

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 528**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/61** (2007.01)

**C07K 14/62** (2006.01)

**C07K 14/535** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2007** **E 13163525 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017** **EP 2630972**

54 Título: **Polisialilación N-terminal**

30 Prioridad:

**25.07.2006 EP 06117830**

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

**22.12.2017**

73 Titular/es:

**LIPOXEN TECHNOLOGIES LIMITED (100.0%)  
London BioScience Innovation Centre 2 Royal  
College Street  
London NW1 0NH, GB**

72 Inventor/es:

**JAIN, SANJAY y  
ZHANG, RONGSHENG**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 647 528 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

## Polisialilación N-terminal

La presente invención se refiere a nuevos derivados de polisacáridos de insulina y a los métodos para producir tales derivados. Los derivados son útiles para mejorar la estabilidad, farmacocinética y farmacodinámica de la insulina.

5 La diabetes es un trastorno del metabolismo de los carbohidratos y es el resultado de la producción insuficiente de, o la reducción de la sensibilidad a la insulina. La insulina se sintetiza en las células beta de los islotes pancreáticos de Langerhans y es necesaria para el uso normal de la glucosa por la mayoría de las células en el cuerpo. En personas con diabetes, se inhibe la capacidad normal para usar la glucosa, lo que aumenta los niveles de azúcar en la sangre (hiperglucemia).

10 Existen dos variedades de la diabetes. El tipo I es la diabetes mellitus dependiente de insulina, o IDDM. La IDDM se conocía anteriormente como diabetes con inicio en la juventud. En la IDDM, la insulina no es secretada por el páncreas y debe ser proporcionada desde una fuente externa. La diabetes con inicio en edad adulta Tipo II puede controlarse normalmente con la dieta, aunque en algunos casos avanzados se requiere insulina.

15 Antes del aislamiento de la insulina en la década de 1920, la mayoría de los pacientes morían en de un corto período de tiempo después de la aparición de la enfermedad. La diabetes no tratada conduce a la cetosis, la acumulación de cetonas (productos de descomposición de las grasas) en la sangre; esto es seguido por acidosis (acumulación de ácido en la sangre) con náuseas y vómitos. A medida que los productos tóxicos de los carbohidratos desordenados y del metabolismo de las grasas se siguen acumulando, el paciente entra en coma diabético.

20 El tratamiento de la diabetes requiere generalmente de inyecciones regulares de insulina. Esto resulta en una mejoría clínica, dramática para salvar la vida. Sin embargo, debido a la incomodidad de las inyecciones de insulina, la insulina ha sido el foco de esfuerzos masivos para mejorar su administración y la bioacumulación.

25 La molécula de insulina consta de dos cadenas de aminoácidos unidos por enlaces disulfuro (pm 5804). Las células-[beta] de los islotes pancreáticos secretan un solo precursor de la cadena de insulina, conocido como proinsulina. La proteólisis de la proinsulina resulta en la eliminación de cuatro aminoácidos básicos (números 31, 32, 64 y 65 en la cadena proinsulina: Arg, Arg, Lys, Arg respectivamente) y el polipéptido conector ("C"). En la molécula de insulina de dos cadenas resultante, la cadena A tiene glicina en el extremo amino, y la cadena B tiene fenilalanina en el extremo amino.

30 La insulina puede existir como un monómero, dímero o un hexámero formado a partir de tres de los dímeros. El hexámero se coordina con dos átomos de  $Zn^{2+}$ . La actividad biológica reside en el monómero. Aunque hasta hace poco se usó la insulina bovina y porcina casi exclusivamente para tratar la diabetes en humanos, se conocen numerosas variaciones en la insulina entre especies. La insulina porcina es la más similar a la insulina humana, de la que difiere sólo en que tiene una alanina en lugar del residuo de treonina en el C-terminal de la cadena B. A pesar de estas diferencias la mayoría de la insulina de mamífero tiene una actividad específica comparable. Hasta hace poco, los extractos animales proporcionaban toda la insulina usada para el tratamiento de la enfermedad. El advenimiento de la tecnología recombinante permite la fabricación a escala comercial de la insulina humana (por ejemplo, insulina Humulin(TM), disponible comercialmente de Eli Lilly and Company, Indianapolis, Ind.).

35 Se han realizado intentos para derivar la insulina para mejorar sus propiedades farmacocinéticas. Existe un producto en el mercado, PEG-insulina (Nektar Therapeutics). El PEG es un polímero neutro, soluble en agua, no tóxico que comprende cualquier número de unidades de repetición de óxido de etileno. La PEGilación se diseña para aumentar el tamaño de la molécula activa y en última instancia, mejorar el rendimiento de los fármacos mediante la optimización de la farmacocinética, el aumento de la biodisponibilidad, y la disminución de la inmunogenicidad y la frecuencia de dosificación. El diseño y desarrollo de PEG-insulina se describe adicionalmente en WO2004091494.

40 Se conoce una variedad de métodos para la producción de derivados de insulina PEGilados. Davis y otros, (patente de Estados Unidos núm. 4,179,337) describen la síntesis de una construcción de PEG-insulina usando tricloro-s-triazina (cloruro cianúrico) como el enlazador entre el PEG y la proteína. Siguen un esquema sintético en el que un gran exceso (50 veces) de PEG activado con cloruro cianúrico (2000 Da) se hizo reaccionar con la insulina en tampón de borato (pH 9.2) durante 2 horas. Los inventores fueron capaces de producir conjugados de PEG-insulina parcialmente activos (aproximadamente 50%), que eran no inmunogénicos y no antigénicos. Obermeier y otros, (Patente canadiense núm. 1,156,217), encontró que la preparación de conjugados de PEG-insulina de acuerdo con la patente de Davis mencionada anteriormente producía una mezcla no uniforme de conjugados que contienen aproximadamente 50% de tri-PEG-insulina, y las otras combinaciones posibles de derivados de PEG-insulina (mono- y di-PEG-insulinas) no fueron sustituidas en el residuo PheB1.

45 Obermeier y otros, (Patente canadiense núm. 1,156,217) describe la síntesis de conjugados de PEG-insulina modificada específicamente en el residuo PheB1. La base de su invención implica la protección de las aminas reactivas en los residuos GlyA1 y LysB29 con grupos terc-butiloxycarbonilo (t-Boc) o metilsulfoniletiloxycarbonilo (Msc) en disolventes orgánicos (por ejemplo, DMF, DMSO, piridina, etc.) bajo condiciones alcalinas. A partir de la mezcla compleja de (mono-, di-, y tri-) insulinas protegidas la especie de insulina N.sup..alpha.A1, N.sup..epsilon.B29-bis-

protegida se aisló por técnicas cromatográficas convencionales. A partir del aislamiento, la insulina N.sup..alpha.A1, N.sup..epsilon.B29-bis-protegida pura se hizo reaccionar con (por ejemplo, cloruro ácido o isocianato) un derivado activado de PEG con la eliminación posterior de los grupos protectores mediante el uso de técnicas comunes para la química de péptidos. Los inventores observaron que los grupos amino de GlyA1 and LysB29 fueron más reactivos que el grupo amino de PheB1 bajo condiciones de reacción alcalinas. Determinaron que sus conjugados de mPEG(1500)-B1-insulina específicos de sitio tenían un 100% de efecto de la insulina (calculado sobre una base molar) en la reducción de los niveles de azúcar en la sangre en los conejos.

Geiger y otros, (1980) y Ehrat y otros, (1983) describen aductos de PEG-insulina específicamente modificados en el residuo PheB1 preparados mediante el uso de un esquema protección/conjugación/desprotección similar al método de múltiples etapas descrito por Obermeier y otros, Geiger y otros, y Ehrat y otros, y observaron que el conjugado de PEG(1500)-B1-insulina era mucho menos antigénico y mucho más estable (para las enzimas hepáticas) que la insulina nativa. Otras preparaciones de PEG-insulina (Caliceti y otros, 1999; Uchio y otros, 1999; Hinds y otros, 2002 son: 1) centradas en los esquemas básicos de protección/conjugación/desprotección de tres etapas mencionadas anteriormente, 2) resultan en modificación no específica de la molécula de insulina, o 3) no producen los conjugados más eficaces, es decir, PEG-B1-insulinas.

Liu y otros, (patente de Estados Unidos núm. 6,323,311 B1) describen un método útil para la síntesis de conjugados de PEG-B1-insulina. Este método es una extensión de los esquemas de protección/conjugación/desprotección de tres etapas de Obermeier, pero no requiere el aislamiento de productos intermedios de reacción entre las etapas (es decir, síntesis en un solo recipiente). Por lo tanto, la insulina está protegida en los residuos GlyA1 y LysB29, reaccionó inmediatamente con PEG, y posteriormente se desprotege antes de cualquier aislamiento de especies. Los inventores reivindican que su reacción en un solo recipiente puede producir hasta 50% del isómero posicional correcto (es decir, PEG-B1-insulina) y 30% de insulina sin reaccionar que puede ser reciclada para la derivación posterior. Suponiendo que la preparación de estas construcciones se lleva a cabo de forma acelerada, se necesitarían por lo menos cinco días para la terminación. Además, la invención requiere grandes excesos de reactivo de PEG para alcanzar resultados aceptables. Aunque los productos de esta invención pueden ser eficaces, su preparación requiere todavía que la proteína se someta a tres etapas de reacción en entornos adversos a las proteínas (alto y bajo pH) durante periodos de tiempo extendidos.

La invención en US2007083006 se dirige a las deficiencias de los métodos de la técnica anterior para la PEGilación de las insulinas proporcionando un método por la preparación sencilla de derivados de insulina de alta pureza específicamente PEGilados en el extremo N-terminal de la cadena B de la insulina (PheB1) en una sola etapa. En contraste a la experiencia previa (por ejemplo, Caliceti y Otros, 1999, supra), que indican que la PEGilación en PheB1 es el producto de reacción menos probable, el presente método emplea condiciones específicas de control del pH, el uso de un quelante de iones metálicos y la adición de disolvente orgánico para mejorar la reactividad relativa del terminal amino PheB1 en donde este se convierte en el sitio predominante de PEGilación. Considerando las numerosas propiedades beneficiosas impartidas a la insulina (por ejemplo, disminución de la inmunogenicidad/antigenicidad; aumento proteolítico, estabilidad física y química; aumento de la vida media de circulación; aumento de la solubilidad acuosa/orgánica; actividad biológica completa) a través de la PEGilación específica de sitio en el residuo PheB1, un proceso simple, rentable y fácilmente escalable para lograr este resultado sería un avance significativo en la técnica.

En vista de la técnica anterior, existe una necesidad de proporcionar mejores derivados de insulina que pueden usarse en la terapia humana y animal y tienen estabilidad, vida media optimizada y baja toxicidad. Hemos encontrado que la unión de los PSA a la insulina imparte tales propiedades.

Los ácidos polisialícos (PSA) son polímeros no ramificados de ácido siálico de origen natural producidos por ciertas cepas bacterianas y en los mamíferos en ciertas células. Pueden producirse en varios grados de polimerización de  $n$  = aproximadamente 80 o más residuos de ácido siálico hacia abajo a  $n$  = 2 mediante hidrólisis ácida limitada o mediante digestión con neuraminidasa, o mediante fraccionamiento de las formas del polímero natural, derivadas de bacterias.

En años recientes, las propiedades biológicas de los ácidos polisialícos, particularmente las del ácido polisialílico homopolimérico alfa-2,8 enlazado, han sido explotadas para modificar las propiedades farmacocinéticas de las proteínas y moléculas de bajo peso molecular del fármaco. La derivación del ácido polisialílico da lugar a mejoras espectaculares en la vida media en circulación de un número de proteínas terapéuticas, que incluyen la catalasa y la asparaginasa, y permite además que tales proteínas se usen en vista de que los anticuerpos pre-existentes aumentan como una consecuencia indeseable (y a veces inevitable) de la exposición previa a la proteína terapéutica [Fernandes and Gregoriadis, 1996, 1997]. El ácido polisialílico alfa-2,8 enlazado ofrece una alternativa atractiva a PEG, es un polímero biodegradable inmunológicamente invisible que es parte natural del cuerpo humano, y el cual se degrada a través de neuraminidasas de tejido a ácido siálico, un sacárido no tóxico.

Hemos descrito previamente métodos para la fijación de polisacáridos (en particular PSA) a los agentes terapéuticos, tales como las proteínas [documentosUS-A-5846,951; WO-A-0187922. Algunos de estos métodos dependen tras la derivación química del extremo 'no reductor' del polímero para crear una porción aldehído reactiva de la proteína que reacciona en los grupos de amina primaria. Una unidad terminal de ácido siálico no reductor, ya que contiene dioles

vecinales, puede oxidarse fácilmente (y selectivamente) con peryodato para producir una forma mono-aldehído, que es mucho más reactivo hacia las proteínas, y que comprende un elemento adecuadamente reactivo para la unión de proteínas a través de la aminación reductora y otras químicas. La reacción se ilustra en las Figuras 1 y 2 en donde

5 La Figura 1 muestra la oxidación del ácido colomínico (ácido polisialílico alfa-2,8 enlazado de *E. coli*) con peryodato de sodio para formar un aldehído reactivo de la proteína en el extremo no reductor; y

La Figura 2 muestra la reducción selectiva de la base de Schiff con cianoborohidruro de sodio para formar un enlace covalente irreversible estable con el grupo amino de la proteína.

10 Los inventores han descrito en publicaciones previas, por ejemplo en *Biochimica et Biophysica Acta* (2003), la síntesis de la insulina polisialiladas. En esta referencia ácido colomínico de 22 kDa y 39 kDa se oxidan y reaccionan con los grupos amino de la insulina humana recombinante. La polidispersidad de los CA usados es 1.33 y 1.40, que es demasiado grande para uso terapéutico.

También hemos descrito en nuestra solicitud de patente anterior, publicada como WO2005/016974, la síntesis de conjugados de ácido colomínico-insulina. Sin embargo, en esta solicitud, los conjugados no son todos específicamente N-terminal, y se produce una variedad de conjugados.

15 Los subproductos pueden generarse de manera no intencional durante las reacciones de conjugación convencionales descritas anteriormente mediante por ejemplo, la reacción del ácido colomínico con cadenas laterales de aminoácidos. Estos pueden ser suficientes para ser problemáticos en la fabricación de los conjugados químicamente definidos de acuerdo con las autoridades reguladoras para el uso terapéutico en el hombre y los animales.

20 No es sencillo purificar el producto de reacción previsto (por ejemplo el producto monopolisialilado) separado de los diferentes productos no deseados, ya que las características fisicoquímicas de la mayor parte de los productos de reacción son similares. Esto significa que las técnicas como la cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de permeación en gel (que separan sobre la base de la carga y tamaño respectivamente) producen perfiles de purificación pobres.

25 De acuerdo con un primer aspecto de esta invención, se proporciona una composición que comprende una población de derivados de ácido polisacárido de una proteína, en donde la proteína es insulina o una proteína similar a la insulina, y el ácido polisialílico, comprende entre 2 y 125 unidades de ácido siálico, y en donde la población consiste sustancialmente solo de derivados de N-terminal de la proteína.

30 De aquí en adelante, cuando se usa el término insulina, se pretende cubrir también las proteínas similares a la insulina. Por proteína similar a la insulina, se entiende una proteína que tiene una actividad equivalente a la de insulina. La insulina disminuye típicamente la concentración de glucosa en la sangre. También aumenta la permeabilidad celular a monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos, y acelera la glucólisis, el ciclo de las pentosas fosfato y la síntesis de glucógeno en el hígado. La proteína similar a la insulina tiene al menos 50% de la actividad de la insulina humana derivada de Swissprot con número de acceso P01308.

35 Los mutantes de insulina que tienen la actividad requerida, como se detalló anteriormente, pueden usarse también. Una proteína "similar a la insulina" también puede ser denominada como un "homólogo de insulina". Si dos secuencias son homólogas se calcula de forma rutinaria usando un porcentaje de similitud o identidad, términos que son bien conocidos en la técnica. Las secuencias deben ser comparadas con la SEQ ID NO: 1 que es el precursor no procesado de la insulina humana. Los residuos 25-54 corresponden a la cadena de insulina B y los residuos 90-110 corresponden a la cadena de insulina A. Las secuencias homólogas también pueden compararse con la forma activa de la insulina humana.

40 Los homólogos tienen 90% o más, tí como 95% o 99% de identidad a nivel de en los ácidos nucleicos o aminoácidos. Un número de programas están disponibles para calcular la similitud o identidad; programas preferidos son los programas BLASTn, BLASTp y BLASTx, corren con los parámetros por defecto, disponibles en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Por ejemplo, 2 secuencias de aminoácidos pueden compararse usando el programa BLASTn con parámetros por defecto (puntuación = 100, longitud de palabra = 11, valor esperado = 11, filtro de baja complejidad = encendido). Los niveles de homología anteriores se calculan usando estos parámetros por defecto.

La insulina puede ser natural, es decir, derivada de un ser humano o animal, o sintética, por ejemplo obtenida por un método recombinante.

50 Como es bien conocido en la técnica, la insulina comprende dos cadenas de péptidos. Preferiblemente, en esta invención, la insulina se derivatiza con el polisacárido en el extremo N-terminal de su cadena B.

Por "población" se entiende que existe más de un derivado de polisacárido en la composición. Los derivados pueden comprender los mismos o diferentes números de unidades de sacáridos. Preferiblemente, la polidispersidad del polisacárido en la composición es menos de 1.3, con mayor preferencia menos de 1.1.

En la población, esencialmente todo de las proteínas se derivan solamente en el extremo N-terminal. Puesto que hay dos cadenas de péptidos en la insulina, hay dos unidades N terminales. Preferiblemente, al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de las cadenas B en la población se derivan en el extremo N-terminal con ácido polisiálico. El N-terminal de las cadenas A no necesita ser derivado.

- 5 El grado de derivación en el N-terminal puede determinarse mediante técnicas estándar en la técnica tales como mapeo de péptidos o degradación de Edman. El ácido polisiálico tiene al menos 2, más preferiblemente al menos 5, lo más preferiblemente al menos 10, por ejemplo al menos 50 unidades de ácido siálico.

10 El ácido polisiálico preferiblemente consiste esencialmente solamente de unidades de ácido siálico. Sin embargo, el polisacárido puede tener unidades distintas de ácido siálico en la molécula. Por ejemplo, las unidades de ácido siálico pueden alternar con otras unidades de sacárido. Preferiblemente, sin embargo, el polisacárido consiste esencialmente en unidades de ácido siálico.

15 El polisacárido es ácido polisiálico, o sea, un polisacárido que comprende al menos 2 unidades de ácido siálico unidas entre sí a través de enlaces  $\alpha$ -2-8 o  $\alpha$ -2-9. Un ácido polisiálico adecuado tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 2 a 100 kDa, preferiblemente en el intervalo de 1 a 35 kDa. El ácido polisiálico más preferido tiene un peso molecular en el intervalo de 10 a 20 kDa, típicamente de aproximadamente 14 kDa. Más preferiblemente, el ácido polisiálico se deriva de una fuente bacteriana, por ejemplo el polisacárido B de *E. coli* K1, *N. meningitidis*, *Maraxella liquefaciens* o *Pasteurella aeruginosa* o polisacárido K92 de la cepa de *E. coli* K92. Con la máxima preferencia es el ácido colomínico de *E. coli* K1.

20 El ácido polisiálico puede estar en forma de una sal o del ácido libre. Puede estar en una forma hidrolizada, de manera que el peso molecular se ha reducido después de la recuperación a partir de una fuente bacteriana. El ácido polisiálico puede ser el material que tiene una amplia difusión de pesos moleculares tales como los que tienen una polidispersidad de más de 1.3, por ejemplo tanto como 2 o más. Preferiblemente, la polidispersidad de peso molecular es de menos de 1.3 o 1.2, preferiblemente menos de 1.1, por ejemplo tan bajo como 1.01.

25 Típicamente, el compuesto de esta invención es un derivado de ácido polisiálico de la insulina y comprende 2-125 unidades de ácido siálico. Más típicamente, el compuesto comprende 10-80 unidades de ácido siálico, preferiblemente 20 a 60 unidades de ácido siálico, lo más preferiblemente 40-50 unidades de ácido siálico.

30 Los derivados de polisacárido en el primer aspecto de esta invención son conjugados enlazados covalentemente entre el N-terminal de insulina y el polisacárido. El enlace covalente puede ser un enlace amida entre un grupo carboxilo y un grupo amino. Otro enlace por el que la insulina puede unirse de forma covalente al polisacárido es a través de una base de Schiff. Los grupos adecuados para conjugar a las aminas se describen adicionalmente en el documento WO2006/016168.

35 En la invención, el polisacárido puede ser un polisacárido de origen natural, o un derivado de un polisacárido de origen natural, por ejemplo, un polisacárido que se ha derivatizado mediante una reacción de uno o más grupos activos en los residuos de sacárido, o que se ha unido covalentemente a un grupo de derivación en el extremo de la cadena de polisacárido.

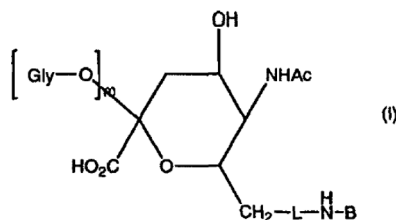
El polisacárido puede unirse a la insulina a través de su unidad terminal reductora o no reductora.

Los métodos para unir los polisacáridos a las proteínas son bien conocidos en la técnica y se describen con más detalle en el documento WO92/22331 y WO-A-0187922. Los métodos preferidos en esta invención se describen con más detalle a continuación. Los métodos se describen además en las Figuras 1 y 2 de esta solicitud.

40 El polisacárido puede estar unido a la insulina a través de su unidad terminal reductora y no-reductora. Esto significa que una cadena de polisacárido puede enlazarse a dos proteínas insulina, es decir, derivarse tanto en su extremo reductor como no reductor.

45 El polisacárido puede enlazarse al péptido de insulina directamente, es decir, como se muestra en las Figuras 1 y 2, o a través de un enlazador. Los enlazadores adecuados se derivan de reactivos que contienen N-maleimida, vinilsulfona, N-yodoacetamida, ortopiridilo o N-hidroxisuccinimida. El enlazador puede ser bioestable o biodegradable y comprender, por ejemplo, un polipéptido o un oligómero sintético. El enlazador puede derivarse de una porción bifuncional, como se describió adicionalmente en el documento WO2005/016973. Un reactivo bifuncional adecuado es, por ejemplo, Bis-NHS. El reactivo puede tener la fórmula general Z-R<sup>1</sup>-Z en donde cada Z es un grupo funcional y puede ser el mismo o diferente y R<sup>1</sup> es un radical orgánico bifuncional. Preferiblemente, R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en alcanodiilo, arileno, alcarileno, heteroarileno y alquilheteroarileno, cualquiera de los cuales puede 50 sustituirse y/o interrumpirse por carbonilo, éster, sulfuro, éter, amida y/o enlaces de amina. Particularmente se prefiere alcanodiilo de C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Más preferiblemente, R<sup>1</sup> corresponde a la porción apropiada del reactivo bifuncional adecuado.

Un derivado de polisacárido preferido es el de fórmula general (I)



en donde m es al menos uno;

HNB se deriva de B-NH<sub>2</sub> que es el N-terminal de la insulina o un péptido similar a la insulina;

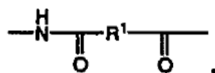
L es un enlace, un grupo de enlace, o comprende un polipéptido o un oligómero sintético;

5 GlyO es una unidad de ácido siálico;

en donde el grupo de enlace, si está presente, es de la fórmula general -Y-C(O)-R<sup>1</sup>-C(O)-;

en donde Y es NR<sup>2</sup> o NR<sup>2</sup>-NR<sup>2</sup> y R<sup>1</sup> es un radical orgánico bifuncional como se definió anteriormente; y R<sup>2</sup> es H o alquilo de C<sub>1-6</sub>.

10 En este aspecto de la invención, la insulina se enlaza al extremo no reductor del polisacárido. La unidad de polisacárido terminal es una unidad de ácido siálico. Las otras unidades de sacárido en el polisacárido se representan por GLyO y pueden ser el mismo o diferente. Cuando la insulina se une directamente al polisacárido, el grupo L es un enlace. Sin embargo, el grupo L, alternativamente, puede derivarse de un reactivo que contiene N-maleimida, vinilsulfona, N-yodoacetamida, ortopiridilo o N-hidroxisuccinimida. El reactivo puede tener la fórmula general Z-R<sup>1</sup>-Z como se definió anteriormente. En esta modalidad, L es típicamente un grupo



15 Otro aspecto de la invención es una composición como se definió anteriormente, que es una composición farmacéutica y comprende además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 La composición farmacéutica puede estar en la forma de una suspensión acuosa. Las suspensiones acuosas contienen los compuestos nuevos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una suspensión acuosa u homogénea inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes humectantes o dispersantes y agentes de suspensión.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intranasal, por vía intradérmica, por vía tópica o por vía intratraqueal para uso humano o veterinario.

30 Las composiciones pueden comprender además un aditivo de la formulación. Por aditivo de la formulación se entiende un excipiente que es capaz de estabilizar la insulina ya sea interna o externamente, como se describe en Wang y otros (1999). El excipiente puede ser un estabilizador, un solubilizador o un ion metálico. Los ejemplos adecuados de aditivos de la formulación incluyen uno o más tampones, estabilizadores, tensioactivos, sales, polímeros, iones metálicos, azúcares, polioles o aminoácidos. Estos pueden usarse solos o en combinación.

Los estabilizadores actúan típicamente mediante la desestabilización del estado desnaturalizado de una proteína conduciendo a un aumento del cambio de la energía libre de Gibbs para el desplegamiento de la proteína. El estabilizador es preferiblemente un azúcar o un poliol, por ejemplo sacarosa, sorbitol, trehalosa, glicerol, manitol, lactosa y etilenglicol. Un tampón estabilizante es el fosfato de sodio.

35 El solubilizante es preferiblemente un tensioactivo, preferiblemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos adecuados incluyen Tween 80, Tween 20, Tween 40, Pluoronic F68, Brij 35 y Triton X100.

El ion metálico es preferiblemente divalente. Los iones metálicos adecuados incluyen Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup>.

El aditivo de la formulación puede ser además un polímero seleccionado de PSA, PEG o hidrox-beta-ciclodextrina.

40 Los conservantes tales como el m-cresol se pueden usar también.

Los aminoácidos adecuados y derivados de aminoácidos para el uso como el aditivo de la formulación incluyen histidina, glicina, otros aminoácidos similares y aspartato de sodio.

Un aspecto adicional de la invención es un compuesto como se ha descrito anteriormente para uso en la terapia.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para producir un derivado de ácido polisiálico de insulina o de una proteína similar a insulina en donde un ácido polisiálico que comprende 2-125 unidades de ácido siálico reacciona químicamente de forma sustancial solo en la amina N-terminal de la insulina o proteína similar a la insulina.

10 La fase "químicamente reaccionada sustancialmente solo en la amina N-terminal" significa que en una población de derivados al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95% de la proteína se deriva solo en su amina N-terminal. Preferiblemente, esto es en la amina N-terminal de la cadena B de insulina.

Los derivados de polisacáridos que se pueden obtener por este método, y cualquiera de las modalidades preferidas, como se detalla más abajo, también forman parte de esta invención.

15 Se ha desarrollado un nuevo método para la conjugación de los polisacáridos a las proteínas mediante el cual puede usarse la alta reactividad del N-terminal de la proteína y se evita la complejidad del producto obtenido usando el método establecido (Figuras 1 y 2) de aminación reductora de proteínas con el ácido colomínico natural oxidado con peryodato.

20 El polisacárido puede reaccionar además con una forma modificada de insulina. Por ejemplo, uno o más grupos en la insulina pueden haber experimentado una transformación química, por ejemplo, por reducción u oxidación. Un carbonilo reactivo puede generarse en el lugar del grupo amino terminal de la insulina usando por ejemplo condiciones de oxidación.

Los polisacáridos adecuados para el uso en el método de esta invención son como se describieron anteriormente para las nuevas composiciones.

Los compuestos de la invención pueden fabricarse por cualquiera de los métodos adecuados descritos en la técnica anterior. Por ejemplo, un método típico se describe en nuestra solicitud de patente anterior WO92/22331.

25 Típicamente, el polisacárido aniónico se activa antes de la derivación a insulina. Puede tener, por ejemplo, un grupo aldehído reactivo y la reacción de derivación pueden llevarse a cabo bajo condiciones de reducción. El grupo aldehído reactivo puede producirse mediante la oxidación controlada de un grupo hidroxilo del polisacárido. Más preferiblemente, este aldehído reactivo se genera en una etapa preliminar, en la que se hace reaccionar el polisacárido bajo condiciones de oxidación controladas, por ejemplo usando peryodato de sodio, en solución acuosa.  
30 Preferiblemente, la oxidación es una oxidación química, aunque pueden además usarse enzimas que son capaces de llevar a cabo esta etapa. El grupo aldehído reactivo puede estar en el extremo no reductor o extremo reductor del polisacárido. La insulina, típicamente el N-terminal, puede reaccionar después con el grupo aldehído reactivo para producir un aducto que, cuando se reduce, produce el derivado N-terminal de insulina.

35 La activación del polisacárido debe llevarse a cabo preferiblemente bajo condiciones de manera que no existe esencialmente la escisión a mitad de la cadena de la cadena principal del polisacárido, que no es esencialmente la reducción del peso molecular. El oxidante es convenientemente perrutenato, o, preferiblemente, peryodato. La oxidación puede llevarse a cabo con peryodato a una concentración en el intervalo de 1 mM a 1 M, a un pH en el intervalo de 3 a 10, una temperatura en el intervalo de 0 a 60°C durante un tiempo en el intervalo de 1 min a 48 horas.

40 Las condiciones reductoras adecuadas para la reacción de derivación pueden utilizar hidrógeno con catalizadores o, preferiblemente hidruros, tales como borohidruros. Estos pueden inmovilizarse tales como borohidruro soportado con Amberlita (marca comercial). Preferiblemente, los hidruros metálicos alcalinos tal como borohidruro de sodio se usa como el agente reductor, a una concentración en el intervalo de 1µM a 0.1 M, un pH en el intervalo de 4 a 10, una temperatura en el intervalo de 0 a 60°C y un período en el intervalo 1 min a 72 horas. Las condiciones de reacción se seleccionan de manera que no se reducen los grupos carboxilo colgante del material de partida. Otros agentes reductores adecuados son cianoborohidruro bajo condiciones ácidas, por ejemplo, polímero soportado en  
45 cianoborohidruro o cianoborohidruro de metal alcalino, ácido L-ascórbico, metabisulfito de sodio, L-selectrida, triacetoxiborohidruro etc.

50 Otros derivados activados de los polisacáridos pueden tener utilidad en la presente invención, e incluyen aquellos con grupos funcionales colgantes tales como NHS, como se describe en nuestra solicitud de patente anterior WO2006/090119.

En una modalidad, el aldehído reactivo está en el extremo reductor del polisacárido y el extremo no reductor se pasiva de manera que no reacciona con los grupos colgantes en insulina.

La reactividad del extremo reductor del ácido colomínico, aunque débil hacia las proteínas objetivo, es suficiente para ser problemático en la fabricación de los conjugados químicamente definidos.

La química adecuada para preparar un polisacárido con un aldehído reactivo en el terminal reductor de un polisacárido se describe en nuestra solicitud anterior WO05/016974. El proceso implica una etapa de oxidación selectiva preliminar seguido por la reducción y después la oxidación adicional para producir un compuesto con un aldehído en el terminal reductor y un extremo no reductor pasivado.

5 El documento WO2005/016973 describe derivados de ácido polisialílico que son útiles para la conjugación a proteínas, particularmente los que tienen fármacos con sulfhidrilo libre. El compuesto de ácido polisialílico se hace reaccionar con un reactivo heterobifuncional para introducir un grupo funcional colgante para la conjugación específica de sitio a los grupos sulfhidrilo. Los polisacáridos aniónicos usados en la presente invención pueden derivarse además con un reactivo heterobifuncional de esta manera.

10 El polisacárido puede derivarse antes de que reaccione con la insulina. Por ejemplo, el polisacárido puede reaccionar con un reactivo bifuncional.

15 El polisacárido puede someterse a una etapa de reacción preliminar, en la que un grupo seleccionado de un grupo amina primaria, un grupo amina secundaria y una hidrazina se forma en el sacárido terminal, que es preferiblemente ácido siálico, seguido de una etapa de reacción en la que este reacciona con un reactivo bifuncional para formar un intermediario de la reacción, como se describe adicionalmente en el documento WO2006/016168. El producto intermedio puede reaccionar después con el péptido de insulina o similar a la insulina. El reactivo bifuncional puede tener la fórmula general Z-R<sup>1</sup>-Z, como se definió anteriormente.

20 Se encontró que ciertas condiciones de reacción promueven la derivación selectiva en el extremo N-terminal de la insulina. Para promover la reacción selectiva en el extremo N-terminal, la reacción de derivación debe llevarse a cabo en una primera solución acuosa de pH ácido, y el derivado de polisacárido resultante debe purificarse después en una segunda solución acuosa de pH mayor que la primera solución acuosa. Por pH ácido nos referimos a un pH de menos de 7. Típicamente, el pH de la primera solución acuosa está en el intervalo de 4.0-6.5, preferiblemente 4.0-6.0 y el pH de la segunda solución acuosa está en el intervalo de 6.5-9.0, preferiblemente de 6.5-8.5 o 6.5-8.0. El pH bajo de la reacción de derivación promueve la derivación selectiva en el extremo N-terminal de la proteína en lugar de en cualquiera de los sitios a mitad de la cadena.

25 Además, encontramos que el uso de ciertos aditivos de la formulación promueve la formación de un derivado de insulina polisacárido, estable, selectivo. El aditivo de la formulación puede seleccionarse de uno o más tampones, estabilizadores, tensioactivos, sales, polímeros, iones metálicos, azúcares, polioles o aminoácidos. Estos pueden añadirse al medio de reacción, o, alternativamente, pueden añadirse a la composición del producto final, como un estabilizador.

30 En una modalidad de esta invención, el aditivo de la formulación es sorbitol, trehalosa o sacarosa. En una modalidad diferente, el aditivo de la formulación es un tensioactivo no iónico. El aditivo de la formulación puede ser alternativamente un polímero seleccionado de PSA, PEG o hidrox-beta-ciclodextrina. En una modalidad diferente el aditivo de la formulación es un ion metálico divalente. Los iones metálicos divalentes preferidos incluyen Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> o Fe<sup>2+</sup>.

El aditivo de la formulación puede ser un tampón. Preferiblemente, cuando el aditivo de la formulación es un tampón, este es fosfato de sodio o acetato de sodio.

35 La purificación del derivado de polisacárido en el método de la presente invención puede llevarse a cabo usando una variedad de métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de métodos de purificación adecuados incluyen HIC (cromatografía de interacción hidrofóbica), SEC (cromatografía de exclusión por tamaño), HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia), IEC (cromatografía de intercambio aniónico).

40 Una población de ácidos polisialílicos que tienen una distribución de peso molecular amplia puede fraccionarse en fracciones con polidispersidades más bajas, es decir en fracciones con diferentes pesos moleculares promedios. El fraccionamiento se realiza preferiblemente por cromatografía de intercambio aniónico, usando para la elución un tampón básico adecuado, como se describió en nuestras solicitudes de patente anteriores WO 2005/016794 y WO2005/03149. El método de fraccionamiento es adecuado para un material de partida polisacárido, así como con los derivados. La técnica puede así aplicarse antes o después de las etapas esenciales del proceso de esta invención. Preferiblemente, el derivado de polisacárido resultante de la insulina tiene una polidispersidad de menos de 1.1.

45 La derivación de la insulina de acuerdo con esta invención, resulta en una mayor vida media, estabilidad mejorada, inmunogenicidad reducida, y/o control de la solubilidad y por lo tanto, la biodisponibilidad y las propiedades farmacocinéticas de la insulina. El nuevo método es de particular valor para la creación de un conjugado de insulina-monopolisialilado.

La invención se ilustra por los Ejemplos 1-6 y con referencia a los siguientes dibujos:

55 La Figura 1 muestra la oxidación del ácido colomínico (ácido polisialílico enlazado a alfa-2,8 de E. coli) con peryodato de sodio;



La Figura 2 muestra la reducción selectiva de la base de Schiff con cianoborohidruro de sodio para formar un enlace covalente irreversible estable con el grupo amino de la proteína;

La Figura 3 es un SDS-PAGE de conjugados CAO-rh-Insulina de 22 kDa a diferentes temperaturas;

La Figura 4 muestra los efectos de la temperatura en el grado de derivación;

5 La Figura 5 es un SDS-PAGE de conjugaciones de CAO-rh-Insulina de 27 kDa a diferentes relaciones molares;

La Figura 6 muestra los efectos de la relación de molar del grado de derivación;

La Figura 7 es un SDS-PAGE de conjugados de CAO-rh-Insulina de 8 y 11 kDa;

La Figura 8 es un SE-HPLC de formulaciones de CAO-rh-Insulina y insulina de 8 kDa;

La Figura 9 muestra la eficacia in vivo de formulaciones CAO-insulina de 10, 15 y 21,5 kDa;

10 La Figura 10 muestra el montaje experimental de HPLC preparativa con IEC o HIC para la purificación de un conjugado;

La Figura 11 muestra la purificación de un conjugado CAO-insulina por cromatografía de interacción hidrófoba en una columna HiTrap de butilo FF;

15 La Figura 12 muestra la purificación de un conjugado CAO-insulina de HIC pico 2, con 13 kDa CAO como ejemplo, por cromatografía de intercambio aniónico en una columna de la columna Hitrap Q FF;

La Figura 13 es un enfoque isoelectrónico (IEF) en gel de un conjugado CAO-insulina de 13 kDa y 27 kDa;

La Figura 14 muestra resultados in vivo del conjugado CAO-insulina en ratones; y

La Figura 15 muestra los resultados de la degradación de aminoácidos de Edman.

#### Ejemplos

20 1. Determinación de proteína y ácido colomínico

La estimación cuantitativa de ácidos polisialícos (como ácido siálico) con el reactivo resorcinol se llevó a cabo por el método de resorcinol [Svennerholm, 1957] como se describió en otra parte [Gregoriadis y otros, 1993; Fernandes y Gregoriadis, 1996, 1997]. La proteína se midió por el método colorimétrico BCA o absorbancia UV a 280 nm.

2. Activación del ácido colomínico

25 La solución 0.02 M de metaperyodato de sodio (NaIO<sub>4</sub>) preparada fresca (exceso molar de 8 veces) se mezcló con CA a 20°C y la mezcla de reacción se agitó magnéticamente durante 15 min en la oscuridad. Después, se añadió un volumen de dos veces de etilenglicol a la mezcla de reacción para gastar el exceso de NaIO<sub>4</sub> y la mezcla se mantuvo en agitación a 20°C por otros 30 min. adicionales. El ácido colomínico oxidado (CAO) se dializó (tubo de diálisis con corte de 3.5KDa de peso molecular) extensivamente (24 h) contra un tampón de carbonato de amonio 0.01% (pH 7.4) a 4°C. La ultrafiltración (corte de 3.5 kDa de peso molecular) se usó para concentrar la solución CAO a partir del tubo de diálisis. Después de la concentración hasta el volumen necesario, el filtrado se liofilizó y se almacenó a -40°C hasta el uso más adelante. Alternativamente, CAO se recuperó de la mezcla de reacción mediante precipitación (dos veces) con etanol.

3. Determinación del estado de oxidación de CA y derivados

35 La estimación cualitativa del grado de oxidación del ácido colomínico se llevó a cabo con 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), que produce 2,4 dinitrofenil-hidrazonas moderadamente solubles en la interacción con los compuestos carbonilo. (CA) no oxidado/(CAO)oxidado se añadieron al reactivo 2,4-DNPH (1.0 ml), las soluciones se agitaron y después se dejaron reposar a 37°C hasta que se observó un precipitado cristalino [Shriner y otros, 1980]. El grado (cuantitativo) de oxidación de CA se midió con un método [Park y Johnson, 1949] basado en la reducción de los iones de ferricianuro en solución alcalina a ferrocianuro férrico (azul persa), que se mide después a 630 nm. En este caso, la glucosa se usó como un estándar.

4. Cromatografía de permeación en gel

45 Las muestras de ácido colomínico (CA y CAO) se disolvieron en NaNO<sub>3</sub> (0.2M), CH<sub>3</sub>CN (10%; 5mg/ml) y se cromatografiaron en columnas 2x GMPWXL con detección mediante índice de refracción (sistema GPC: bomba de disolvente VE1121 GPC, detector VE3580 RI y comparación con el software Trisec 3 Viscotek Europe Ltd). Las muestras (5 mg/ml) se filtraron sobre membrana de nylon de 0.45 µm y corrieron a 0.7 cm/min con 0.2 M NaNO<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>CN (10%) como la fase móvil.

## 5. Estabilidad del ácido colomónico

Las reglas para la química de la PEGilación no pueden aplicarse a la polisialilación como tal debido a la diferencia en las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas. El PSA es un polímero lábil ácido y es estable durante semanas alrededor de pH neutro (Figura 3). Los resultados en la Figura 3 muestran que a pH 6.0 y 7.4 CAO es estable durante 8 días, a pH 5.0 existe una degradación lenta (después de 48 horas 92% del PM inicial), y a pH 4.0 existe una degradación lenta (después de 48 horas 70 % del PM inicial). El ácido polisialílico es altamente hidrofílico, mientras que PEG es una molécula anfifílica en la naturaleza. Cuando la polisialilación se lleva a cabo usando condiciones usadas para la PEGilación, la agregación y precipitación de las proteínas se ve en muchos casos.

## 6. Preparación de conjugados proteína N-terminal-CA con aditivos de la formulación

## 10 6.1 Preparación de conjugados insulina-CA (método de N-terminal)

Insulina (5804 Da) se suministró como un sólido blanco. La insulina se disolvió por HCl mínimo 100 mM, y después se ajustó al pH requerido y se colocó en hielo. La cantidad de CAO a añadir para la conjugación se calculó basándose en la fórmula:

$$\text{Peso de CAO} = \frac{\text{Cantidad de proteína (g)}}{(\text{PM de proteína})} \times (\text{PM de CAO}) \times (\text{Exceso molar de CAO})$$

15 La cantidad necesaria de CAO se pesó. El CAO se solubilizó en NaOAc 10 mM, pH 6.0, la mezcla se sometió a vórtice suavemente hasta que todo el CAO se disolvió y después se filtró en un nuevo recipiente para eliminar cualquier material agregado/precipitado. Se añadió una cantidad requerida de solución de proteína de insulina a la solución CAO para dar un exceso molar de 7.5 (pequeña escala) y 5 (a gran escala) de CAO y se mezcló suavemente, manteniendo la mezcla de reacción en un agitador suave a 4±1°C. Se añadieron 100 mg/ml de solución de NaCNBH<sub>3</sub> para tener 8  
20 mg/ml en la mezcla de reacción final, se mezclaron suavemente y el pH de la mezcla de reacción final se comprueba, si es necesario ajustar el pH a 6.0 con 0.5 M NaOH/HCl a 4±1°C. Finalmente se ajustó el volumen de la reacción usando NaOAc 10 mM, pH 6.0 para dar una concentración de proteína de 1 mg/ml en la mezcla de reacción. El tubo se selló y se agitó a la temperatura deseada (4±1°C) durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante un método adecuado (tal como tampón de tris(hidroximetil)aminometano pH 7.4) y se tomaron las muestras para SDS-PAGE  
25 (usando gel de Tris-glicina al 18%), SE-HPLC (columna superosa 12) y se comprobó el pH de la mezcla de reacción. Para eliminar cualquier precipitado, la mezcla de reacción se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min antes del análisis SE-HPLC y la purificación, el tampón preferido para SE-HPLC fue 0.1 M fosfato de Na (pH 6.9).

## 6.2 Optimización

30 La aminación reductora se llevó a cabo con un intervalo de pesos moleculares de CAO (10-30kDa) en la insulina para la derivación N-terminal y aleatoria. Los intervalos de variables del proceso se estudiaron para las reacciones de conjugación: exceso molar de CAO 10-20 (pequeña escala) y 5-10 (gran escala); reactivo= 50-100mM NaCNBH<sub>3</sub>, tampón de reacción= 10mM NaOAc pH 5.5-6.5, temperatura= 4±1°C, tiempo= 16-24 horas etc.

35 Se encontraron condiciones de reacción optimizadas que son las siguientes: Exceso molar de CAO= 7.5 (pequeña escala) y 5 (gran escala), reactivo = 50 mM NaCNBH<sub>3</sub>, tampón de reacción= 10m NaOAc pH 5.5, temperatura = 4±1°C, tiempo= 24 horas.

## 6.3 Purificación y caracterización de conjugados de insulina-CA (método N-terminal)

40 Para eliminar el CAO libre de la mezcla, se usó HIC (HiTrap Butil FF). Preparar la solución de carga mediante dilución de la mezcla de reacción de insulina con volumen mínimo usando (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (por ejemplo, 3 M), 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4) para dar una concentración de 0.8 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la solución de carga. Verificar el pH, que debe ser 7.4 o ajustar con 0.5 M HCl/NaOH, la solución de carga tiene que ser filtrada con un filtro de membrana de 0.2 micras.

45 Esta solución se carga después en la columna HIC (velocidad = 0.5 ml/min) previamente equilibrada con tampón B de HIC (fosfato de sodio 20 mM + 0.8 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.4). La fracción de carga se recogió (cada fracción del volumen de columna de 1.5) y se marcó (L1-Lx) siguiendo con el lavado de la columna con tampón B para HIC (al menos 5 volúmenes de columna; velocidad = 0.5 ml/min; fracción de volumen de columna de 1.5) se recogió y se marcó (W1-Wx). El producto con tampón A HIC (tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7.4) (velocidad = 5 ml/min) se eluyó y se recogieron las fracciones (fracción de volumen de columna 1; volumen de columna 6) y se marcó (E1-Ex). Si dos fracciones consecutivas estaban ausentes en el contenido de proteína (UV280 nm), se llevó a cabo la siguiente etapa. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación. La concentración de proteína se analizó mediante UV

(280 nm) (Coeficiente de extinción 1 mg/ml de insulina fue aproximadamente 1.043 a 280 nm). Se tomaron las muestras para SDS-PAGE y SE-HPLC.

5 Las fracciones HIC que contenían fracciones de proteína se lavaron con tampón A para IEC (20 mM tampón de fosfato, pH 7.4). Para eliminar el sulfato de amonio en su caso en Vivaspin 20 (MW: 5 Kd). Verificar el pH y ajustar si es necesario a un pH de 7.4. Cargar en la columna de IEC previamente equilibrada con tampón A para IEC. Se aplicó un sistema de gradiente de la manera siguiente:

Carga: 0.25ml/min de muestra inyectada en tampón A para IEC, lavado de 3CV

Lavado: Sistema de gradiente: Tampón A para IEC: 90%, tampón B para AEX (20 mM tampón de fosfato + 1 M NaCl, pH 7.4): 10%, gradiente de 5CV y lavado de 3CV, régimen de flujo: 0.25ml/min

10 Tampón A para IEC: 68%, Tampón B para IEC: 32%, gradiente de 5 CV y lavado de 3CV, régimen de flujo: 0.25ml/min

Tampón A para IEC: 35%, Tampón B para IEC: 65%, gradiente de 5CV y lavado de 3CV, régimen de flujo: 0.25ml/min

Tampón A para IEC: 0%, Tampón B para IEC: 100%, gradiente de 5CV y lavado de 3CV, régimen de flujo: 0.25ml/min

15 Las fracciones IEC que contienen el conjugado purificado se combinan, se lavan para eliminar la sal con el cambio de tampón del tampón PBS. Ajustar el pH después de la eliminación de la sal a 7.4. La solución se concentra después a  $4\pm 1^\circ\text{C}$  y la concentración de proteínas se analizó por espectroscopía UV (280 nm). Los conjugados se filtraron estériles y se tomaron muestras para el ensayo de la actividad y para la caracterización por SDS-PAGE y SE-HPLC. Si era necesario se eliminó una alícuota para ensayo de proteínas y el ensayo de CA. El resto se almacenó a  $4\pm 1^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior y se estudió la estabilidad física por SE-HPLC.

20 Se estudiaron los efectos de varios procesos que afectan la estabilidad de la insulina en solución y el grado de derivación.

#### 6.4 Preparación de conjugados insulina-CA 14 kDa (monodisperso)

La insulina (5808 Da) se suministró como un sólido blanco. La insulina se disolvió mediante la adición de una cantidad mínima de 100 mM de HCl, y después el pH se ajustó a lo requerido y se coloca en hielo. La cantidad de CA 14 kDa a añadir para la conjugación se calculó basándose en la fórmula:

$$\text{Peso de 14 kDa de CAO} = \frac{\text{Cantidad de proteína (g)}}{\text{(PM de la proteína)}} \times (\text{PM de CAO}) \times (\text{Exceso molar de CAO})$$

25 Se pesó la cantidad requerida de CAO 14 kDa. CAO 14 kDa se solubilizó en 10 mM tampón de fosfato, pH 6.0 (aquí se usó 20% de volumen del volumen de reacción final), se agitó suavemente la mezcla hasta que todo el CAO 14 kDa se haya disuelto y después se filtró en un nuevo recipiente para eliminar cualquier material agregado/precipitado. Se añadió una cantidad necesaria de solución de proteína de insulina a la solución de CAO 14 kDa para dar un exceso molar de 7.5 (pequeña escala) y 5 (gran escala) de CAO 14 kDa y se agitó suavemente manteniendo la mezcla de reacción en un agitador suave a  $4\pm 1^\circ\text{C}$ . Se añadieron 100 mg/ml de la solución de  $\text{NaCNBH}_3$  para tener 63.5 mM o 4 mg/ml en la mezcla de reacción final, se mezcló suavemente y se comprobó el pH de la mezcla de reacción final, si era necesario se ajustó el pH a 6.0 con 0.5 M NaOH/HCl a  $4\pm 1^\circ\text{C}$ . Finalmente se ajustó el volumen de la reacción mediante el uso de 10 mM NaOAc, pH 6.0 para dar una concentración de proteína de 1 mg/ml en la mezcla de reacción.

30 El tubo se selló y se agitó a la temperatura deseada ( $4\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante un método adecuado y se tomaron las muestras para SDS-PAGE (usando gel de Tris-glicina al 18%), SE-HPLC (columna superosa 12) y se comprobó el pH de la mezcla de reacción. Para eliminar cualquier precipitado, la mezcla de reacción se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min antes del análisis SE-HPLC y la purificación, el tampón preferido para SE-HPLC fue fosfato de Na 0.1 M (pH 6.9).

#### 40 6.5 Optimización

La aminación reductora se llevó a cabo con un intervalo de pesos moleculares de CA (10-30kda) en insulina para la derivación N-terminal y aleatoria. El intervalo de variables del proceso se estudió para las reacciones de conjugación: exceso molar de CAO 10-20 (pequeña escala) y 5-10 (gran escala); reactivo= 50-100mM  $\text{NaCNBH}_3$ , tampón de reacción= 10mM tampón de fosfato, pH= 5-7.4; temperatura=  $4 -37 \pm 1^\circ\text{C}$ , tiempo= 16-24 horas etc.

45 Se encontró que las condiciones de reacción optimizadas son las siguientes: exceso molar de CAO= 7.5 (pequeña escala) y 5 (gran escala), reactivo = 63.5 mM  $\text{NaCNBH}_3$  (4 mg/ml). Tampón de reacción= 10mM NaOAc pH 6.0, temperatura =  $4\pm 1^\circ\text{C}$ , tiempo= 24 horas.

## 6.6 Purificación y caracterización de conjugados de insulina-CA (método N-terminal)

5 Para eliminar CAO libre de la mezcla, se usó HIC. Preparar solución de carga mediante la dilución de la mezcla de reacción de insulina con volumen mínimo usando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentrado (por ejemplo, 3 M), 20mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , (pH 7.4) para dar una concentración de 0.8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en la solución de carga. Verificar el pH, debería ser 7.4 o ajustar con 0.5 M HCl/NaOH, la solución de carga tiene que ser filtrada con un filtro de membrana de 0.2 micras.

10 Esta solución se carga después en la columna HIC (velocidad = 0.5ml/min) previamente equilibrada con tampón B para HIC (20 mM fosfato de sodio + 0.8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7.4). Recoger las fracciones cargadas (cada fracción de volumen de columna 1.5) y marcar (L1-Lx). Lavar la columna con tampón B para HIC (al menos 5 volúmenes de columna; velocidad = 0.5 ml/min; recoger 1.5 fracción de volumen de columna) recoger las fracciones y marcar (W1-Wx). Eluir el producto con tampón A HIC (10 mM tampón de fosfato de sodio, pH 7.4) (velocidad = 5 ml/min); recoger las fracciones (1 fracción de volumen de columna; 6 volumen de columna) y marcar (E1-Ex). Si dos fracciones consecutivas estaban ausentes en el contenido de proteínas (UV280 nm), se llevó a cabo la siguiente etapa. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación. La concentración de proteínas se analizó por UV (280 nm) (Coeficiente de extinción de 1 mg/ml de insulina fue aproximadamente 1.043 a 280 nm). Se tomaron las muestras para SDS-PAGE y SE-HPLC.

Las fracciones HIC que contienen las fracciones de proteína se lavaron con tampón A para IEC (20 mM tampón de fosfato, pH 7.4). Para eliminar el sulfato de amonio si hubiera en Vivaspin 20 (PM: 5 Kd). Verificar el pH y ajustarlo si es necesario a pH 7.4. Cargar en la columna IEC previamente equilibrada con tampón A para IEC. El sistema de gradiente se aplicó de la siguiente manera:

20 Carga: 0.25ml/min de muestra inyectada en tampón A para IEC, lavado de 3CV

Lavado: Sistema gradiente: Tampón A para IEC: 90%, tampón B para AEX (20 mM tampón de fosfato + 1M NaCl, pH 7.4): 10%, gradiente de 5CV y lavado de 3CV, régimen de flujo: 0.25ml/min

Tampón A para IEC: 68%, Tampón B para IEC: 32%, gradiente de 5 CV y lavado de 3CV, régimen de flujo: 0.25ml/min

Tampón A para IEC: 35%, Tampón B para IEC: 65%, gradiente de 5CV y lavado de 3CV, régimen de flujo : 0.25ml/min

25 Tampón A para IEC: 0%, Tampón B para IEC: 100%, gradiente de 5CV y lavado de 3CV, régimen de flujo : 0.25ml/min

30 Las fracciones IEC que contienen el conjugado purificado se combinan, se lavan para eliminar la sal con el cambio de tampón del tampón PBS. El pH se ajusta después de la eliminación de la sal a 7.4. La solución se concentra después a  $4\pm 1^\circ\text{C}$  y la concentración de proteínas se analizó por espectroscopía UV (280 nm). El conjugado se filtra de manera estéril y las muestras se toman para el ensayo de la actividad y para la caracterización por SDS-PAGE y SE-HPLC. Si era necesario, se eliminó una alícuota para un ensayo de proteínas y ensayo de CA. El resto se almacenó a  $4\pm 1^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior y se estudió para la estabilidad física por SE-HPLC.

Se estudiaron los efectos de varios procesos que afectan la estabilidad de la insulina en solución y el grado de derivación.

## 6.7 SE-HPLC de formulaciones de insulina

35 La HPLC se realizó en un Cromatógrafo Líquido (JASCO) equipado con un Jasco, AS-2057 más automuestreador refrigerado a  $4^\circ\text{C}$ , y un detector Jasco UV-975 UV/VIS. Los datos se registraron mediante el software EZChrom Elite en una IBM/PC. Las muestras de la SEC se analizaron con una fase móvil isocrática de 0.1 M fosfato de Na, pH 6.9; en una columna de Superosa 12 (Figura 8). La Figura 8 muestra un solo pico a  $\text{RT}=75.408$ , lo cual se atribuye a la insulina.

## 40 6.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y inmunoelectrotransferencia

SDS-PAGE se realizó usando de geles de triglicina al 18%. Las muestras se diluyeron con tampón ya sea reductor o no reductor y 5.0 ug de proteína se cargó en cada pozo. Los geles se corrieron en un sistema tampón de triglicerina y se tiñó and con Azul Coomassie (Figuras 5 y 7). La inmunoelectrotransferencia se realizó usando el anticuerpo anti PSA. La Figura 4 muestra la SDS-PAGE de las formulaciones de insulina (específica de sitio; N-terminal).

## 45 6.9 Enfoque isoeléctrico (IEF) en gel de CAO-insulina de 27 y 13 kDa

El gel para IEF Novex® se usó para determinar las diferencias en los puntos isoeléctricos de la insulina y el conjugado de CAO-insulina. Las muestras se disolvieron a una concentración de 0.5 mg/ml. 5 ul de muestra se diluyeron con 5 ul de tampón de muestra para IEF Novex pH 3-10 y después se cargó la muestra de proteína en el gel.

## 6.10 Estudios de estabilidad

50 Los conjugados de insulina estériles se almacenaron en tampón PBS; a  $4^\circ\text{C}$  durante seis semanas. PAGE-Nativo de las muestras se realizó cada semana

6.11 Eficacia in vivo de las formulaciones de insulina

La eficacia in vivo de las formulaciones de insulina se estudió en ratones hembra CD-1, de 7-8 semanas de edad. Se inyectó una dosis de proteína de 0.3 IU (igual actividad) en ratones por vía subcutánea. Los animales se dividieron en siete grupos de cuatro. Las formulaciones de insulina se administraron a cada animal de cada grupo de la siguiente manera; insulina (0.3 UI/ratón), conjugado insulina-PSA Lantus (Aventis) (14 KDa), PBS. Se extrajo una gota de sangre de cada animal y se midió la glucosa en sangre ACCU-CHEK Active (Roche Diagnostics).

Resultados

Activación de CA y determinación del grado de oxidación

Se usó ácido colomínico (CA), que es un homopolímero lineal alfa-2,8 enlazado de residuos de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). La exposición de los ácidos colomínicos a la oxidación se llevó a cabo durante 15 min usando 20 mM peryodato a temperatura ambiente. La integridad de los residuos Neu5Ac internos alfa-2,8 enlazados después del tratamiento con peryodato se analizó mediante cromatografía de permeación en gel y los cromatogramas obtenidos para el material oxidado (CAO), se comparó con el de CA nativo. Se encontró que el CA oxidado y nativo exhiben perfiles de elución casi idénticos, sin evidencia de que la etapa de oxidación sucesiva da lugar a la fragmentación significativa de la cadena del polímero.

La medición cuantitativa del estado de oxidación de CA se realizó mediante la reducción del ion de ferricianuro en solución alcalina a ferrocianuro (Azul de Prusia) [Park y Johnson, 1949] usando glucosa como un estándar. Muestra que se encontró que el ácido colomínico oxidado tenía una cantidad del agente reductor mayor que la estequiométrica (> 100%), es decir, 112 % en mol de contenido de aldehído aparente que comprende el poder reductor combinado del hemiacetal extremo reductor y el aldehído introducido (en el otro extremo).

Optimización de la reacción polisialación

Las condiciones de polisialación se optimizaron mediante el uso de 1 mg rh-insulina con CAO bajo temperaturas y relación molar del reactivo, y longitud de la cadena variables. Los resultados se muestran en la Figura 5-12. 4°C parece ser la temperatura óptima para CAO y la estabilidad de la insulina durante la reacción. Sin embargo, a una temperatura más alta, se puede alcanzar más conjugación 7.5: 1 de relación molar de CAO a la insulina es más eficaz.

Tabla 1 muestra el efecto de la relación molar en la polisialilación.

Tabla 1.

Número de pozo	1	3	5	7	8	11	12
Relación molar	1 : 1	1 : 2	1: 4	Ma	insulina	1. 7.5	1. 10
CAO PM	27 kDa CAO con 100 CHO%						
Insulina (mg)	1	1	1	1			1
CAO (mg)	4.49	8.98	17.96	33.675			44.9
NaCNBH Final <sub>3</sub>	4 mg/ml						
Reacción	4						
pH	6						

Bajo la influencia del control de PBS, 21.5 kd CAO-insulina tiene el efecto más significativo en la disminución de la glucosa en sangre en ratones entre los conjugados usados en la Figura 9.

La Tabla 2 muestra una prueba-T (análisis estadístico, prueba pareada) de la cadena de diferentes conjugados CAO-insulina en la eficacia in vivo.

Tabla 2.

Tiempo (minutos)	0.0	32.0	64.5	99.4	170.8	230.2	303.3	358.0	1354.9
CAO-insulina de 13 kDa		**	***	***					
CAO-insulina de 21 kDa		***	***	***		*			
CAO-insulina de 27 kDa		**	***	**		**			**
CAO-insulina de 62 kDa		***	***	***					*
Insulina		**00*	***	***					

Los asteriscos indican el nivel de probabilidad de la diferencia entre grupos contra el tampón Tris: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

Tabla 3.

	Lantus	CAO-insulina 15 KDa (Sigma)
0		
30	***	**
30	***	***
90	**	***
120	*	**
150		*
210		
270		
330		

5

Los asteriscos indican el nivel de probabilidad de la diferencia entre grupos contra el tampón PBS: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

El efecto del pH en la eficiencia in vivo de CAO-insulina 15 kDa también reveló que el pH 6.0 es mejor que 7.4. Por lo tanto, el experimento después se realizó a pH 6.0. Los datos del mapeo de péptidos y la degradación de Edman confirmaron además que el conjugado de la condición de polialililación pH 6.0 es N-terminal bloqueado específicamente en la cadena B de la insulina.

Preparación, purificación y caracterización de los conjugados de insulina

CAO-insulina monodispersa se puede conjugar con éxito y los conjugados altamente puros se purificaron por HIC e IEC escalados. La eficacia de la purificación se mejoró a partir de la combinación de IEC e HIC establecida con el instrumento de HPLC preparativa como se demostró en la Figura 10.

El procedimiento para preparar y purificar los conjugados de ácido colomínico (CA) de insulina de manera selectiva N-terminal conduciendo la reacción a un pH reducido (pH 6.0) y a 4±1°C se detalla anteriormente. Esto implica la conjugación en presencia de cianoborohidruro de sodio, seguido por la purificación usando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para eliminar el CA libre libre (Figura 11) seguido de la eliminación de insulina mediante cromatografía de intercambio iónico (IEC) (Figura 12). El pH bajo se usa para favorecer la derivación selectiva en el N-terminal de la cadena B de la insulina (PheB1), y también para minimizar la agregación de la insulina durante la

20

reacción. La composición del tampón de la reacción final fue 1 mg/ml de insulina, 8mg/ml de NaCNBH<sub>3</sub> y exceso molar de 5 molar de CAO en 10 mM de NaOAc a pH 6.0.

El enfoque isoelectrico (IEF) en gel de conjugados CAO-insulina de 13 Kda y 27 Kda en la Figura 13 muestra que el conjugado de insulina polisialilada no tiene un punto isoelectrico fijo (pI).

5 La formación de los conjugados de insulina-CA y la estabilidad se confirmó mediante la SE-HPLC (cambio del tiempo de retención de insulina-CA en comparación con insulina; co-elución además de ambas porciones); cromatografía de intercambio iónico (unión de conjugados en la columna de IEC) y electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE; desplazamiento de bandas con especies de alto p.m.).

10 Los conjugados de insulina usados en la eficacia in vivo (en ratones CD-1, promedio 25 g) mostraron una eficacia *in vivo* superior (prolongación) y romo (perfil de menos pico) en comparación con la insulina. La prolongación de la capacidad reductora de la glucosa en sangre de los conjugados fue proporcional a la longitud de la cadena de polímero usado en la formulación como se aprecia en la Figura 14.

El estudio de estabilidad de los conjugados CAO-insulina de 27 kDa mostró que no había ningún tipo de degradación durante el almacenamiento ° C 4 40 días basado en la observación de Native-PAGE.

15 Caracterización de conjugados de insulina de 14 kDa a partir de la from preparación y purificación escalada

En el ejemplo de la insulina como 700 mg de reactivo de partida, 230 mg de CAO-insulina de 14 kDa (peso de la masa de proteína) se produjo con el uso de purificación en columna escalada.

20 Por comparación de los cromatogramas, los cambios en las cantidades de aminoácidos en la Figura 15 revelan los aminoácidos del N-terminal. La muestra acuosa 1mg/mL en PBS pH 7.4 se diluyó x100 con agua. 2µL de esta solución diluida se tomó para el análisis. En conclusión, la secuencia G-I-V-E, identifica la cadena A de insulina. La ausencia de aminoácido Phe/Val/Asn/Gln indica que la cadena B de insulina fue bloqueada en el N-terminal.

Se encontró que los conjugados de PSA son activos en el ensayo de actividad in vitro. El estudio de eficacia in vivo muestra que los conjugados PSA-insulina son muy superiores a la insulina.

#### Referencias

25 Geiger y otros, (en D. Branderburg, y A. Wollmer (eds.), 1980, Insulin: Chemistry, Structure, and Function of Insulin and Related Hormones, Walter de Gruyter y Co., Nueva York, P409-415,

Ehrat M., Luisi P.L., 1983, Synthesis and spectroscopic characterization of insulin derivatives containing one or two poly(ethylene oxide) chains at specific positions, Biopolymers , 22: P 569-573,

30 Caliceti P, (1999) Improvement of the physicochemical and biopharmaceutical properties of insulin by poly(ethyleneglycol) conjugation, STP Pharma Sciences 9: P 107-113

Uchio, T., Baudys, M., Liu, F., Song, S.C., Kim, S.W., (1999) Site-specific insulin conjugates with enhanced stability and extended action profile., Advanced Drug Delivery Reviews, 35, P289-306

Hinds K., Koh J.J, Joss L., Liu F., Baudys M. Kim, S.W., (2000)."Synthesis and Characterization of Poly(ethylene glycol)-Insulin Conjugates," Bioconjugate Chem., 11, 195-201

35 Hinds K.D.; Kim S.W. (2002), Advanced Drug Delivery Reviews, 54: 505-530, Fernandes, A.I., Gregoriadis, G., Synthesis, characterization and properties of polysialylated catalase, Biochimica et Biophysica Acta, 1293 (1996) 92-96

Fernandes, A.I., Gregoriadis, G., Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics, Biochimica et Biophysica Acta, 1341 (1997) 26-34.

40 Jain, S. y otros, Polysialylated insulin: synthesis, characteristaion and biological activity in vivo, Biochimica et Biophysica Acta, 1662(2003) 42-49;

Gregoriadis, G., McCormack, B., Wang, Z., Lifely, R., Polysialic acids: potential in drug delivery, FEBS Letters, 315 (1993) 271-276.

Park, J.T., Johnson, M.J., A submicrodetermination of glucose, Journal of Biological Chemistry, 181 (1949) 149-151.

45 Shriner, R. L., Fuson, R.D.C., Curtin, D.Y., Morill, T.C., The Systematic Identification of Organic Compounds, 6ta ed., Wiley, Nueva York, 1980.

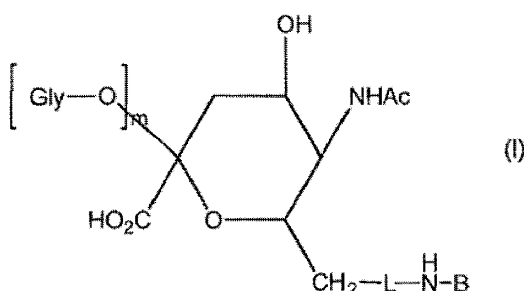
Svennerholm, L., Quantitative estimation of sialic acid II: A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method, Biochimica et Biophysica Acta, 24 (1957) 604-611.

Wang, W., Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *International Journal of Pharmaceutics*, 185(1999) 129-188.



**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende una población de derivados de ácido polisialico de insulina o una proteína similar a insulina, en donde el ácido polisialico comprende entre 2 y 125 unidades de ácido siálico,  
 en donde la proteína similar a la insulina tiene al menos el 50% de la actividad de la insulina,
- 5 en donde la proteína similar a la insulina es un homólogo de insulina que tiene una identidad de secuencia del 90% o superior al nivel de aminoácido con los residuos 25-54 o 90-110 de la SEQ ID N°: 1, y  
 en donde al menos el 85% de la población de derivados de la insulina o la proteína similar a la insulina se deriva en el N-terminal.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína similar a insulina tiene una identidad de secuencia del 95% o superior en el nivel de aminoácido con los residuos 25-54 o 90-110 de la SEQ ID NO: 1.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la proteína similar a insulina es un homólogo de insulina que tiene una identidad de secuencia del 90% o superior en el nivel de aminoácido con la forma activa de insulina humana que corresponde a residuos 25-54 y 90-110 de SEQ ID NO: 1.
- 15 4. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos el 85% de la población de derivados de la insulina o la proteína similar a insulina se deriva en el N-terminal de la cadena B.
5. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el ácido polisialico consiste sustancialmente solo de unidades de ácido siálico.
6. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la insulina o la proteína similar a insulina se deriva mediante el ácido polisialico en la unidad terminal reductora del ácido polisialico.
- 20 7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde los derivados de ácido polisialico son de fórmula general (I)



en donde HNB se deriva de B-NH<sub>2</sub> que es el extremo N-terminal de la cadena B de la insulina o la proteína similar a la insulina;

- 25 L es una unión, un grupo de enlace, o comprende un polipéptido o un oligómero sintético;

GlyO es una unidad de ácido siálico; y

m = 1-124

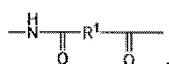
en donde el grupo de enlace, si está presente, es de fórmula general -Y-C(O)-R<sup>1</sup>-C(O)-;

en donde Y es NR<sup>2</sup> o NR<sup>2</sup>-NR<sup>2</sup>;

- 30 R<sup>1</sup> es un radical orgánico difuncional seleccionado del grupo que consiste en alcanodiilo, arileno, alcarileno, heteroarileno y alquilheteroarileno, cualquiera de los cuales puede estar sustituido y/o interrumpido por enlaces de carbonilo, éster, sulfuro, éter, amida y/o amina;

y R<sup>2</sup> es H o C<sub>1-6</sub> alquilo.

8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7, en donde L es una unión o es un grupo



35

9. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el ácido polisiálico comprende 10-80 unidades de ácido siálico, más preferiblemente 20-60 unidades de ácido siálico, lo más preferiblemente 40-50 unidades de ácido siálico.
- 5 10. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la polidispersidad del ácido polisiálico es menor que 1.3, preferiblemente menor que 1.2, lo más preferiblemente menor que 1.1.
11. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que es una composición farmacéutica y comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
12. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso en terapia.
- 10 13. Un método para producir una población de derivados de ácido polisiálico de insulina o una proteína similar a insulina, en donde el ácido polisiálico se hace reaccionar químicamente con la amina N-terminal de la insulina o proteína similar a insulina,  
 en donde el ácido polisiálico comprende entre 2 y 125 unidades de ácido siálico,  
 en donde la proteína similar a la insulina tiene al menos el 50% de la actividad de la insulina,  
 en donde la proteína similar a insulina es un homólogo de insulina que tiene una identidad de secuencia del 90% o superior en el nivel de aminoácido con los residuos 25-54 o 90-110 de la SEQ ID NO: 1, y  
 15 en donde al menos el 85% de la población se deriva en el N-terminal.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la proteína similar a insulina es un homólogo de insulina que tiene una identidad de secuencia del 90% o superior en el nivel de aminoácido con la forma activa de insulina humana que corresponde a los residuos 25-54 y 90-110 de SEQ. ID NO: 1.
- 20 15. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde al menos el 85% de la población de derivados de insulina o la proteína similar a la insulina se deriva en el N-terminal de la cadena B.
16. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde el ácido polisiálico tiene un grupo aldehído reactivo que reacciona con la insulina o la proteína similar a la insulina y la reacción de derivación se lleva a cabo bajo condiciones reductoras.
- 25 17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el grupo aldehído reactivo está en el extremo no reductor del ácido polisiálico.
18. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el aldehído reactivo está en el extremo reductor del ácido polisiálico y el extremo no reductor se ha pasivado de tal manera que no reacciona con la insulina o la proteína similar a la insulina.
- 30 19. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-18, en donde el ácido polisiálico aniónico o un intermedio de la reacción de cualquiera de las reivindicaciones 13-18 reacciona con un grupo amino terminal de la insulina o la proteína similar a la insulina en una primera solución acuosa de pH ácido en el rango 4.0-6.0; y la población derivada de ácido polisiálico resultante se purifica en una segunda solución acuosa de pH superior a la primera solución acuosa en el rango de 6.5-8.5.
- 35 20. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-19, que se lleva a cabo en presencia de un aditivo de formulación, preferiblemente fosfato de sodio.

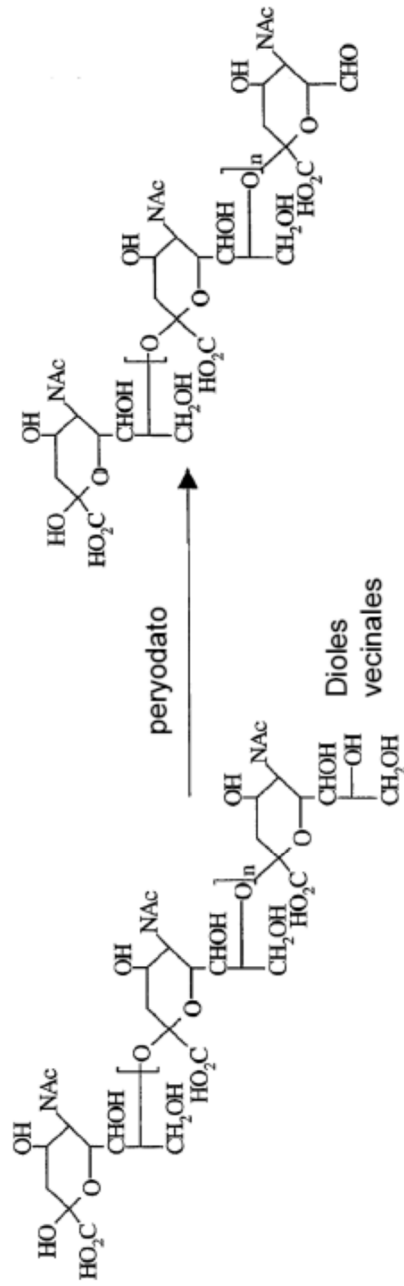


Figura 1

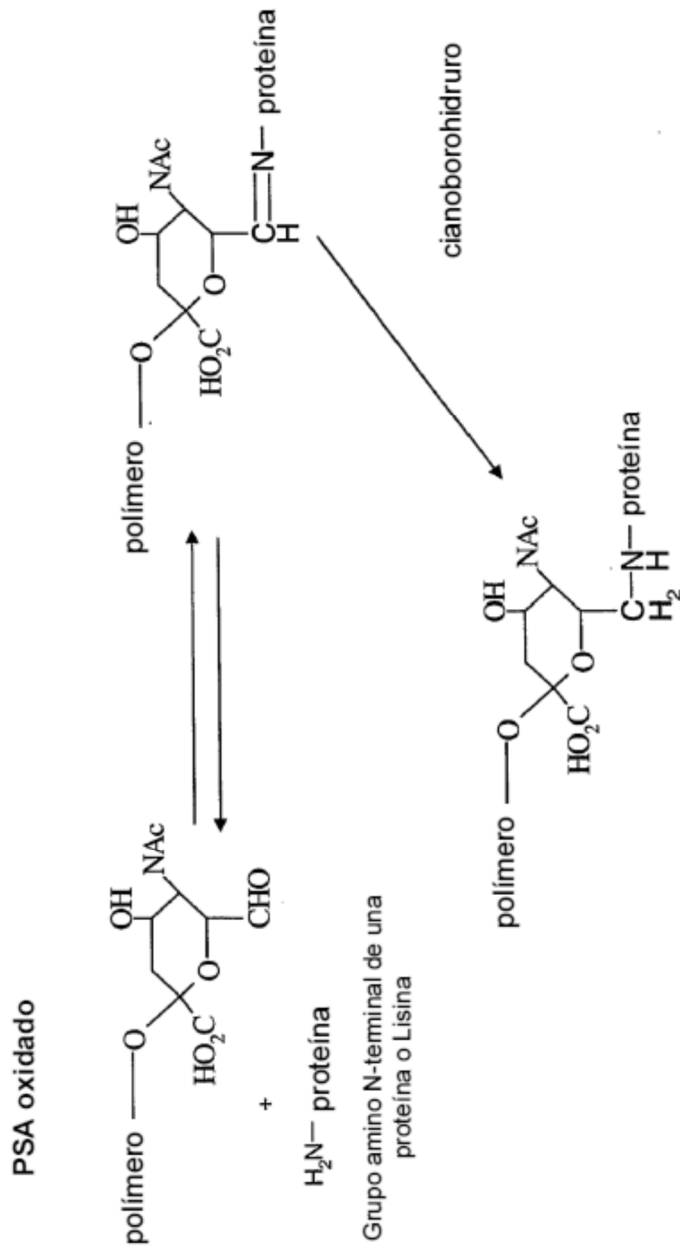


Figura 2

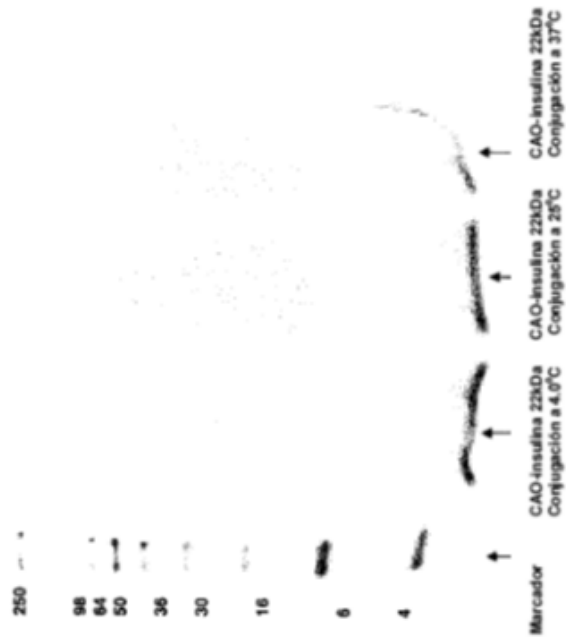


Figura 3

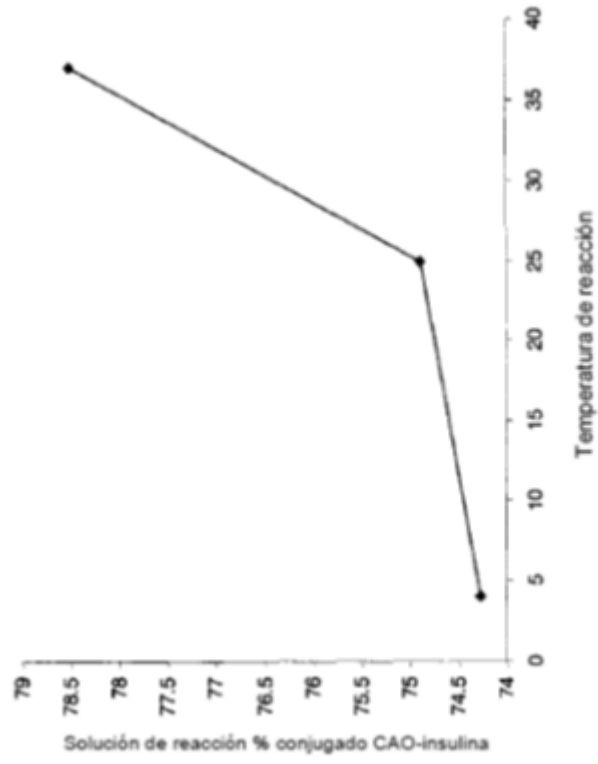


Figura 4

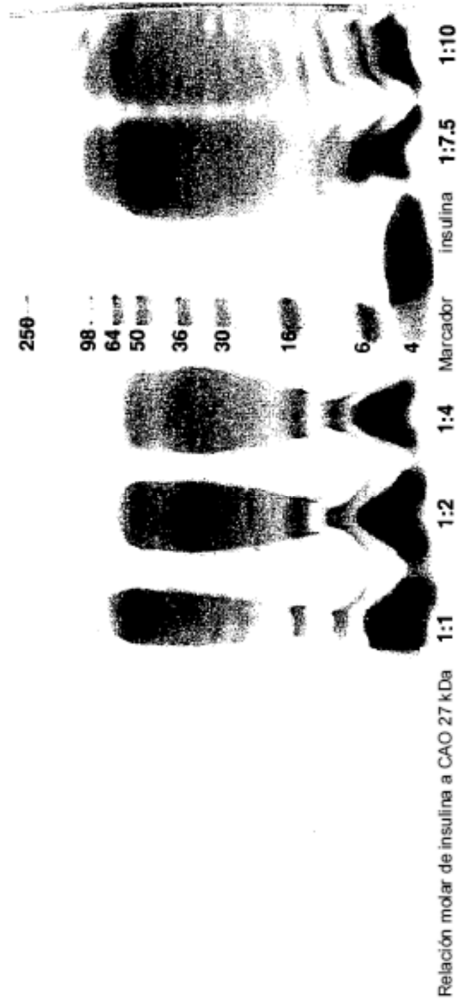


Figura 5

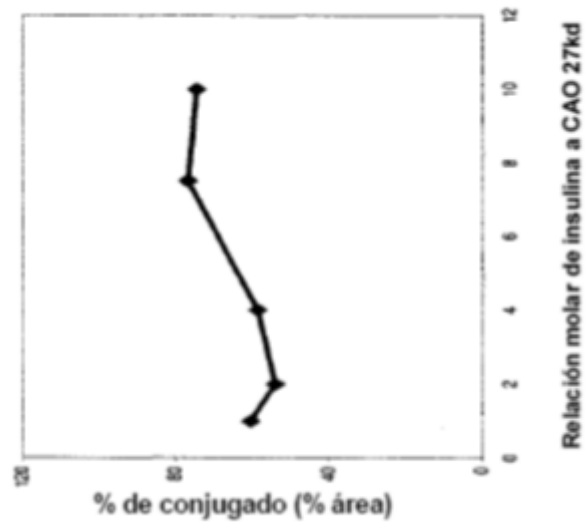


Figura 6



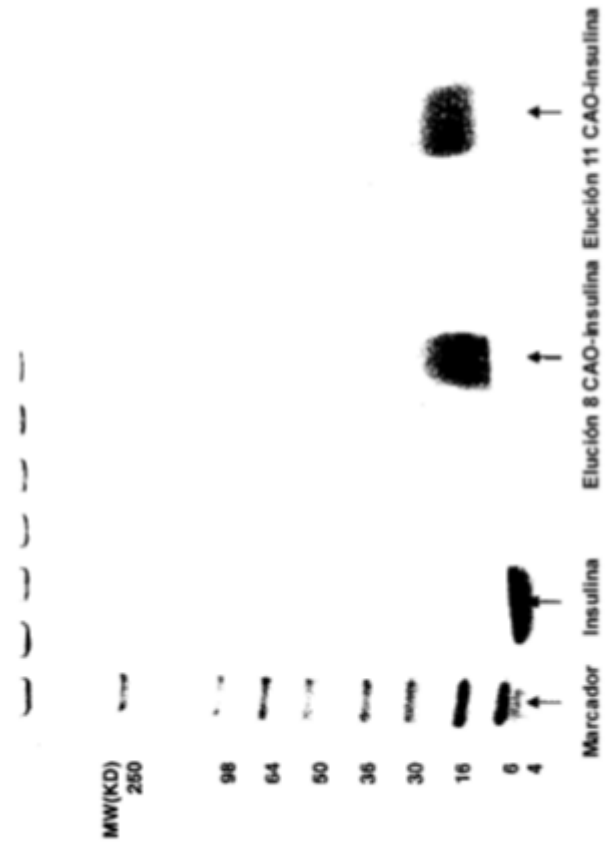


Figura 7

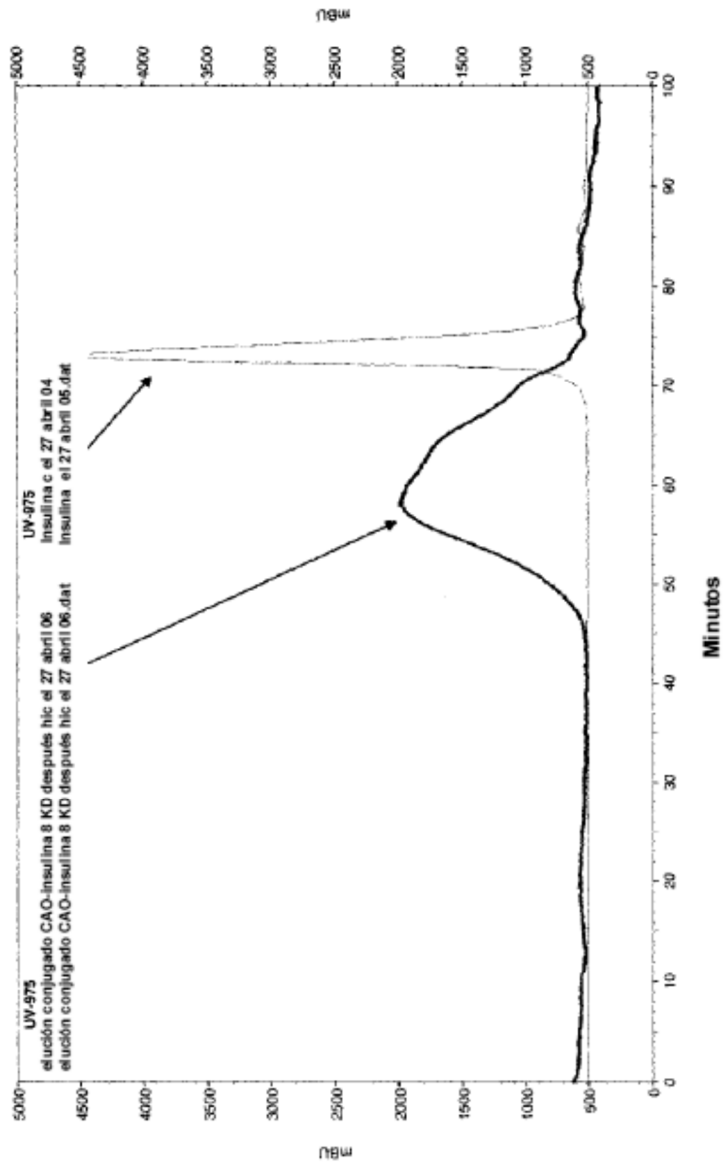


Figura 8

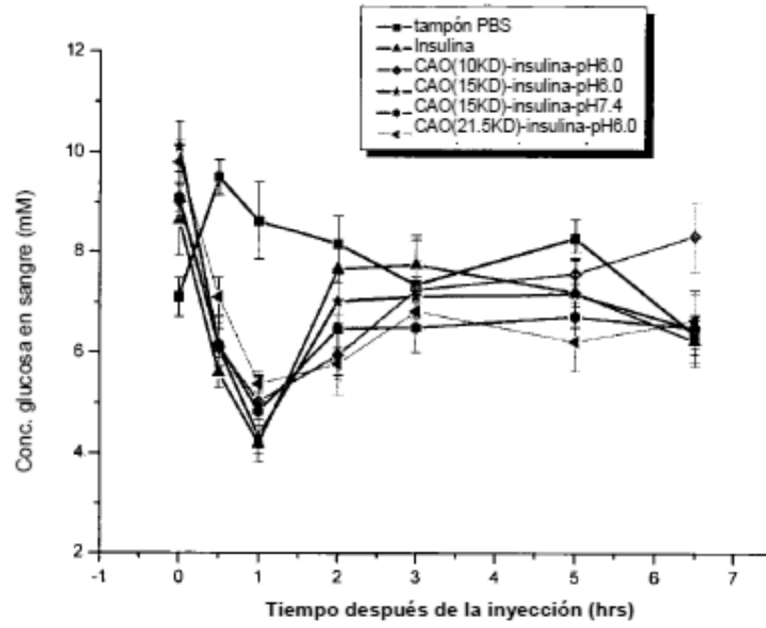


Figura 9

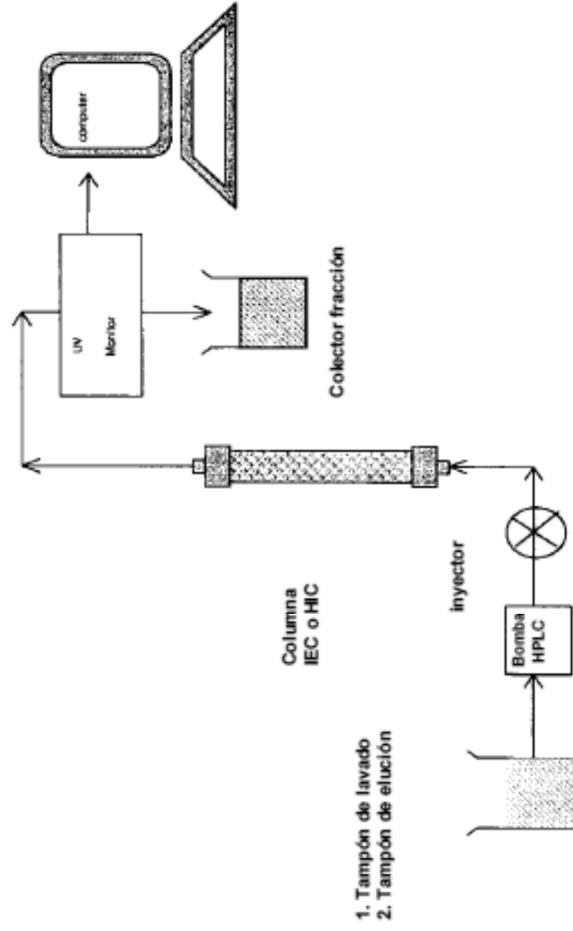


Figura 10

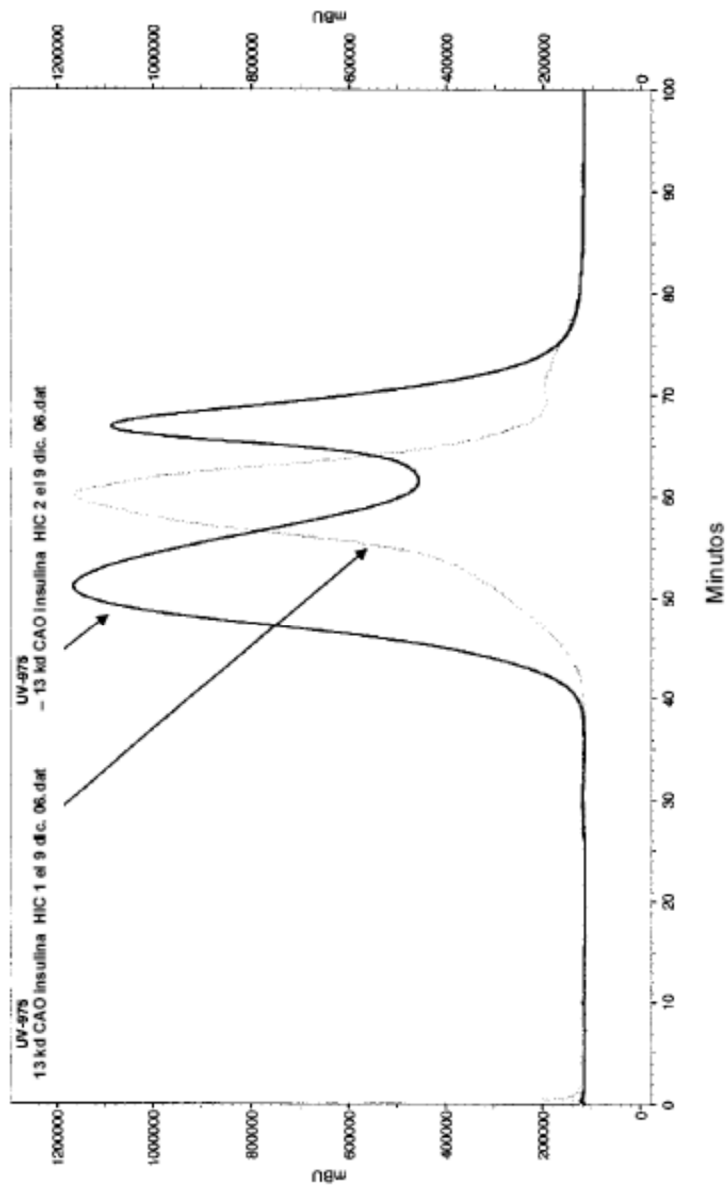


Figura 11

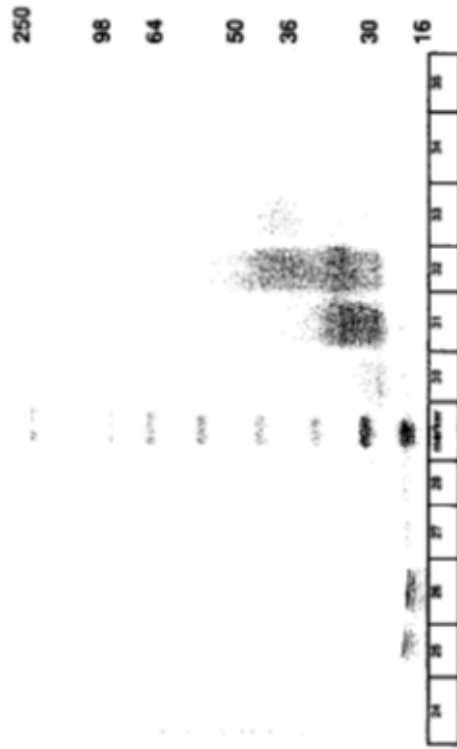


Figura 12

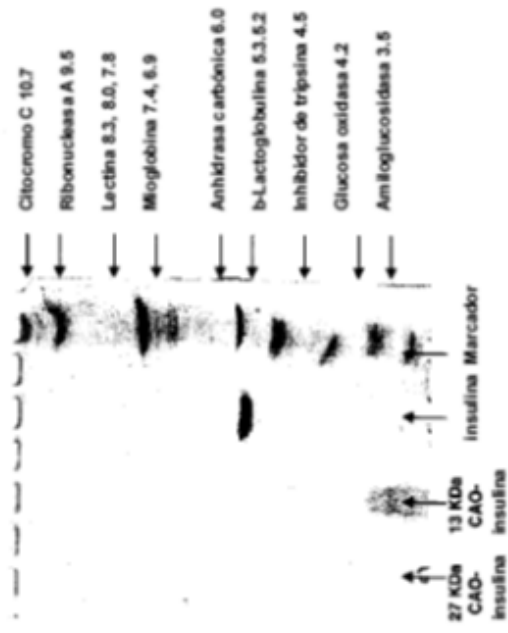


Figura 13

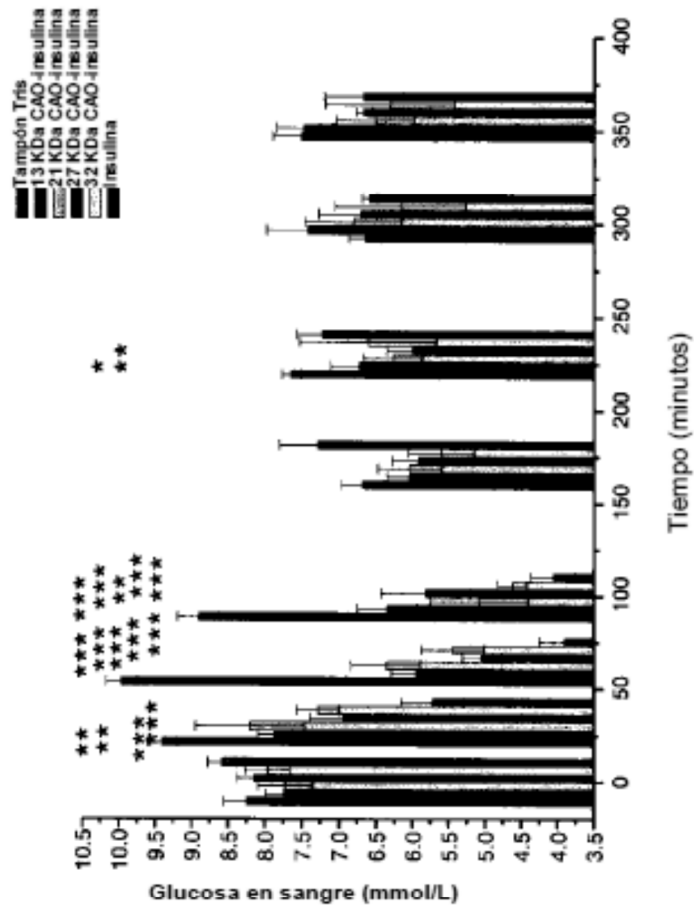


Figura 14



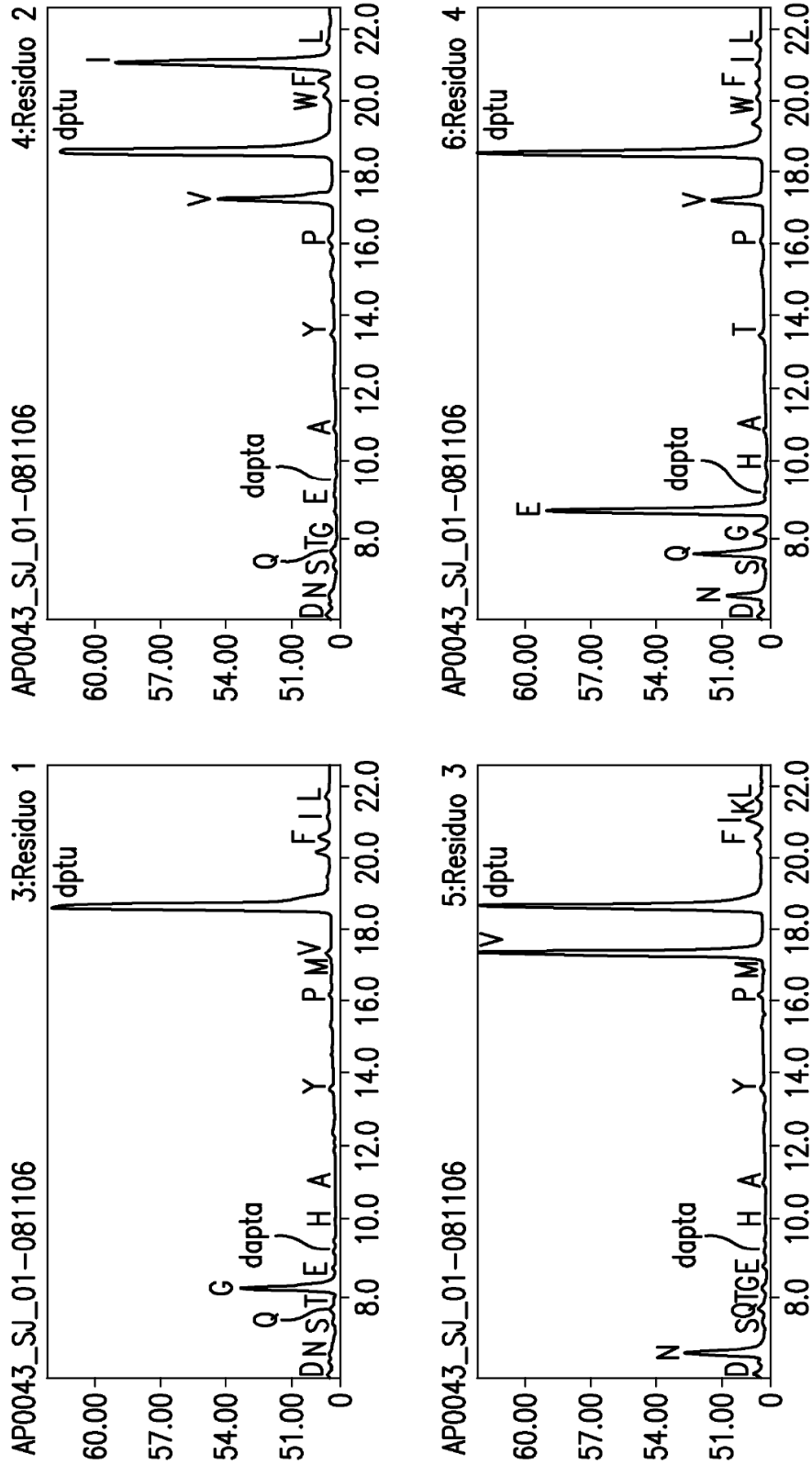


FIG. 15