 24-44 horas y características basales, es decir una proporción pico-valle inferior a 2 (Figura 2). Adicionalmente, la duración de la acción de la LY es mayor que la de la insulina glargina (Figura 2). La variabilidad dentro de un mismo sujeto en la glucodinámica fue inferior al 30 % (datos no mostrados), que es similar o mejor a la de la glargina. Por último, los datos de glucodinámica de la Parte C del estudio (0,5 mg/kg) dieron como resultado un perfil de GIR para LY que era "sin picos", mantuvo la GD durante más de 36 horas y superó la respuesta de GIR máxima para glargina (0,5 U/kg; datos no mostrados).

#### **Ejemplo 13: Estabilidad química y física de composiciones farmacéuticas PEG<sub>20kDa</sub>-B28(~95 %)-A1(~5 %)-insulina lispro**

Como se ha descrito en los Ejemplos 7 y 8 anteriores, PEG<sub>20kDa</sub>-B28(~95 %)-A1(~5 %)-insulina lispro se puede asociar como complejo hexamérico en presencia de iones metálicos divalentes y conservante fenólico en condiciones de formulación análogas a las de Humalog®. De acuerdo con esto se realizaron estudios de estabilidad química y física de las formulaciones PEG<sub>20kDa</sub>-B28-insulina lispro similares a las formulaciones de la solución comercial de insulina lispro (es decir, formulaciones en solución Humalog®). La estabilidad química de una formulación farmacéutica de ensayo se consideró aceptable si no se detectó ningún cambio significativo en varias propiedades analíticas desde el punto de tiempo inicial para el periodo de almacenamiento indicado a las diferentes temperaturas. La estabilidad física de una formulación farmacéutica de ensayo se consideró aceptable si, tras evaluación visual, no se observaron partículas y, tras la evaluación con el microscopio de fluorescencia con tioflavina T no se observó formación de fibrillas ni de gel.

Las formulaciones de PEG<sub>20kDa</sub>-B28-insulina lispro que contienen 0,5 mol de cinc por mol de PEG<sub>20kDa</sub>-B28-insulina lispro, 16 mg/ml de glicerina, 3,15 mg/ml de m-cresol, tamponado con fosfato o citrato a pH 7,0 o pH 6,5, respectivamente, se prepararon y analizaron para determinar la estabilidad tanto química como física. Formulaciones similares sin cinc se analizaron para evaluar el impacto del cinc sobre la estabilidad. Las muestras a 35 °C formaron partículas en gel tras aproximadamente 1 mes de almacenamiento y las muestras a 25 °C mostraron un número

5 significativo de formación de partículas/burbujas tras aproximadamente dos meses de almacenamiento. Las formulaciones tamponadas tanto con citrato como con fosfato, así como las que tienen/carecen de cinc, mostraron una estabilidad física/química similar a la condición acelerada a 35 °C, aunque las muestras tamponadas con citrato parecían ser peores que las tamponadas con fosfato cuando se analizaron visualmente. La formulación control de insulina lispro permaneció transparente. Las formulaciones tamponadas tanto con citrato como con fosfato mostraron una estabilidad química aceptable a 5 °C durante al menos 13 meses.

10 Investigaciones posteriores indicaron que el conservante fenólico, m-creso, estimulaba la gelificación cuando se combinaba con PEG<sub>20kDa</sub>-B28-insulina lispro compuesto y expuesto a temperatura elevada (> 25°C). Es interesante el hecho de que cuando se añadió m-creso al mPEG solo (activado o no activado) no se produjeron partículas de gel tras la exposición a una temperatura elevada.

15 Cuando las formulaciones prototipo de insulina lispro no confería estabilidad aceptable a los compuestos PEG<sub>20kDa</sub>-B28-insulina lispro a temperaturas elevadas, se desarrollaron composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos PEG<sub>20kDa</sub>-B28(~95 %)/A1(~5 %)-insulina lispro que mostraban mejor estabilidad química y física y adecuados para comercialización como formulación farmacéutica administrada por vía parenteral.

15 Las formulaciones siguientes de PEG<sub>20kDa</sub>-B28(~95 %)/A1(~5 %)-insulina lispro (15 mg/ml) mostraron una estabilidad química y física aceptable durante una semana a 40 °C, durante un mes a 30 °C, durante tres meses a 25 °C y durante ocho meses a 5 °C.

20 1) Tampón TRIS 16 mM, pH 7,0-8,0, cloruro cálcico 10 mM, 20 mg/ml de azúcar (sacarosa o trehalosa), 3 mg/ml (28 mM) de m-cresol y 0,5 mol de cinc por 1,0 mol de PEG<sub>20kDa</sub>-B28(~95 %)/A1(~5 %)-insulina lispro

20 2) Tampón TRIS 16 mM, pH 7,0-8,0, cloruro cálcico 10 mM, 3 mg/ml de poloxámero, 3 mg/ml (28 mM) de m-cresol y 0,5 mol de cinc por 1,0 mol de PEG<sub>20kDa</sub>-B28(~95 %)/A1(~5 %)-insulina lispro

3) Tampón fosfato 5 mM, pH 7,0, glicerina 130 mM, 3 mg/ml (28 mM) de m-cresol, 3 mg/ml de poloxámero, 0,3 mol de cinc por 1,0 mol de PEG<sub>20kDa</sub>-B28(~95 %)/A1(~5 %)-insulina lispro.

25 Las formulaciones de PEG<sub>20kDa</sub>-B28(~95 %)/A1(~5 %)-insulina lispro que contienen excipientes estimulantes de hexámero, por ejemplo cinc, m-cresol y calcio exhibieron, en general, mayor estabilidad física y química, especialmente a temperaturas elevadas. La adición de calcio, cloro y/o NaCl a formulaciones de PEG<sub>20kDa</sub>-B28(~95 %)/A1(~5 %)-insulina lispro que contienen cinc y m-cresol potenció más la estabilidad física de las formulaciones expuestas a temperaturas de 40 °C o mayores. Además, las formulaciones tamponadas con fosfato y con citrato exhibieron en general menor estabilidad física que las formulaciones taponadas con TRIS.

30 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Eli Lilly and Company

<120> COMPUESTOS DE INSULINA LISPRO PEGILADOS

35 <130> X-18199.nationalphaseseqlist.20-oct-2010

140> PCT/US2009/046704

<141> 2009-06-09

40 <150> 61/061,281 <151> 2008-06-13

<150> 61/121,394 <151> 2008-12-10

<160> 6

45 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

50 <213> Homo sapiens

<400> 1

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

Glu Asn Tyr Cys Asn  
20

55

ES 2 473 580 T3

<210> 2  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5  
 <400> 2

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

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

10  
 <210> 3  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 3

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

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

20  
 <210> 4  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

30  
 <220>  
 <221> MIST\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa en la posición 1 está ausente, cualquier aminoácido básico o cualquier aminoácido codificable genéticamente

35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (22)..(22)  
 <223> Xaa en la posición 22 está ausente, es Gly, Ser, Ala o Asn

40  
 <400> 4

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

Leu Glu Asn Tyr Cys Xaa  
 20

45  
 <210> 5  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa en la posición 1 está ausente, cualquier aminoácido básico o cualquier aminoácido codificable genéticamente

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (29)..(29)  
<223> Xaa en la posición 29 es Pro, Asp, Lys, Leu, Val o Ala

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (30)..(30)  
<223> xaa en la posición 30 es Lys o Pro

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (31)..(31)  
<223> Xaa en la posición 31 está ausente o es Thr

20 <220>  
<221> MIS\_FEATURE  
<222> (32)..(32)  
<223> Xaa en la posición 32 está ausente

25 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (33)..(33)  
<223> Xaa en la posición 33 está ausente

30 <400> 5

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

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

Xaa

35 <210> 6  
<211> 33  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

40 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa en la posición 1 está ausente o es cualquier aminoácido codificable genéticamente

45 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (29)..(29)  
<223> Xaa en la posición 29 es Pro, Asp, Lys, Leu, Val o Ala

50 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (30)..(30)  
<223> Xaa en la posición 30 es Lys o Pro

55 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (31)..(31)  
<223> xaa en la posición 31 está ausente o es Thr

60 <220>  
<221> MISC\_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa en la posición 32 está ausente

<220>

5 <221> MISC\_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa en la posición 33 está ausente

<400> 6

10

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

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

Xaa

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina lispro PEGilado de fórmula I:

P-[(A)-(B)], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

5 P es PEG que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 17,5 kDa a aproximadamente 40 kDa.

A es la cadena A de insulina lispro (SEC ID N° 1);

B es la cadena B de insulina lispro (SEC ID N° 3); y

10 en la que A y B están adecuadamente reticuladas y P está unido directamente mediante un enlace covalente de uretano al grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de B;

uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables; y

una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina lispro.

2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un conservante fenólico farmacéuticamente aceptable y una cantidad de cinc suficiente para hacer que los compuestos de insulina lispro PEGilados hexamerizen.

3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en terapia.

4. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de hiperglucemia o diabetes mellitus o diabetes gestacional.

20



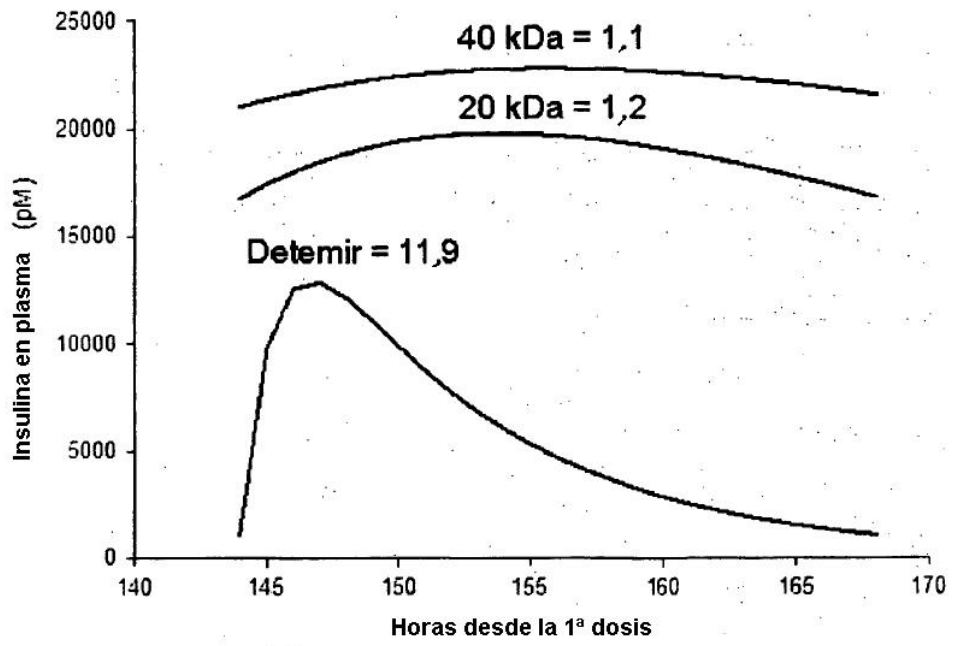


Figura 1

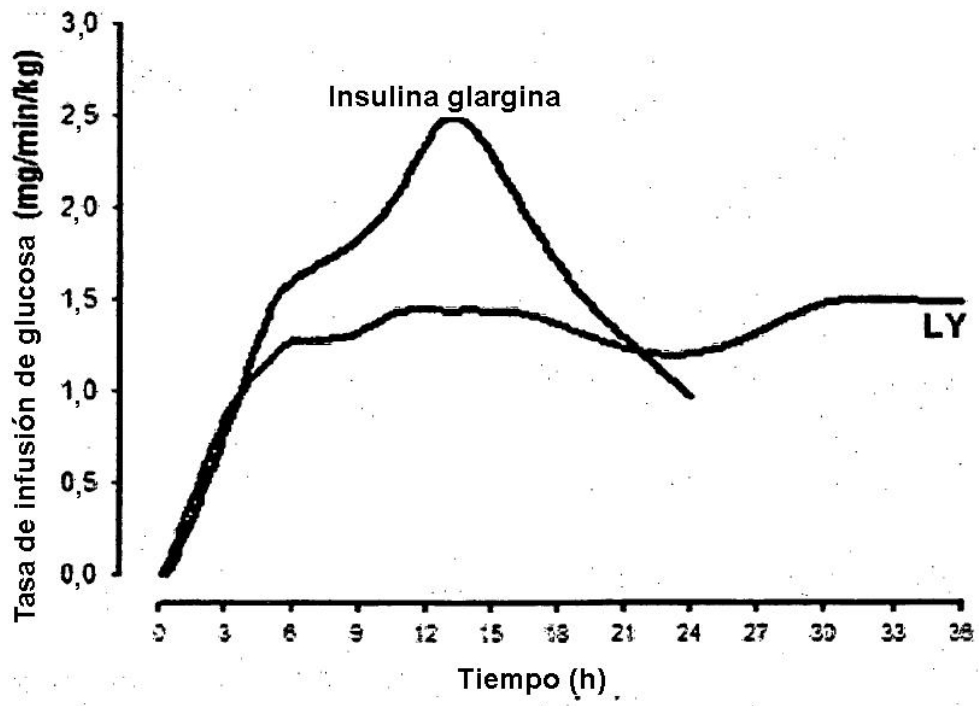


Figura 2