

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 686**

51 Int. Cl.:

A61K 38/28 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)
A61K 47/34 (2007.01)
A61K 47/50 (2007.01)
C07K 14/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2011 PCT/KR2011/002331**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO11122921**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2011 E 11763093 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2552474**

54 Título: **Conjugado de insulina usando un fragmento de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

02.04.2010 KR 20100030575

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

20.07.2017

73 Titular/es:

**HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)
 550 Dongtangiheungno Dongtan-myeon
 Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813, KR**

72 Inventor/es:

**SONG, DAE HAE;
 SHIN, JAE HEE;
 PARK, YOUNG JIN;
 IM, DAE SEONG;
 BAE, SUNG MIN y
 KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 625 686 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

Conjugado de insulina usando un fragmento de inmunoglobulina

Campo de la técnica

5 La presente divulgación se refiere a un conjugado de insulina que tiene una duración y estabilidad *in vivo* mejoradas, que se prepara uniendo covalentemente insulina con una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico, una formulación de acción prolongada que comprende el mismo y un procedimiento de preparación del mismo. La divulgación proporciona un procedimiento para tratamiento en un sujeto que tiene un trastorno de deficiencia de insulina, tal como diabetes. El conjugado de insulina de la presente divulgación mantiene la actividad *in vivo* del péptido a un nivel relativamente alto y aumenta notablemente la semivida en suero del mismo, mejorando así en gran medida el cumplimiento del fármaco con el tratamiento con insulina.

Técnica anterior

15 La insulina, un péptido secretado por las células beta pancreáticas, desempeña un papel central en el control de los niveles de glucosa en sangre en el cuerpo. Cuando la insulina no se secreta adecuadamente o la insulina secretada no funciona en el cuerpo, el nivel de glucosa en la sangre no está regulado y, por lo tanto, se produce diabetes. Esta diabetes se denomina diabetes tipo II. La diabetes tipo I se produce cuando el páncreas no produce suficiente insulina para aumentar el nivel de glucosa en la sangre.

La diabetes tipo II generalmente se trata con agentes hipoglucémicos orales sintetizados químicamente y, en algunos casos, los pacientes son tratados con insulina. Mientras tanto, la diabetes tipo I requiere tratamiento con insulina.

20 El procedimiento de tratamiento de insulina actualmente utilizado es la inyección de insulina antes / después de las comidas. Sin embargo, tal inyección de insulina debe administrarse continuamente tres veces al día, lo que provoca dolor o molestia para los pacientes. Se han realizado varios intentos de superar el problema. Uno de ellos es un procedimiento para administrar un fármaco peptídico mediante inhalación oral o nasal, mejorando su permeabilidad a la membrana. De manera indeseable, el procedimiento mostró una eficiencia de administración muy baja, en comparación con las formulaciones inyectables, y, por lo tanto, todavía existen muchas dificultades para mantener la actividad *in vivo* del fármaco peptídico en el nivel requerido.

Mientras tanto, había un procedimiento para retrasar la absorción del fármaco después de una inyección subcutánea de una gran cantidad del fármaco, con el fin de mantener el nivel en sangre mediante una sola inyección diaria. Algunos de los medicamentos desarrollados (Lantus, Sanofi-aventis) se han aprobado y ahora se utilizan para los pacientes. Además, se han llevado a cabo estudios para prolongar la acción, lo que conduce al desarrollo de Levemir (Novo Nordisk) preparado mediante la modificación de la insulina con ácido graso, en el que la acción prolongada se produce mediante la autoasociación de moléculas de insulina en el sitio de inyección y a través de la unión reversible a la albúmina en la sangre. Sin embargo, estos procedimientos generan dolores en el lugar de la inyección y las inyecciones diarias también causan considerable incomodidad al paciente.

35 Se han hecho muchos esfuerzos para mejorar la estabilidad en suero de los fármacos peptídicos y mantener los fármacos en la sangre a niveles elevados durante un período de tiempo prolongado, maximizando de este modo la eficacia farmacéutica de los fármacos. Estas formulaciones de acción prolongada de fármacos peptídicos necesitan aumentar la estabilidad de los fármacos peptídicos y mantener los títulos a niveles suficientemente altos sin provocar respuestas inmunes en los pacientes. Para la preparación de las formulaciones de acción prolongada de fármacos peptídicos, se usó convencionalmente un polímero con alta solubilidad, tal como polietilenglicol (PEG), para modificar químicamente la superficie de un fármaco peptídico.

45 El PEG se une no específicamente a un sitio específico o a varios sitios de un péptido diana para dar un efecto de aumentar el peso molecular de un péptido y, por tanto, inhibir la pérdida por el riñón y evitar la hidrólisis, sin causar efectos secundarios. Por ejemplo, en el documento WO 2006/076471 se describe que un péptido natriurético de tipo B (BNP), que se une a NPR-A activa la producción de GMPc y conduce a una reducción de la presión arterial, y, como resultado, se utiliza como agente terapéutico para la insuficiencia cardíaca congestiva, está unido a PEG, manteniendo así su actividad fisiológica. En la patente de Estados Unidos n.º 6.924.264 se describe que el PEG se une al residuo de lisina de una exendina-4 para aumentar su tiempo de residencia *in vivo*. Este procedimiento aumenta el peso molecular de PEG y, por lo tanto, aumenta el tiempo de residencia *in vivo* del fármaco peptídico.

50 Sin embargo, a medida que aumenta el peso molecular, se reduce notablemente el título del fármaco peptídico y se reduce también la reactividad con el péptido. Por consiguiente, disminuye indeseablemente el rendimiento.

En el documento WO 02/46227 se describe una proteína de fusión preparada mediante acoplamiento de GLP-1, una exendina-4 o un análogo de la misma con seroalbúmina humana o un fragmento de inmunoglobulina (Fc) usando una tecnología de recombinación genética. En la patente de Estados Unidos n.º 6.756.480 se describe una proteína de fusión Fc preparada mediante acoplamiento de una hormona paratiroidea (PTH) y un análogo de la misma con la región Fc. Estos procedimientos pueden abordar problemas como el bajo rendimiento de pegilación y la no especificidad, pero todavía tienen un problema en que el efecto de aumentar la semivida en sangre no es tan notable

como se esperaba y, en algunos casos, los títulos también son bajos. Con el fin de maximizar el efecto de aumentar la semivida en sangre, se han utilizado diversos tipos de enlazadores peptídicos, pero existe la posibilidad de provocar una respuesta inmune. Además, si se utiliza un péptido que tiene enlaces disulfuro, tal como BNP, existe una alta probabilidad de mal plegamiento y, si se usa un péptido que tiene restos de aminoácidos de origen no natural, puede producirse mediante recombinación genética solo con gran dificultad.

En el documento WO 2005/047334 se desvela un fragmento Fc de IgG útil como vehículo fármaco, junto con un vector recombinante que expresa el fragmento Fc de IgG, un transformante transformado con el vector recombinante y un procedimiento para preparar un fragmento Fc de IgG, que comprende cultivar el transformante. Cuando se conjuga con un determinado fármaco, el fragmento Fc de IgG mejora la duración de la acción *in vivo* del fármaco y reduce reducción de actividad *in vivo* del fármaco.

En el documento WO 2006/107124 se desvela fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico, una composición farmacéutica que comprende el fragmento Fc modificado por el polímero no peptídico como vehículo, un complejo del fragmento Fc y un fármaco a través de un enlazador y una composición farmacéutica que comprende dicho complejo. El fragmento Fc modificado por un péptido no péptido carece de inmunogenicidad y funciones efectoras, y mantiene la actividad *in vivo* de un fármaco conjugado con el mismo.

En el documento WO 2008/082274 se desvela un conjugado de péptido insulínico que tiene una duración *in vivo* mejorada de eficacia y estabilidad, que comprende un péptido insulínico, un polímero no péptido y una región Fc de inmunoglobulina, que están unidos covalentemente entre sí, y un uso de los mismos. El conjugado de péptido insulínico de la presente invención tiene una semivida en sangre aumentada.

Divulgación

Problema de la técnica

En este sentido, que conduce a la presente divulgación, se ha llevado a cabo una investigación intensiva y exhaustiva sobre el desarrollo de un procedimiento capaz de maximizar simultáneamente la semivida en suero y la actividad *in vivo* de la insulina, que ha dado como resultado el hallazgo de que una región Fc de inmunoglobulina, el polímero no peptídico y la insulina se unen selectivamente al sitio entre sí mediante un enlace covalente, aumentando de este modo notablemente la semivida en suero, en comparación con el procedimiento de fusión en el marco conocido.

[Solución de la técnica]

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un excelente conjugado de insulina que mantiene la actividad *in vivo* de la insulina y prolonga notablemente la semivida en suero del mismo, una formulación de acción prolongada que comprende el mismo y un procedimiento de preparación del mismo.

Efectos ventajosos

El conjugado de insulina de la presente divulgación mantiene la actividad *in vivo* del péptido a un nivel relativamente alto y aumenta notablemente la semivida en suero del mismo, mejorando así en gran medida el cumplimiento del fármaco con el tratamiento con insulina.

Descripción de los dibujos

La figura 1 es el resultado del análisis farmacocinético del conjugado de insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina; La figura 2 es el resultado de la comparación de las eficacias *in vivo* entre los conjugados de derivado de insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina; y

La figura 3 es el resultado de analizar un 90 % o más de la pegilación en la fenilalanina (B1F) de la cadena beta del conjugado insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina usando una columna de exclusión por tamaño.

Las figuras 4a a 4c son el resultado del análisis de la unión específica de cadena beta del conjugado insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina.

Mejor modo

En un aspecto para lograr los objetos anteriores, la presente divulgación proporciona un conjugado de insulina que se prepara uniendo insulina con una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico, en el que el polímero no peptídico está unido al extremo amino de la cadena beta de la insulina.

En la presente divulgación, la insulina es un péptido que es secretado por el páncreas en respuesta a los niveles elevados de glucosa en la sangre, para captar la glucosa en el hígado, el músculo o el tejido adiposo y convertirlo en glucógeno, y para detener el uso de la grasa como fuente de energía, y, por lo tanto, funciona controlando el nivel de glucosa en sangre. Este péptido incluye agonistas, precursores, derivados, derivados, fragmentos y variantes de los mismos, y, preferentemente, insulina nativa, de acción corta o de acción prolongada.

La insulina natural se refiere a una hormona secretada por el páncreas para estimular la absorción de glucosa e

inhibir la descomposición de la grasa, y, por lo tanto, funciona controlando el nivel de glucosa en sangre. La insulina se forma a partir de un precursor que no tiene función de regular el nivel de glucosa en sangre, conocido como proinsulina, a través de su procesamiento. Las secuencias de aminoácidos de la insulina son las siguientes:

Cadena alfa:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln

-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO. 1)

5

Cadena beta:

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu
-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly- Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ
ID NO. 2)

El agonista de la insulina significa un compuesto que se une al receptor de la insulina para mostrar la actividad biológica igual a la de la insulina, que es irrelevante para la estructura de la insulina.

10 El derivado de insulina significa un péptido que tiene una homología de secuencia de aminoácidos con la insulina nativa de al menos un 80 %, que puede tener algunos grupos en el resto de aminoácido químicamente sustituidos (por ejemplo, alfa-metilación, alfa-hidroxilación), delecionados (por ejemplo, desaminación) o modificados (por ejemplo, N-metilación) y que tiene una función de regular el nivel de glucosa en sangre en el cuerpo.

15 El fragmento de insulina significa un fragmento que tiene uno o más aminoácidos añadidos o delecionados en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal de la insulina nativa, en el que se pueden añadir aminoácidos de origen no natural (por ejemplo, aminoácido de tipo D) y que tiene una función de regulación del nivel de glucosa en sangre en el cuerpo.

La variante de la insulina significa un péptido que tiene una o más secuencias de aminoácidos diferentes de las de la insulina natural y que tiene una función de regulación del nivel de glucosa en sangre en el cuerpo.

20 Cada uno de los procedimientos de preparación para los agonistas, derivados, derivados, fragmentos y variantes de la insulina se pueden usar individualmente o en combinación. Por ejemplo, la presente divulgación incluye un péptido que tiene uno o más aminoácidos diferentes de los del péptido nativo y desaminación del resto de aminoácido en N-terminal, y tiene la función de regular el nivel de glucosa en sangre en el cuerpo.

25 En una realización específica, la insulina utilizada puede producirse mediante una tecnología de recombinación y también se puede sintetizar usando un procedimiento de síntesis en fase sólida.

30 Además, la insulina utilizada se caracteriza por que un polímero no peptídico está unido al extremo amino de la cadena beta de la insulina. Este polímero no peptídico se usa como enlazador. La modificación en la cadena alfa de la insulina conduce a una reducción en la actividad y la seguridad. Por lo tanto, el polímero no peptídico como enlazador está unido al extremo amino de la cadena beta de la insulina, con el fin de mantener la actividad de la insulina y mejorar la seguridad.

El término "actividad", tal como se usa en el presente documento, significa la capacidad de la insulina para unirse al receptor de insulina, y significa que la insulina exhibe su acción a través de la unión al receptor de insulina.

Dicha unión del polímero no peptídico al extremo amino de la cadena beta de la insulina puede conseguirse mediante el control del pH, y preferentemente, en el intervalo de 4,5 a 7,5.

35 El término "extremo N-terminal", tal como se usa en el presente documento, puede usarse indistintamente con "región N-terminal".

40 En un ejemplo específico, se prepara un conjugado insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina uniendo PEG al N-terminal de una región Fc de inmunoglobulina y acoplado selectivamente el extremo N-terminal de la cadena beta de la insulina al mismo. La semivida en suero del conjugado insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina preparado se incrementó notablemente hasta aproximadamente 18 horas y mostró un efecto hipoglucémico en modelos animales de enfermedad. Por lo tanto, se puede preparar una nueva formulación de insulina de acción prolongada que

mantiene la actividad *in vivo* de la insulina.

5 La región Fc de inmunoglobulina es segura para su uso como vehículo de fármaco porque es un polipéptido biodegradable que se metaboliza *in vivo*. Además, la región Fc de la inmunoglobulina tiene un peso molecular relativamente bajo, en comparación con las moléculas de inmunoglobulina completas, y, por lo tanto, es ventajosa en la preparación, purificación y rendimiento del conjugado. La región Fc de la inmunoglobulina no contiene un fragmento Fab, que es altamente no homogéneo debido a diferentes secuencias de aminoácidos de acuerdo con las subclases de anticuerpo, y, por lo tanto, puede esperarse que la región Fc de la inmunoglobulina pueda aumentar considerablemente la homogeneidad de las sustancias y ser menos antigénica.

10 La expresión "región Fc de inmunoglobulina", tal como se usa en el presente documento, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que contiene la región constante 2 de la cadena pesada (CH2) y a la región constante 3 de la cadena pesada (CH3) de una inmunoglobulina, excluyendo las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, la región constante 1 de la cadena pesada (CH1) y la región constante 1 de la cadena ligera (CL1) de la inmunoglobulina. También puede incluir una región de bisagra en la región constante de la cadena pesada. Además, región Fc de inmunoglobulina puede contener una parte o toda la región Fc que incluye la región constante 1 de la cadena pesada (CH1) y / o la región constante 1 de la cadena ligera (CL1), excluyendo las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, siempre que tenga una función fisiológica sustancialmente similar o mejor que el de la proteína nativa. Además, puede ser un fragmento que tiene una deleción en una parte relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de CH2 y / o CH3. Esto es, la región Fc de inmunoglobulina puede comprender 1) un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4, 2) un dominio CH1 y un dominio CH2, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3, 5) una combinación de uno o más dominios y una región bisagra de inmunoglobulina (o una porción de la región bisagra), y 6) un dímero de cada dominio de las regiones constantes de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera.

25 Además, a región Fc de inmunoglobulina incluye un derivado de la secuencia (mutante) de la misma, así como una secuencia de aminoácidos nativa. Un derivado de la secuencia de aminoácidos tiene una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos nativa debido a una deleción, una inserción, una sustitución no conservadora o conservadora o combinaciones de las mismas de uno o más restos de aminoácidos. Por ejemplo, en una Fc de IgG, los restos de aminoácidos conocidos por ser importantes en la unión, en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322 o 327 a 331, se pueden usar como una diana adecuada para la modificación. Además, son posibles otros varios derivados, incluyendo derivados que tienen una deleción de una región capaz de formar un enlace disulfuro, una deleción de varios restos de aminoácidos en el extremo N-terminal de una forma Fc nativa o una adición de un resto de metionina en el extremo N-terminal de una forma Fc nativa. Además, para eliminar las funciones efectoras, se puede producir una deleción en un sitio de unión del complemento, tal como un sitio de unión C1q-y un sitio de CCDA. Las técnicas para preparar dichos derivados de la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se desvelan en los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478.

35 En la materia se conocen intercambios de aminoácidos en proteínas u péptidos, que generalmente no alteran la actividad de moléculas, (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios que se producen más habitualmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, en ambas direcciones.

40 La región Fc, si se desea, se puede modificar mediante fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, y similares.

Los derivados de Fc mencionados anteriormente son derivados que exhiben actividades biológicas idénticas a las de la región Fc de la presente divulgación o una mejor estabilidad estructural, por ejemplo, contra el calor, pH o similares.

45 Además, estas regiones Fc se pueden obtener a partir de formas nativas aisladas de seres humanos y otros animales, incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos de células animales transformadas o microorganismos. En el presente documento, se pueden obtener a partir de una inmunoglobulina nativa mediante el aislamiento de las inmunoglobulinas enteras de los organismos humanos o animales y, después, el tratamiento de los mismos con una enzima proteolítica. La papaína digiere la inmunoglobulina nativa en las regiones Fab y Fc, y el tratamiento con pepsina dio lugar a la producción de fragmentos de pF^c y F(ab)₂. Estos fragmentos pueden someterse a, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño para aislar los fragmentos Fc o pF^c.

Preferentemente, una región Fc derivada de ser humano es una región Fc de inmunoglobulina recombinante que se obtiene a partir de un microorganismo.

55 Además, la región Fc de inmunoglobulina puede estar en forma de cadenas de azúcar nativos, el aumento de cadenas de azúcar en comparación con una forma nativa o disminución de las cadenas de azúcar en comparación con la forma nativa, o pueden estar en una forma desglucosilada. El aumento, disminución o eliminación de las cadenas de azúcar de Fc de inmunoglobulina puede conseguirse mediante procedimientos convencionales usados en la técnica, tales como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático, y un procedimiento de ingeniería

genética utilizando un microorganismo. La eliminación de las cadenas de azúcar de una región Fc da como resultado una fuerte disminución de la afinidad de unión con el complemento (c1q) y una disminución o pérdida de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo o la citotoxicidad dependiente del complemento, con lo que no se incluyen respuestas inmunitarias innecesarias *in vivo*. En este sentido, una región Fc de inmunoglobulina en una región Fc de inmunoglobulina desglucosilada o aglicosilada puede ser más adecuada como un vehículo de fármacos.

El término "desglucosilación", tal como se usa en el presente documento, significa eliminar enzimáticamente restos de azúcar de una región Fc, y el término "aglicosilación" significa una región Fc no glicosilada producida en forma no glicosilada por un procarionota, preferentemente *E. coli*.

Además, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una región Fc que deriva de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, o que se hace por combinaciones de los mismos o sus híbridos. Preferentemente, deriva de IgG o IgM, que están entre las proteínas más abundantes en la sangre humana y, lo más preferentemente, de IgG, que se sabe que potencia la semivida de las proteínas de unión a ligando.

El término "combinación", tal como se usa en el presente documento, significa que los polipéptidos que codifican regiones Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla del mismo origen están unidos a un polipéptido de cadena simple de un origen diferente para formar un dímero o multímero. Esto es, se puede formar un dímero o multímero a partir de dos o más fragmentos seleccionados del grupo que consiste en los fragmentos Fc de IgG, Fc de IgA, Fc de IgM, Fc de IgD y Fc de IgE.

El término "híbrido", tal como se usa en el presente documento, significa que las secuencias que codifican dos o más regiones Fc de inmunoglobulina de origen diferente están presentes en una región Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla. Son posibles diversos tipos de híbridos. Esto es, los híbridos del dominio puede estar compuesto por de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 y CH4 de Fc de IgG, Fc de IgM, Fc de IgA, Fc de IgE y Fc de IgD, y puede incluir una región bisagra.

Por otra parte, la IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, y la presente divulgación incluye combinaciones o híbridos de los mismos. Se prefieren las subclases IgG2 e IgG4 y, el más preferido es la región Fc de IgG4 que rara vez tiene funciones efectoras, tales como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Como vehículo del fármaco de la presente divulgación, la región Fc de inmunoglobulina más preferente es la región Fc aglicosilada derivada de IgG4 humana. La región Fc derivado de ser humano es más preferente que una región Fc no derivada de ser humano, que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y producir respuestas inmunitarias indeseables, tales como la producción de nuevos anticuerpos contra el antígeno.

La expresión "polímero no peptídico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero biocompatible que incluye dos o más unidades que se repiten unidas entre sí mediante cualquier enlace covalente con exclusión de un enlace peptídico.

El polímero no peptídico es polietilenglicol.

El enlazador peptídico que se utiliza en la proteína de fusión obtenida mediante un procedimiento de fusión dentro del marco convencional tiene inconvenientes en cuanto a que se puede escindir fácilmente *in vivo* mediante una enzima proteolítica y, por lo tanto, no se puede obtener un efecto suficiente de aumentar la semivida en suero del fármaco activo por un vehículo como se esperaba. Sin embargo, en la presente divulgación, el polímero que tiene resistencia a la enzima proteolítica puede usarse para mantener la semivida en suero del péptido similar a la del vehículo. Por lo tanto, en la presente invención se puede usar cualquier polímero no peptídico sin limitaciones, siempre que se trate de un polímero que tenga la función mencionada anteriormente, es decir, un polímero con resistencia a la enzima proteolítica *in vivo*. El polímero no peptídico tiene un peso molecular en el intervalo de 1 a 100 kDa, y, preferentemente, de 1 a 20 kDa. El polímero no peptídico, unido a la región Fc de inmunoglobulina, puede ser un polímero o una combinación de diferentes tipos de polímeros.

El polímero no peptídico tiene un grupo reactivo capaz de unirse a la región Fc de inmunoglobulina y el fármaco proteico.

El polímero no peptídico tiene un grupo reactivo en ambos extremos, que se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en un grupo reactivo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida, y un derivado de succinimida. El derivado de succinimida puede ser propionato de succinimidilo, carbonato de hidroxisuccinimidilo, de succinimidilcarboximetilo o de succinimidilo. En particular, cuando el polímero no peptídico tiene un grupo reactivo en ambos extremos, es eficaz en la unión en ambos extremos con un polipéptido activo y una inmunoglobulina con las reacciones no específicas mínimas. Un producto final generado mediante alquilación reductora por un enlace aldehído es mucho más estable que cuando se une mediante un enlace amida. El grupo reactivo aldehído se une de forma selectiva a un extremo N-terminal a un pH bajo y se une a un residuo de lisina para formar un enlace covalente a un pH alto, tal como un pH de 9,0.

Los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, el

5 polímero no peptídico puede poseer un grupo maleimida en un extremo y un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o un grupo butiraldehído en el otro extremo. Cuando un polietilenglicol que tiene un grupo hidroxilo reactivo en ambos extremos del mismo se usa como el polímero no peptídico, el grupo hidroxilo puede activarse para diversos grupos reactivos mediante reacciones químicas conocidas, o un polietilenglicol que tiene un grupo reactivo modificado disponible en el mercado puede usarse para preparar el conjugado de proteína.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una formulación de insulina de acción prolongada que comprende el conjugado de insulina de la presente divulgación.

10 El término "administración", tal como se usa en el presente documento, significa la introducción de una cantidad predeterminada de una sustancia en un paciente mediante un cierto procedimiento adecuado. El conjugado se puede administrar a través de cualquiera de las rutas comunes, siempre que pueda llegar a un tejido deseado. Se contemplan diversos modos de administración, incluyendo intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero la presente divulgación no está limitada a estos modos de administración de ejemplo. Sin embargo, ya que los péptidos son digeridos después de la administración oral, los principios activos de una composición para administración oral deben estar recubiertos o formularse para la protección contra la degradación en el estómago. Preferentemente, el conjugado puede administrarse en una forma inyectable. Además, la formulación de acción prolongada puede administrarse usando un cierto aparato capaz de transportar los principios activos a una célula diana.

20 La formulación de acción prolongada que comprende el conjugado de la presente divulgación puede incluir vehículos farmacéuticamente aceptables. Para administración oral, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un aglutinante, un lubricante, un disgregante, un excipiente, un solubilizante, un agente dispersante, un estabilizante, un agente de suspensión, un agente colorante y un perfume. Para preparaciones inyectables, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un agente tampón, un agente conservante, un analgésico, un solubilizante, un agente isotónico, y un estabilizante. Para las preparaciones para la administración tópica, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir una base, un excipiente, un lubricante, y un agente conservante.

25 La formulación de acción prolongada de la presente divulgación se puede formular en diversas formas de dosificación en combinación con los vehículos farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente. Por ejemplo, para administración oral, la formulación de acción prolongada puede formularse en comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para preparaciones inyectables, la formulación de acción prolongada se puede formular en una ampolla de una sola dosis o un envase multidosis. La formulación de acción

30 prolongada también puede formularse en soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas y preparaciones de liberación sostenida.

Ejemplos del vehículo, el excipiente y el diluyente adecuados para las formulaciones incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Además, las formulaciones incluyen, además, cargas, gomas anticoagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes y antisépticos.

40 La formulación de acción prolongada de la presente divulgación puede determinarse mediante varios factores relacionados, que incluyen los tipos de enfermedades a tratar, las vías de administración, la edad del paciente, el sexo, el peso y la gravedad de la enfermedad, así como por los tipos de fármaco como componente activo. Dado que la composición farmacéutica tiene una excelente duración y título *in vivo*, puede reducir notablemente la frecuencia de administración y la dosis de fármacos farmacéuticos.

La formulación de acción prolongada mantiene la duración y la estabilidad *in vivo* de la insulina a un nivel muy alto y, de este modo, se utiliza eficazmente para el tratamiento de la diabetes dependiente de insulina.

45 En todavía otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar un conjugado de insulina, que comprende las etapas de:

- (1) unir covalentemente un polímero no peptídico que tiene un grupo reactivo de derivados de aldehído, maleimida o succinimida en cada extremo del mismo, con un grupo amina o un grupo tiol de la región Fc de la inmunoglobulina;
- 50 (2) aislar un conjugado de la mezcla de reacción de (1), en el que el conjugado comprende la región de Fc de inmunoglobulina unida covalentemente con el polímero no peptídico; y
- (3) unir covalentemente la insulina al otro extremo del polímero no peptídico del conjugado aislado para producir un conjugado peptídico que comprende la región Fc de la inmunoglobulina e insulina, que están unidos a cada extremo del polímero no peptídico.

55 Preferentemente, el polímero no peptídico de la etapa (1) tiene un derivado de aldehído reactivo en el extremo del mismo y, más preferentemente, tres grupos de aldehído reactivo.

En todavía otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar un conjugado de insulina, que comprende las etapas de:

(1) unir covalentemente un polímero no peptídico que tiene un grupo reactivo aldehído en cada extremo del mismo al extremo N-terminal de la Fc de inmunoglobulina a pH 6,0;

(2) aislar un conjugado de la mezcla de reacción de (1), en el que el conjugado comprende la región de Fc de inmunoglobulina unida covalentemente con el polímero no peptídico en su extremo N-terminal; y

5 (3) unir covalentemente la insulina al otro extremo del polímero no peptídico del conjugado aislado para producir un conjugado peptídico que comprende la región Fc de la inmunoglobulina e insulina, que están unidos a cada extremo del polímero no peptídico.

En todavía otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar un conjugado de insulina, que comprende las etapas de:

10 (1) unir covalentemente un polímero no peptídico que tiene un grupo reactivo de derivados de aldehído, maleimida o succinimida en cada extremo del mismo, con un grupo amina o un grupo tiol de la insulina;

(2) aislar un conjugado de la mezcla de reacción de (1), en el que el conjugado comprende la insulina unida covalentemente con el polímero no peptídico; y

15 (3) unir covalentemente una región Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico del conjugado aislado para producir un conjugado peptídico que comprende la región Fc de la inmunoglobulina e insulina, que están unidos a cada extremo del polímero no peptídico.

En todavía otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar un conjugado de insulina, que comprende las etapas de:

20 (1) unir covalentemente un polímero no peptídico que tiene un grupo reactivo aldehído en cada extremo del mismo con un grupo amina de insulina;

(2) aislar un conjugado de la mezcla de reacción de (1), en el que el conjugado comprende la insulina unida covalentemente con el polímero no peptídico; y

25 (3) unir covalentemente una región Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico del conjugado aislado para producir un conjugado peptídico que comprende la región Fc de la inmunoglobulina e insulina, que están unidos a cada extremo del polímero no peptídico.

En todavía otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de deficiencia de insulina, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de la formulación de acción prolongada. Preferentemente, el trastorno por deficiencia de insulina es diabetes.

30 Tal como se usa en el presente documento, un sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, un caballo, una oveja, un gato, un perro, una vaca o un cerdo.

Modo

A continuación, en el presente documento se puede obtener una mejor comprensión de la presente divulgación mediante los ejemplos siguientes que se exponen para ilustrar, pero que no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

35 Ejemplo 1. Purificación de la región Fc de la inmunoglobulina pegilada

Para la pegilación de la Fc de inmunoglobulina en su extremo N-terminal, se utilizó PEG PropionALD 5K (3) (PEG que tiene tres grupos propilaldehído, NOF, Japón) para realizar la pegilación haciendo reaccionar la Fc de inmunoglobulina y PEG a 4 °C durante 4,5 horas y a una relación molar de 1:2, con una concentración de Fc de inmunoglobulina de 10 mg/ml. En ese momento, la reacción se realizó en una solución tampón de fosfato de potasio 40 100 mM a pH 6,0 y se añadió a la misma SCB (NaCNBH₃) 20 mM como agente reductor. Se purificó una Fc de inmunoglobulina mono-PEGilada a partir de la solución de reacción usando una columna Source 15Q (GE Healthcare).

Ejemplo 2. Preparación de conjugado de insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina

45 Para preparar un conjugado de insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina con un 90 % o más de pegilación en la fenilalanina (B1F) de la cadena beta de la insulina, se hicieron reaccionar la Fc de inmunoglobulina mono-PEGilada obtenida en el ejemplo 1 y la insulina a una relación molar de 4:1 y a 4 °C durante 20 horas, con una concentración de proteína total de 20 mg/ml. En ese momento, la reacción se realizó en una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM a pH 6,0 y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se sometió a purificación primaria usando una columna Source 15Q. A continuación, se llevó a 50 cabo purificación secundaria utilizando una columna Source 15ISO para obtener un conjugado insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina. Se usó una columna de exclusión por tamaño para analizar un 90 % o más de la pegilación de B1F del conjugado de insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina obtenido y los resultados se muestran en la figura 3.

Ejemplo 3. Preparación de conjugado de insulina lispro (Humalog)-PEG-Fc de inmunoglobulina

Se hicieron reaccionar la Fc de inmunoglobulina mono-PEGilada obtenida en el ejemplo 1 y la insulina lispro a una

relación molar de 4:1 y a 4 °C durante 20 horas, con una concentración de proteína total de 20 mg/ml. En ese momento, la reacción se realizó en una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM a pH 6,0 y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Una vez completada la reacción, la purificación se realizó de la misma manera que en el ejemplo 2.

5 Ejemplo 4. Preparación de conjugado de insulina glargina (Lantus)-PEG-Fc de inmunoglobulina

Se hicieron reaccionar la Fc de inmunoglobulina mono-PEGilada obtenida en el ejemplo 1 y la insulina glargina a una relación molar de 4:1 y a 4 °C durante 20 horas, con una concentración de proteína total de 20 mg/ml. En ese momento, la reacción se realizó en una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM a pH 6,0 y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Una vez completada la reacción, la purificación se realizó de la misma manera que en el ejemplo 2.

10 Ejemplo 5. Preparación de conjugado de insulina detemir (Levemir)-PEG-Fc de inmunoglobulina

Se hicieron reaccionar la Fc de inmunoglobulina mono-PEGilada obtenida en el ejemplo 1 y la insulina detemir a una relación molar de 4:1 y a 4 °C durante 20 horas, con una concentración de proteína total de 20 mg/ml. En ese momento, la reacción se realizó en una solución tampón de fosfato de potasio 100 mM a pH 6,0 y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Una vez completada la reacción, la purificación se realizó de la misma manera que en el ejemplo 2.

15 Ejemplo 6. Medición de la semivida de eliminación *in vivo* del conjugado de insulina de acción prolongada

Para analizar la duración *in vivo* del conjugado de insulina de acción prolongada, se usaron ratas SD macho normales para realizar el análisis farmacocinético. Se inyectó a las ratas SD macho normales por vía subcutánea insulina nativa y el conjugado de insulina de acción prolongada a una dosis de 100 µg/kg (basada en insulina) una vez y, luego, se midieron los cambios dependientes del tiempo en el nivel de suero usando un kit de ELISA y se calcularon los parámetros farmacocinéticos a partir de los valores medidos usando software Winnolin 5.2. La semivida de eliminación *in vivo* del conjugado de insulina de acción prolongada fue de 17,67 horas, que es aproximadamente 30 veces más larga que la insulina nativa de 0,58 horas (figura 1).

25 Ejemplo 7. Ensayo de eficacia *in vivo* sobre el conjugado de derivado de insulina

Para comparar la eficacia *in vivo* entre los conjugados de derivados de insulina, se usaron ratas con diabetes inducida con estreptozotocina para analizar sus efectos hipoglucémicos. Se mantuvo en ayuno a las ratas normales durante 16 horas y se les inyectó por vía intraperitoneal estreptozotocina en solución tampón de ácido cítrico 10 mM (pH 4,5) a una dosis de 60 mg/kg para inducir diabetes. Cuando el nivel de glucosa en sangre de las ratas alcanzó 500 mg/dl o mayor, se inyectó a las ratas por vía subcutánea el conjugado de insulina, el conjugado de insulina detemir o el conjugado de insulina lispro a una dosis de 0,5 mg/kg una vez y, después, se compararon sus efectos hipoglucémicos. Los efectos hipoglucémicos del conjugado de insulina y del conjugado de insulina lispro se mantuvieron durante aproximadamente 4 días después de la inyección y, 5 días después de la inyección, aumentó el nivel de glucosa en sangre. El conjugado de insulina detemir también mostró los efectos hipoglucémicos, pero los efectos fueron menores que los del conjugado de insulina o el conjugado de insulina lispro a la misma dosis (figura 2).

30 Ejemplo 8. Identificación del sitio de unión del conjugado de insulina-PEG 5 K-Fc de insulina

Con el fin de identificar el sitio de unión de la insulina a PEG 5 K-Fc de inmunoglobulina, se realizó el mapeo de Glu-C. Se añadieron 20 µg de endoproteinasa Glu-C (1 mg/ml) a 100 µg de insulina-PEG 5 K-Fc de inmunoglobulina (1 mg/ml). La solución de reacción fue HEPES 50 mM a pH 7,5 y la mezcla se hizo reaccionar a 25 °C durante 8 horas. Posteriormente, se añadieron 10 µl de HCl 1 N para terminar la reacción. El mapeo se realizó mediante cromatografía HPLC inversa. Los resultados mostraron el cambio máximo en el extremo N-terminal de la cadena beta de insulina, lo que indica que PEG 5K-Fc de inmunoglobulina se une al extremo N-terminal de la cadena beta de la insulina (figuras 4a-c).

45 Columna: Jupiter C18 4,6 x 250 mm, 5 µm (Phenomenex)
Fase móvil A: 20 % de NaSO₄ 0,1 M (pH 2,0), 10 % de CAN
Fase móvil B: 20 % de NaSO₄ 0,1 M (pH 2,0), 40% de CAN
Gradiente 0 %de B en 10 min > 0-10 % de B en 5 min > 10-70 % de B en 60 min

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> HANMI HOLDINGS CO., LTD.

<120> Conjugado de insulina usando un fragmento de inmunoglobulina

<130> PA110256/KR

<150> KR10-2010-0030575

<151> 02/04/2010

ES 2 625 686 T3

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

5

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

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

10

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

15

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de insulina preparado mediante la unión de insulina con una región Fc de inmunoglobulina a través de un polietilenglicol, en el que el polietilenglicol está unido al amino terminal de la cadena beta de insulina.
- 5 2. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la insulina es insulina nativa, insulina lispro, insulina detemir o insulina glargina.
3. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un extremo del polietilenglicol está unido al grupo amina del amino terminal de la cadena beta de insulina y el otro extremo del polietilenglicol está unido a un grupo amina o grupo tiol de la región Fc de la inmunoglobulina.
- 10 4. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región Fc de inmunoglobulina está aglicosilada.
5. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región Fc de inmunoglobulina está compuesta por de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en los dominios CH1, CH2, CH3 y CH4.
- 15 6. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la región Fc de inmunoglobulina comprende además una región bisagra.
7. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc derivada de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.
- 20 8. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 7, en el que cada dominio de la región Fc de inmunoglobulina es un dominio híbrido de un origen diferente derivado de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.
9. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la región Fc de inmunoglobulina es un dímero o un multímero compuesto por inmunoglobulinas de cadena sencilla del mismo origen.
10. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4.
- 25 11. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4 aglicosilada humana.
12. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el grupo reactivo del polietilenglicol se selecciona del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida.
- 30 13. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el derivado de succinimida es propionato de succinimidilo, carbonato de succinimidilcarboximetilo, de hidroxisuccinimidilo o de succinimidilo.
14. El conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el polietilenglicol tiene un grupo reactivo aldehído en ambos extremos.
- 35 15. Una formulación de insulina de acción prolongada que tiene una duración y estabilidad *in vivo* mejoradas, que comprende el conjugado de insulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
16. Un procedimiento de preparación del conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
 - (1) unir covalentemente un polietilenglicol que tiene un grupo reactivo de derivados de aldehído, maleimida o succinimida en cada extremo del mismo, con un grupo amina o un grupo tiol de la región Fc de una inmunoglobulina;
 - 40 (2) aislar un conjugado de la mezcla de reacción de (1), en el que el conjugado comprende la región de Fc de inmunoglobulina unida covalentemente con el polietilenglicol; y
 - (3) unir covalentemente la insulina al otro extremo del polietilenglicol del conjugado aislado para producir un conjugado peptídico que comprende la región Fc de la inmunoglobulina y la insulina, que están unidos a cada
 - 45 extremo del polietilenglicol.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende las etapas de:
 - (1) unir covalentemente un polietilenglicol que tiene un grupo reactivo aldehído en cada extremo del mismo al extremo N-terminal de una Fc de inmunoglobulina a pH 6,0;
 - 50 (2) aislar un conjugado de la mezcla de reacción de (1), en el que el conjugado comprende la región Fc de inmunoglobulina unida covalentemente con el polietilenglicol en su extremo N-terminal; y

(3) unir covalentemente la insulina al otro extremo del polietilenglicol del conjugado aislado para producir un conjugado peptídico que comprende la región Fc de la inmunoglobulina y la insulina, que están unidos a cada extremo del polietilenglicol.

5 18. Un procedimiento de preparación del conjugado de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

(1) unir covalentemente un polietilenglicol que tiene un grupo reactivo de derivados de aldehído, maleimida o succinimida en cada extremo del mismo, con un grupo amina o un grupo tiol de la insulina;

(2) aislar un conjugado de la mezcla de reacción de (1), en el que el conjugado comprende la insulina unida covalentemente con el polietilenglicol; y

10 (3) unir covalentemente una región Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polietilenglicol del conjugado aislado para producir un conjugado peptídico que comprende la región Fc de la inmunoglobulina y la insulina, que están unidos a cada extremo del polietilenglicol.

19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende las etapas de:

15 (1) unir covalentemente un polietilenglicol que tiene un grupo reactivo aldehído en cada extremo del mismo con un grupo amina de insulina;

(2) aislar un conjugado de la mezcla de reacción de (1), en el que el conjugado comprende la insulina unida covalentemente con el polietilenglicol; y

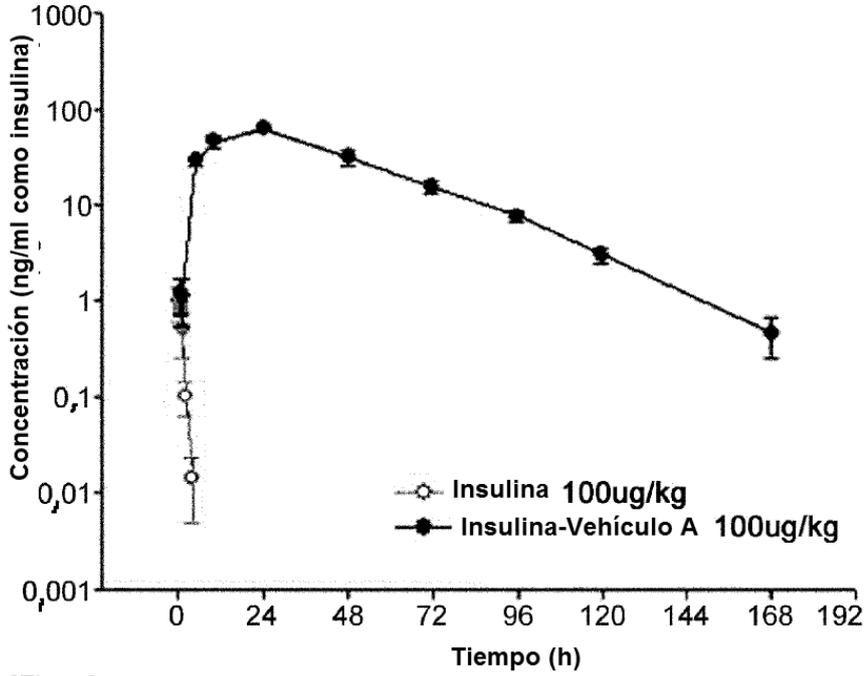
20 (3) unir covalentemente una Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polietilenglicol del conjugado aislado para producir un conjugado peptídico que comprende la región Fc de la inmunoglobulina y la insulina, que están unidos a cada extremo del polietilenglicol.

20. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o la formulación de acuerdo con la reivindicación 15, para su uso en un procedimiento de tratamiento médico.

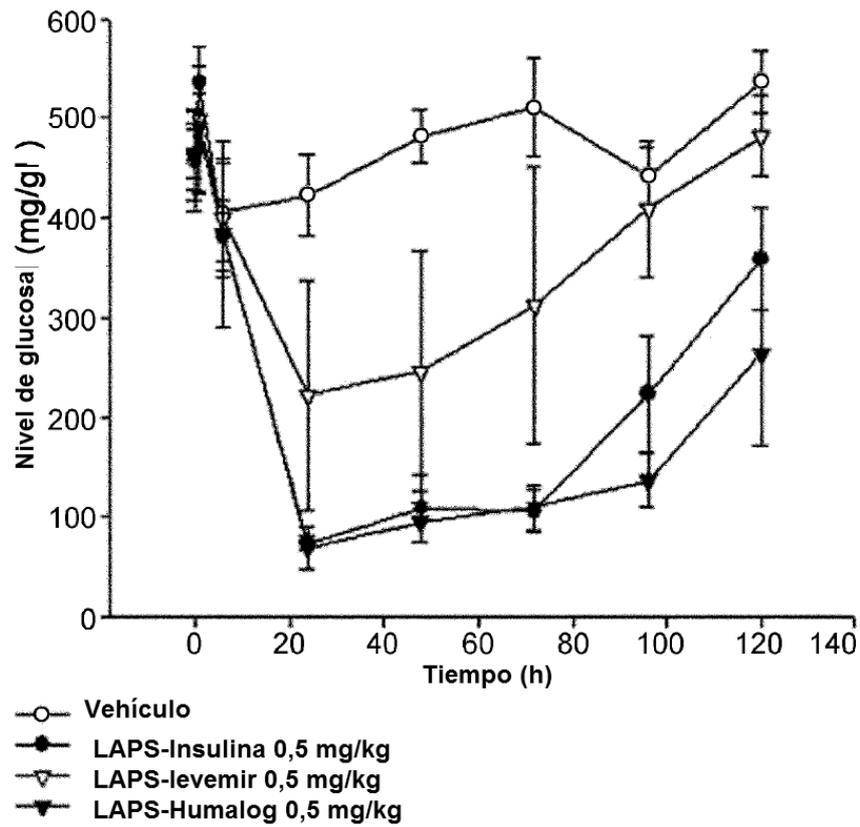
25 21. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o la formulación de acuerdo con la reivindicación 15, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno de deficiencia de insulina.

22. El conjugado o la formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el trastorno de deficiencia de insulina es diabetes.

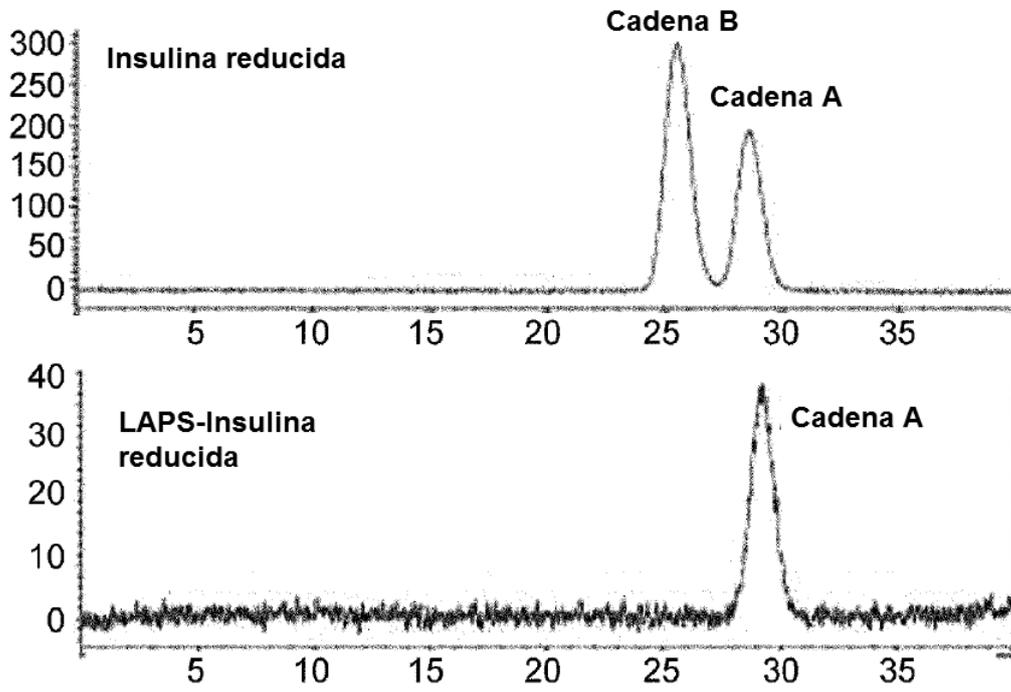
[Fig. 1]



[Fig. 2]

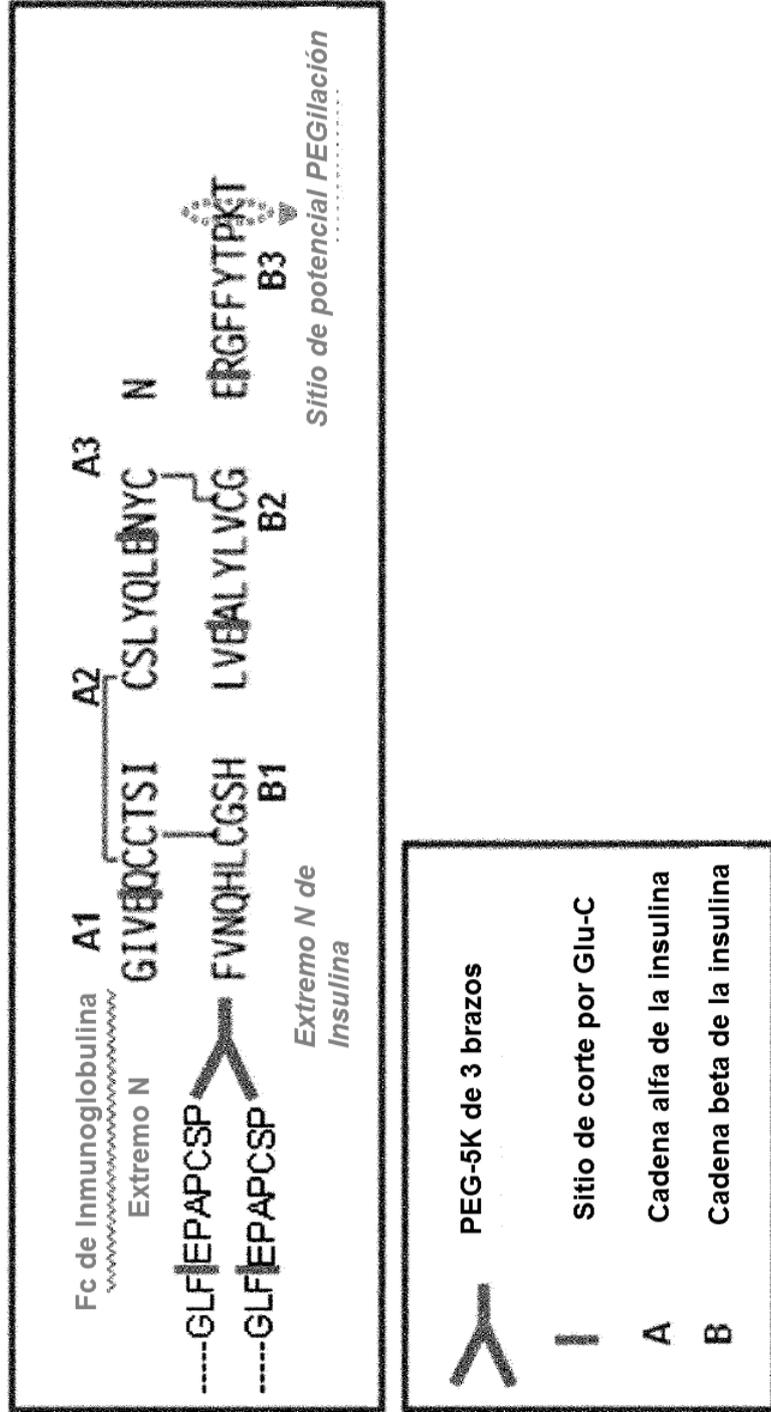


[Fig. 3]

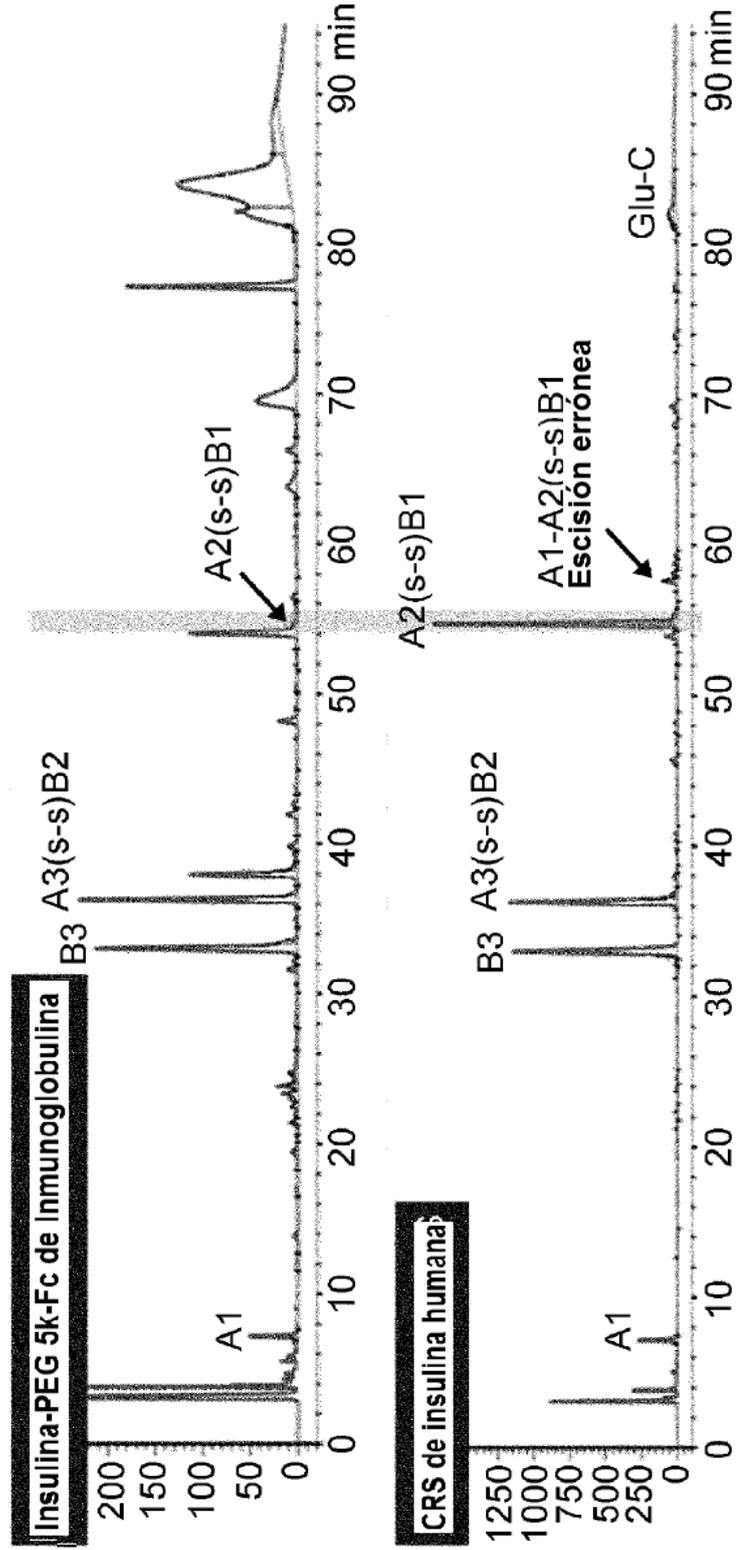


[Fig. 4a]

Fragmentación prevista de LAPS-Insulina digerida con Glu-C



[Fig. 4b]



[Fig. 4c]

