

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 326**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2013 PCT/KR2013/006673**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14017847**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2013 E 13822348 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2877157**

54 Título: **Formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada**

30 Prioridad:

25.07.2012 KR 20120081477

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2019

73 Titular/es:

**HANMI PHARM. CO., LTD. (100.0%)
 214 Muha-ro Paltan-myeon
 Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-958, KR**

72 Inventor/es:

**LIM, HYUNG KYU;
 KIM, HYUN UK;
 HONG, SUNG HEE;
 KIM, MIN YOUNG;
 BAE, SUNG MIN y
 KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 715 326 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

Formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un conjugado de insulina de acción prolongada, en el que una insulina que es un péptido fisiológicamente activo está unida a una región Fc de inmunoglobulina; y un estabilizante desprovisto de albúmina, en el que el estabilizante comprende un tampón, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y un agente isotónico, y un procedimiento para preparar la formulación.

Antecedentes en la técnica

- 10 La insulina es un péptido que consiste en 51 aminoácidos que tienen un peso molecular de aproximadamente 5.800 Da. La insulina es secretada por las células beta pancreáticas humanas y desempeña un papel central en el control de los niveles de glucosa en la sangre en el cuerpo. Si falta la cantidad de insulina secretada o la insulina secretada no funciona correctamente en el cuerpo, el nivel de glucosa en la sangre se elevará, causando una enfermedad metabólica denominada diabetes. Cuando la insulina no se secreta apropiadamente o no funciona apropiadamente
- 15 en el cuerpo, el nivel de glucosa en la sangre no se puede regular y este tipo de diabetes se conoce como diabetes tipo II. La diabetes tipo I se produce cuando el páncreas no produce suficiente insulina para regular el aumento del nivel de glucosa en la sangre. La diabetes tipo II se suele tratar con agentes hipoglucémicos orales que consisten principalmente en compuestos químicos y, en algunos casos, se trata a los pacientes con insulina. Por otra parte, la diabetes tipo I requiere la administración de insulina.

- 20 El tratamiento con insulina que se utiliza actualmente es una inyección de insulina antes y después de las comidas. Sin embargo, dicha inyección de insulina se debe realizar tres veces al día de manera continua, lo cual causa un intenso dolor y molestias a los pacientes. Ha habido muchas tentativas para resolver estos problemas y una de ellas ha sido la de administrar un fármaco peptídico en el cuerpo a través de la inhalación oral o nasal aumentando la permeabilidad de la biomembrana del fármaco peptídico. Sin embargo, este procedimiento tiene una
- 25 eficiencia significativamente baja para administrar el péptido en el cuerpo en comparación con las inyecciones. Por lo tanto, existen aún muchas limitaciones para mantener la actividad del fármaco peptídico *in vivo* en el nivel requerido.

- Por otra parte, otro procedimiento para administrar el fármaco ha consistido en retrasar la absorción de un fármaco tras una inyección subcutánea de una gran cantidad de fármaco, para mantener un nivel de fármaco continuo en la
- 30 sangre administrando una sola inyección al día. Se han aprobado algunos fármacos (p. ej., Lantus, Sanofi-aventis) como fármacos, y actualmente se están administrando a los pacientes. Asimismo, se han realizado estudios para ampliar la duración *in vivo* haciendo más fuerte el enlace del conjugado de insulina modificando la insulina con ácido graso y haciendo que la insulina se una con albúmina en el sitio de administración y en la sangre, lo cual ha conducido al desarrollo de Levemir (NovoNordisk), que está aprobado como fármaco. Sin embargo, estos
- 35 procedimientos tienen el efecto secundario de causar dolor en el lugar de la inyección y las inyecciones diarias siguen siendo una carga indebida para el paciente.

- Por otra parte, ha habido continuas tentativas para aumentar al máximo los efectos terapéuticos de un fármaco peptídico mejorando su estabilidad en sangre y manteniendo un alto nivel de fármaco en sangre durante un largo
- 40 período de tiempo tras la absorción del fármaco peptídico en el cuerpo. La formulación de acción prolongada de los fármacos peptídicos debería promover un aumento de la estabilidad del fármaco peptídico y mantener también una titulación suficientemente alta del propio fármaco sin inducir respuestas inmunitarias en los pacientes. Para la preparación de las formulaciones de acción prolongada de fármacos peptídicos, se ha utilizado un polímero que tiene una alta solubilidad, como el polietilén glicol (PEG), para modificar químicamente la superficie de un fármaco peptídico.

- 45 PEG se une a un sitio o varios sitios específicos de un péptido diana no específicamente y aumenta el peso molecular del péptido, lo cual a su vez evita la pérdida de péptido en el riñón y la hidrólisis del péptido, sin causar efectos secundarios. Por ejemplo, la publicación de patente internacional WO2006/076471 desvela que al unir PEG a un péptido natriurético de tipo B (BNP), que activa la producción de cGMP a través de la unión con NPR-A y reduce la presión intraarterial, con lo cual es eficaz como agente terapéutico para la insuficiencia cardíaca
- 50 congestiva, se puede mantener la bioactividad de BNP. Igualmente, la patente estadounidense US 6.924.264 describe un procedimiento para aumentar la duración *in vivo* de la exendina-4 uniendo PEG a un resto lisina de una exendina-4. Sin embargo, si bien estos procedimientos pueden extender la duración *in vivo* de un fármaco peptídico al aumentar el peso molecular de PEG, la titulación del fármaco peptídico se reduce a medida que aumenta el peso molecular de PEG.

- 55 Según otro procedimiento para aumentar la estabilidad *in vivo* de proteínas fisiológicamente activas, se ha desarrollado un procedimiento para preparar una proteína de fusión. En este procedimiento, se unen por recombinación genética el gen para proteína que tiene una alta estabilidad en suero y el gen para una proteína fisiológicamente activa y se cultivan las células animales transformadas con el gen recombinante para producir una

proteína de fusión. Por ejemplo, se ha notificado que es posible preparar una proteína de fusión uniendo una albúmina o fragmentos de la misma, que son altamente efectivos para aumentar la estabilidad de la proteína, con una proteína fisiológicamente activa deseada por recombinación genética (publicaciones de patente internacional N° WO 93/15199 y WO 93/15200, y en la publicación de patente europea N° EP 413.622).

5 La publicación de patente internacional número WO 02/46227 describe una proteína de fusión preparada por acoplamiento de GLP-1, exendina-4 o un análogo de la misma con una albúmina de suero humano o un fragmento de inmunoglobulina (Fc) por recombinación genética. La patente estadounidense N° 6.756.480 describe una proteína de fusión preparada por acoplamiento de una hormona paratiroidea (PTH) o un análogo de la misma con un fragmento de inmunoglobulina (Fc). Estos procedimientos pueden superar los problemas del bajo rendimiento de PEGilación y la falta de especificidad, pero siguen teniendo la limitación de que no pueden aumentar significativamente la semivida del péptido en la sangre y, en algunos casos, las titulaciones son bajas. Para aumentar al máximo el efecto del incremento de la semivida en la sangre, se han utilizado varios tipos de engarces peptídicos, pero existe la posibilidad de provocar una respuesta inmunitaria. Además, si se utiliza un péptido tiene enlaces disulfuro, como el BNP, existe una alta posibilidad de un mal plegado y si hay un resto de aminoácido no natural en un engarce peptídico, no puede producirse por recombinación genética.

Recientemente, como formulación de fármaco de proteína de acción prolongada que puede promover una reducción mínima de la actividad y una mayor estabilidad, en el registro de patente coreana N° 10-0567902 (conjugado polipeptídico fisiológicamente activo que tiene una mejor duración *in vivo*) y el registro de patente coreana No. 10-0725315 (complejo de proteínas mediante el uso de un fragmento de inmunoglobulina y procedimiento para su preparación) se desvela un conjugado generado combinando una región Fc de inmunoglobulina, un polímero no peptídico y un polipéptido fisiológicamente activo.

Asimismo, la publicación de patente coreana N° 10-2011-0134210 (conjugado de fármaco derivado de insulina que utiliza un fragmento de inmunoglobulina) desvela que un conjugado de insulina generado por unión de una región Fc de inmunoglobulina, un polímero no peptídico y un análogo de insulina modificado con PEG específicamente en el sitio a través del enlace covalente presentó una mejor semivida en la sangre y redujo el riesgo de tener un nivel bajo de glucosa en la sangre en el cuerpo. A través dicho procedimiento, la insulina se puede aplicar como un polipéptido fisiológicamente activo para preparar un conjugado de insulina de acción prolongada. Para fabricar el medicamento que contiene conjugado de insulina de acción prolongada, es esencial prevenir cambios fisicoquímicos como desnaturalización causada por el calor, agregación, adsorción o hidrólisis utilizados por la luz, el calor o las impurezas en los aditivos durante el almacenamiento o los procesos al mismo tiempo que se mantiene la eficacia *in vivo*. El conjugado de insulina de acción prolongada tiene mayor volumen y peso molecular en comparación con el propio péptido de la insulina y, por lo tanto, es difícil de estabilizar.

Debido a sus diferencias químicas, diferentes proteínas pueden inactivarse gradualmente a diferentes velocidades en diferentes condiciones durante el almacenamiento. Es decir, la extensión del plazo de almacenamiento mediante un estabilizante no es la misma para diferentes proteínas. Por esta razón, la relación, concentración y tipo de estabilizante adecuados que se utilice para mejorar la estabilidad de almacenamiento de las proteínas varían dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de una proteína diana. Asimismo, cuando se utilizan diferentes estabilizantes en combinación, pueden inducir efectos adversos diferentes a los deseados, debido a la interacción competitiva y los efectos secundarios. Asimismo, durante el almacenamiento, pueden cambiar las propiedades de la proteína almacenada o su concentración, causando así diferentes efectos. Por lo tanto, es necesario aplicar un gran esfuerzo y precaución para estabilizar una proteína en solución. En particular, por lo que se refiere a un conjugado de insulina de acción prolongada con una mejor la duración y estabilidad *in vivo* consiste en un péptido fisiológicamente activo, insulina, unido a una región Fc de inmunoglobulina y de esta manera el peso molecular y el volumen de la misma son significativamente diferentes de la insulina general, por lo que requieren una composición específica para estabilizar la proteína.

Además, un péptido fisiológicamente activo, insulina, y una región Fc de inmunoglobulina son péptidos o proteínas fisicoquímicamente diferentes y, por lo tanto, tienen que estabilizarse simultáneamente. Sin embargo, tal como se ha descrito, diferentes péptidos o proteínas pueden inactivarse gradualmente a diferentes velocidades en diferentes condiciones durante el almacenamiento debido a la diferencia fisicoquímica de los mismos. Además, cuando se emplean en combinación los estabilizantes que son adecuados para cada uno de los péptidos o proteínas, pueden inducir efectos adversos diferentes de los efectos deseados, debido a la interacción competitiva y los efectos secundarios. Por lo tanto, en lo que se refiere a un conjugado de insulina de acción prolongada, es muy difícil encontrar una composición estabilizante que pueda estabilizar tanto un péptido fisiológicamente activo, insulina, como una región Fc de inmunoglobulina simultáneamente.

Recientemente, se ha desarrollado una formulación de proteína y péptido que puede utilizarse de forma repetida para comodidad del paciente. Sin embargo, la formulación de varios usos debe contener un conservante para prevenir la contaminación microbiana tras las repetidas administraciones y antes de su eliminación. La formulación de varios usos que contiene conservante presenta algunas ventajas frente a una formulación de un solo uso. Por ejemplo, en lo que se refiere a una formulación de un solo uso, se desperdicia una gran cantidad de medicamento dependiendo de la diferencia en la dosis. En cambio, al usar una formulación de varios usos, se puede reducir la cantidad de producto desperdiciada. Asimismo, se puede utilizar la formulación de varios usos varias veces sin

preocuparse por el crecimiento microbiano dentro de cierto período y, dado que se puede suministrar en un solo envase, se puede reducir al mínimo el paquete, lo cual conlleva beneficios económicos.

5 Sin embargo, el uso de conservantes puede afectar la estabilidad de la proteína. El problema más conocido en cuanto al uso de conservantes es la cuestión de la precipitación. La precipitación de proteínas puede reducir los efectos terapéuticos del fármaco y cuando se administra al cuerpo puede inducir una respuesta inmunitaria inesperada. Por lo tanto, es crucial seleccionar una concentración apropiada y un tipo de conservante que mantenga la capacidad de prevenir la contaminación microbiana al mismo tiempo que no afecta a la estabilidad de las proteínas.

Divulgación de la invención

10 Problema técnico

Teniendo en cuenta estos antecedentes, al tratar de proporcionar una formulación líquida estable de conjugado de insulina de acción prolongada que pueda almacenarse durante un largo período de tiempo sin riesgo de contaminación viral del conjugado de insulina de acción prolongada, los autores de la presente invención han desarrollado una formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1 que puede mejorar la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada utilizando un estabilizante que comprende un tampón, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y un agente isotónico y que se puede utilizar varias veces si se agrega un conservante, y se confirma además que se puede preparar una formulación líquida rentable y estable, por lo que se ha completado la presente invención.

Solución al problema

20 Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un conjugado de insulina de acción prolongada, en el que una insulina, que es un péptido fisiológicamente activo, está unida a una región Fc de inmunoglobulina; y un estabilizante desprovisto de albúmina, en el que el estabilizante comprende un tampón, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y un agente isotónico, en el que el tampón es un tampón acetato que tiene un pH comprendido entre 5,6 a 7,0; el alcohol de azúcar es manitol o sacarosa; el tensioactivo no iónico es polisorbato 20 que tiene una concentración de 0,001 a 0,02 % (p/v); y el agente isotónico es cloruro sódico.

Otras características de la invención son tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas

Efectos ventajosos de la invención

30 Dado que la formulación líquida del conjugado de insulina de acción prolongada de la presente invención está desprovista de albúmina de suero humano y otros factores potencialmente peligrosos para el organismo, no hay riesgo de contaminación viral. Además, puede proporcionar una excelente estabilidad de almacenamiento para un conjugado de insulina de acción prolongada que consiste en una insulina y una región Fc de inmunoglobulina, teniendo así un peso molecular más alto y una mayor duración *in vivo* de la actividad fisiológica en comparación con la proteína de tipo silvestre. Por otra parte, si se agrega un conservante a la formulación, la formulación líquida se puede usar de manera estable varias veces. En particular, la presente invención proporciona una formulación líquida excelente y estable para el conjugado de insulina de acción prolongada. Dicha formulación líquida de la presente invención puede proporcionar una excelente estabilidad en almacenamiento con una formulación simple y proporcionar el fármaco peptídico de forma más rentable en comparación con otros estabilizantes y liofilizadores. Además, la formulación de la presente invención puede retener la actividad de la proteína en el cuerpo durante un período más prolongado en comparación con una formulación de insulina convencional y, por lo tanto, puede utilizarse como una formulación de fármaco eficaz.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 muestra la duración de la ausencia de precipitación de los conjugados de insulina de acción prolongada en las composiciones de la Tabla 7 según se supervisó a 40 °C durante 4 semanas a simple vista. La duración de la ausencia de precipitación indica el período durante el cual no se produjo una precipitación de proteínas después de almacenar el conjugado.

50 La Figura 2 muestra un gráfico de la prueba de intensidad de la inestabilidad de la formulación líquida del conjugado de insulina de acción prolongada a 40 °C. El grupo de control fue la formulación líquida confirmada en los Ejemplos 1 a 4 (acetato de sodio 10 mM, a pH 6,0, 10 mg/ml de cloruro sódico, 10 % (p/v) de manitol, 0,02 % (p/v) de polisorbato 20). Sobre esta base, se preparó el primer grupo de ensayo (línea N° 1) agregando un 0,2 % (p/v) de polisorbato 20 como agente tensioactivo a alta concentración a la formulación líquida, se preparó el segundo grupo de ensayo (línea N° 2) agregando 20 mg/ml de cloruro sódico como agente isotónico a una alta concentración y se preparó el tercer grupo de ensayo (línea N° 3) añadiendo tanto 0,2 % (p/v) de polisorbato 20 como 20 mg/ml de cloruro sódico. Como resultado, el grupo de ensayo N° 2 de la formulación líquida que comprendía acetato de sodio a un pH de 6,0, cloruro sódico, manitol y polisorbato 20, en el que se había aumentado la concentración de cloruro sódico a 20 mg/ml, mantuvo una mayor estabilidad que el grupo de control

(10 mg/ml de cloruro sódico). Sin embargo, cuando la concentración de polisorbato 20 aumentó a 0,2 % (p/v) (grupo de ensayo N° 1), tuvo lugar a precipitación de la proteína 3 semanas después del almacenamiento de la formulación. Cuando las concentraciones de cloruro sódico y polisorbato 20 aumentaron a 20 mg/ml y 0,2 % (p/v), respectivamente, la formulación líquida (N° 3) presentó precipitación de proteína 1 semana después del almacenamiento de la formulación.

Mejor modo de realización de la invención

Según un aspecto para conseguir el objetivo, la presente invención proporciona una formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un conjugado de insulina de acción prolongada, en el que se une una insulina que es un péptido fisiológicamente activo a una inmunoglobulina Fc región; y un estabilizante desprovisto de albúmina, en el que el estabilizante comprende un tampón, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y un agente isotónico, en el que el tampón es un tampón acetato que tiene un pH comprendido entre 5,6 y 7,0; el alcohol de azúcar es manitol o sacarosa; el tensioactivo no iónico es polisorbato 20 que tiene una concentración de 0,001 a 0,02 % y el agente isotónico es cloruro sódico. Además, la presente invención proporciona una formulación que puede utilizarse varias veces si la formulación comprende conservante.

Tal como se utiliza en el presente documento, "conjugado de insulina de acción prolongada" se refiere a un conjugado en el que están unidos una insulina fisiológicamente activa, que comprende un derivado, variante, precursor y fragmento, y una región Fc de inmunoglobulina, y puede referirse a un conjugado que tiene una mayor duración *in vivo* de actividad fisiológica en comparación con una insulina de tipo silvestre. Tal como se utiliza en el presente documento, conjugado de insulina de acción prolongada se refiere a la insulina unida a una región Fc de inmunoglobulina a través de un engarce no peptídico o el engarce peptídico.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "acción prolongada" se refiere a una mejora de la duración de la actividad fisiológica en comparación con la de un tipo silvestre. El término "conjugado" se refiere a la forma en la que se combinan una insulina y una región Fc de inmunoglobulina.

El conjugado de insulina de acción prolongada tiene una mayor duración de la actividad en comparación con la insulina nativa. El tipo de conjugado de insulina de acción prolongada incluye una forma de insulina preparada por modificación, sustitución, adición o eliminación de aminoácidos de la insulina nativa, un conjugado en el que la insulina está unida con un polímero biodegradable como el PEG, un conjugado en el que la insulina está unida con una proteína de alta duración, como albúmina e inmunoglobulina, un conjugado en el que la insulina está unida con un ácido graso que tiene una afinidad de unión con albúmina en el cuerpo, o una forma de insulina en la que la insulina se carga en una nanopartícula biodegradable, pero sin limitarse a ellos.

El conjugado de insulina de acción prolongada utilizado en la presente invención se prepara combinando la insulina sintetizada y una región Fc de inmunoglobulina. El procedimiento para combinar los dos puede ser la reticulación de insulina y una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico o la producción de una proteína de fusión en la que se unen la insulina y una región Fc de inmunoglobulina por recombinación genética.

Tal como se utiliza en el presente documento, "insulina" se refiere a un péptido que es secretado por el páncreas como respuesta a niveles elevados de glucosa en la sangre para absorber la glucosa en el hígado, músculo o tejido adiposo y convertirlo en glucógeno, y para detener el uso de grasa como fuente de energía y, por lo tanto funciona para controlar el nivel de glucosa en la sangre. Este péptido incluye insulina nativa, insulina basal y los agonistas, precursores, derivados, fragmentos y variantes de los mismos.

Tal como se utiliza en el presente documento, "insulina nativa" es una hormona que es secretada por el páncreas para promover la absorción de glucosa e inhibir la descomposición de la grasa y, por lo tanto, funciona para controlar el nivel de glucosa en la sangre. La insulina se genera a partir del procesamiento de su precursor, la proinsulina, que no tiene la función de regular el nivel de glucosa en la sangre. 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)

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-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID NO. 2)

Tal como se utiliza en el presente documento, "insulina basal" se refiere a un péptido que regula los cambios en el nivel normal de glucosa en sangre a lo largo de cada día y los ejemplos de dicho péptido incluyen levemir, glagina y degludec. Tal como se utiliza en el presente documento, "agonista de insulina" se refiere a un compuesto que se une al receptor intrínseco de insulina que muestra la misma actividad biológica que la insulina, independientemente de la diferencia estructural con la insulina. Como se utiliza en este documento, "variante de insulina" se refiere a un

péptido que tiene una o más secuencias de aminoácidos diferentes de la insulina nativa, que tiene la función de regular el nivel de glucosa en la sangre en el cuerpo. El derivado de la insulina se puede preparar a través de uno entre sustitución, adición, supresión y modificación de algunos aminoácidos de la insulina nativa o una combinación de los mismos. Tal como se utiliza en el presente documento, "derivado de insulina" se refiere a un péptido que tiene al menos un 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con la insulina nativa, que puede tener algunos grupos en el resto de aminoácido químicamente sustituido (p.ej., alfa-metilación, alfa-hidroxilación), suprimido (p.ej., desaminación), o modificado (p.ej., N-metilación), y tiene la función de regular el nivel de glucosa en la sangre en el cuerpo. Tal como se utiliza en el presente documento, "fragmento de insulina" se refiere a un fragmento que tiene uno o más aminoácidos agregados o suprimidos en el terminal N o el terminal C de la insulina nativa, en los que se puede agregar aminoácidos de origen no natural (p.ej., aminoácido de tipo D). El fragmento de insulina tiene la función de regular el nivel de glucosa en la sangre en el cuerpo.

Cada uno de los procedimientos de preparación para los agonistas, derivados, fragmentos y variantes de la insulina se puede aplicar de forma individual o concurrente. Por ejemplo, el ámbito de la presente invención comprende un péptido que tiene una o más secuencias de aminoácidos diferentes de las del péptido nativo y el resto de aminoácido N-terminal desaminado, al tiempo que tiene la función de regular el nivel de glucosa en sangre en el cuerpo. La insulina utilizada en la presente invención puede producirse por tecnología de recombinación o sintetizarse por síntesis en fase sólida. Además, la insulina utilizada en la presente invención puede unirse con un polímero no peptidilo en el terminal N de su cadena beta. Dicho polímero no peptidilo se puede utilizar como un engarce en la presente invención. Al combinar la insulina con el polímero no peptidilo como un engarce, puede mejorarse la estabilidad de la insulina al mismo tiempo que se mantiene su actividad.

Tal como se utiliza en el presente documento, "polímero no peptidilo" se refiere a un polímero biocompatible combinado con una o más unidades de repetición, en las que las unidades de repetición están unidas entre sí a través de cualquier enlace covalente, pero no por un enlace peptídico. En la presente invención, se puede utilizar indistintamente "polímero no peptidilo" o "engarce no peptidilo".

El polímero no peptidilo que se puede utilizar en la presente invención puede seleccionarse del grupo que consiste en polímeros biodegradables como polietilen glicol, polipropilen glicol, copolímeros de etilen glicol y propilen glicol, polioles polioxitilados, poli(alcohol vinílico), polisacáridos, dextrano, polivinil éter etílico, poli(ácido láctico) (PLA) y ácido poliláctico-glicólico (PLGA); polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y una combinación de los mismos. Preferentemente, se utiliza polietilen glicol como polímero no peptidilo, pero no se limita a ello. El ámbito de la presente invención también incluye los derivados de los mismos que se conocen perfectamente en la técnica y que pueden prepararse fácilmente aplicando las técnicas disponibles en la materia.

El engarce de peptidilo utilizado en una proteína de fusión, que se prepara mediante un procedimiento de fusión en marco convencional, tiene la limitación de que puede escindir fácilmente mediante proteasa en el cuerpo y, por lo tanto, no puede aumentar la semivida en suero del fármaco activo suficientemente como cuando se utiliza un vehículo. Sin embargo, si se utiliza un polímero resistente a la proteasa, la semivida en suero del péptido se puede mantener similar a cuando se utiliza un vehículo. Por lo tanto, puede utilizarse cualquier polímero no peptidilo sin limitación, siempre y cuando presente la función mencionada, es decir, que sea resistente a la proteasa. El polímero no peptidilo tiene un peso molecular de 1 a 100 kDa y, preferentemente de 1 a 20 kDa. Además, el polímero no peptidilo de la presente invención, que está unido a una región Fc de inmunoglobulina, puede un tipo de polímero simple o una combinación de varios tipos de polímeros diferentes.

El polímero no peptidilo puede tener un grupo funcional que puede unirse a la región Fc de la inmunoglobulina y al fármaco de proteína. Los grupos funcionales del polímero no peptidilo en ambos terminales se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en un grupo aldehído reactivo, un grupo propionaldehído, un grupo butil aldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida. El derivado de succinimida puede ser propionato de succinimidilo, hidroxil succinimidilo, succinimidil carboximetilo o carbonato de succinimidilo. En particular, cuando el polímero no peptidilo tiene un grupo aldehído reactivo en ambos terminales, esto puede reducir al mínimo las uniones no específicas y puede hacer una unión eficaz del polímero no peptidilo con un polipéptido fisiológicamente activo y una inmunoglobulina en cada uno de los terminales. Un producto final generado por la alquilación reductiva mediante un enlace aldehído es mucho más estable que los unidos mediante un enlace amida. Un grupo funcional aldehído se une selectivamente al N-terminal a un pH bajo y forma un enlace covalente con un resto de lisina a un pH alto, por ejemplo a un pH de 9,0. Los grupos funcionales en dos terminales del polímero no peptidilo pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, el polímero no peptidilo puede tener un grupo maleimida en un terminal y un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o un grupo butil aldehído en el otro terminal. Cuando se utiliza un polietilen glicol que tiene un grupo hidroxil en ambos terminales como un polímero no peptidilo, el grupo hidroxil puede activarse en varios grupos funcionales mediante reacciones químicas conocidas, o se puede utilizar un polietilen glicol disponible en el mercado que tiene un grupo funcional modificado para preparar el conjugado de insulina de acción prolongada de la presente invención.

Preferentemente, el polímero no peptidilo puede unirse al terminal N de la cadena beta de la insulina.

La insulina de la presente invención puede reformarse con un polímero no peptidilo. Cuando se desarrolla un conjugado de insulina de acción prolongada utilizando un fragmento de inmunoglobulina, si se modifica con PEG un

- 5 polipéptido fisiológicamente activo para aumentar la duración del fármaco al mismo tiempo que se evita el bajo nivel de glucosa en la sangre, aunque esto puede reducir la titulación, actúa como una ventaja a largo plazo en el conjugado de insulina de acción prolongada. Por lo tanto, la insulina modificada con PEG se puede combinar con la región Fc de inmunoglobulina a través del polímero no peptídico. El tipo de polímero no peptídico que se puede usar para reformar la insulina es el mismo que el descrito anteriormente y, preferentemente polietilén glicol (PEG). En la insulina modificada con PEG, el PEG está unido selectivamente al terminal N-terminal de la cadena alfa de insulina o a un resto de lisina específico de la cadena beta. El PEG que modifica la insulina comprende preferentemente un grupo aldehído o un grupo succinilo en el terminal y más preferentemente un grupo succinilo.
- 10 El procedimiento de preparación y el efecto del conjugado de insulina de acción prolongada de la presente invención se desvelan en las publicaciones de patentes coreanas N° 10-2011-0134210, 10-2011-0134209 y 10-2011-0111267. Los expertos en la materia pueden preparar el conjugado de insulina de acción prolongada utilizado en la presente invención remitiéndose a estas referencias. Además, autores de la presente invención han proporcionado previamente un procedimiento para preparar el conjugado de insulina de acción prolongada por mono-PEGilación del terminal N de la región Fc de inmunoglobulina y modificarlo para la 1ª fenilalanina de la cadena beta de la insulina.
- 15 La insulina utilizada en la presente invención está unida a un vehículo a través de un polímero no peptídico como engarce. El vehículo que puede utilizarse en la presente invención puede seleccionarse del grupo que consiste en región Fc de inmunoglobulina, albúmina, transferrina y PEG y es preferentemente región Fc de inmunoglobulina.
- 20 El conjugado de insulina de acción prolongada de la presente invención tiene insulina unida a la región Fc de la inmunoglobulina a través del engarce no peptídico, que tiene duración y estabilidad. En la presente invención, puede utilizarse indistintamente Fc de inmunoglobulina y fragmento de inmunoglobulina.
- 25 Por otra parte, dado que la región Fc de la inmunoglobulina tiene un peso molecular relativamente bajo en comparación con la molécula de inmunoglobulina completa, un uso de la misma puede ser beneficioso para preparar y purificar el conjugado, así como para obtener un alto rendimiento. Asimismo, la región Fc de inmunoglobulina no contiene un fragmento Fab, que es altamente no homogéneo debido a las diferentes secuencias de aminoácidos de acuerdo con las subclases de anticuerpos y, por lo tanto, es de esperar que la región Fc de la inmunoglobulina tenga una mayor homogeneidad y sea menos antigénica.
- 30 Tal como se utiliza en el presente documento, "región Fc de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que contiene la región constante de cadena pesada 2 (CP2) y la región constante de cadena pesada 3 (CP3) de una inmunoglobulina, excluyendo las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, la región constante de cadena pesada 1 (CP1) y la región constante de cadena ligera 1 (CL1) de la inmunoglobulina. Puede incluir además una región de bisagra en la región constante de la cadena pesada. Además, la región Fc de la inmunoglobulina de la presente invención puede contener una parte o la totalidad de la región Fc, incluyendo la región constante de la cadena pesada 1 (CP1) y/o la región constante de la cadena ligera 1 (CL1), excepto para las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, siempre y cuando tenga una función fisiológica sustancialmente similar o mejor que la proteína nativa. También, puede ser un fragmento que tiene una supresión en una porción relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de CP2 y/o CP3. Es decir, la región Fc de la inmunoglobulina de la presente invención puede comprender (1) un dominio CP1, un dominio CP2, un dominio CP3 y un dominio CP4, (2) un dominio CP1 y un dominio CP2, (3) un dominio CP1 y un dominio CP3, (4) un dominio CP2 y un dominio CP3, (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.
- 35 40
- 45 Asimismo, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos nativa y un derivado de secuencia (mutante) de la misma. Un derivado de secuencia de aminoácidos tiene una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos nativa debido a una supresión, inserción, sustitución conservadora o no conservadora o combinaciones de las mismas de uno o más restos de aminoácidos. Por ejemplo, en una Fc IgG, se pueden usar restos de aminoácidos conocidos por su importancia en la unión, en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322, o 327 a 331, como diana adecuada para la modificación.
- 50 Por otra parte, son posibles otros diversos derivados, incluyendo derivados que tienen una supresión de una región capaz de formar un enlace disulfuro, una supresión de varios restos de aminoácidos en el terminal N de una forma Fc nativa, o una adición del resto de metionina al N-terminal de una forma Fc nativa. Asimismo, para eliminar las funciones efectoras, se puede producir una supresión en un sitio de unión al complemento, como un sitio de unión a C1q y un sitio de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Las técnicas de preparación de dichos derivados de secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se describen en las patentes internacionales WO 97/34631 y WO 96/32478.
- 55 Los intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos, que generalmente no alteran la actividad de las moléculas, son conocidos en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios más comunes 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. La región Fc, si se desea, puede modificarse por fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación,

amidación y similares.

Los derivados de Fc mencionados son derivados que tienen una actividad biológica idéntica a la de la región Fc de la presente invención o una estabilidad estructural mejorada, por ejemplo, contra el calor, el pH o similares.

5 Por otra parte, estas regiones Fc pueden obtenerse a partir de formas nativas aisladas de seres humanos y otros animales, incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsters, ratas y cobayas, o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos de células animales transformadas o microorganismos. En este punto, se pueden obtener a partir de una inmunoglobulina nativa aislando inmunoglobulinas completas de organismos humanos o animales y tratándolas con una enzima proteolítica. La papaína digiere la inmunoglobulina nativa en las regiones Fab y Fc, y el tratamiento con pepsina tiene como resultado la producción de fragmentos pF'c y F(ab)₂. Estos fragmentos pueden someterse, por ejemplo, a cromatografía de exclusión por tamaño para aislar Fc o pF'c. Preferentemente, una región Fc derivada de seres humanos es una región Fc de inmunoglobulina recombinante que se obtiene de un microorganismo.

15 Por otra parte, la región Fc de la inmunoglobulina de la presente invención puede estar en forma de tener cadenas de azúcar nativas, cadenas de azúcar aumentadas en comparación con una forma nativa o cadenas de azúcar disminuidas en comparación con la forma nativa, o puede estar en una forma desglicosilada. El aumento, la disminución o la eliminación de las cadenas de azúcar de inmunoglobulina Fc se pueden lograr a través de procedimientos comunes en la técnica, 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 produce una fuerte disminución de la afinidad de unión al complemento (c1q) y una disminución o pérdida de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente de complementos, por lo que no induce respuestas inmunes innecesarias *in vivo*. En este sentido, una región Fc de inmunoglobulina en una forma desglicosilada o aglicosilada puede ser más adecuada para el objeto de la presente invención como vehículo de fármaco.

20 El término "desglicosilación", tal como se utiliza en el presente documento, significa eliminar enzimáticamente facciones de azúcar de una región Fc, y el término "aglicosilación" significa que se produce una región Fc en forma no glicosilada a través de un procarionta, preferentemente *E. coli*.

Al mismo tiempo, la región Fc de la inmunoglobulina puede ser derivada de seres humanos o animales como vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsters, ratas, cobayas y, preferentemente, seres humanos.

30 Además, la región Fc de la inmunoglobulina puede ser una región Fc que se deriva de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM o que se prepara mediante combinaciones de los mismos o híbridos de los mismos. Preferentemente, se deriva de IgG o IgM, que se encuentra entre las proteínas más abundantes en la sangre humana y lo más preferentemente de IgG, que, tal como se sabe, aumenta la semivida de las proteínas de unión a ligando.

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

40 El término "híbrido", tal como se utiliza en el presente documento, significa que están presentes secuencias que codifican dos o más regiones Fc de inmunoglobulina de origen diferente en una región Fc de inmunoglobulina monocatenaria. En la presente invención, son posibles varios tipos de híbridos. Es decir, los híbridos de dominio pueden estar compuestos de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en CP1, CP2, CP3 y CP4 de Fc IgG, Fc IgM, Fc IgA, Fc IgE y Fc IgD, y pueden incluir la región bisagra.

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

Como vehículo del fármaco de la presente invención, la región Fc de inmunoglobulina más preferente es una región Fc no glicosilada derivada de IgG4 humana. Es más preferente la región Fc derivada de ser humano que una región Fc no derivada de ser humano, que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y causar respuestas inmunitarias no deseadas, como la producción de un nuevo anticuerpo contra el antígeno.

50 La formulación líquida del conjugado de insulina de acción prolongada de la presente invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de conjugado de insulina de acción prolongada. La concentración de conjugado de insulina de acción prolongada utilizada en la presente invención es de 0,1 mg/ml a 200 mg/ml y, preferentemente, de 10 mg/ml a 200 mg/ml. La formulación líquida del conjugado de insulina de acción prolongada de la presente invención puede almacenar de manera estable el conjugado sin precipitación, no solo cuando está presente el conjugado de insulina a baja concentración, sino también cuando está a alta concentración y, por lo tanto, puede proporcionar establemente la insulina a alta concentración en el cuerpo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "estabilizante" se refiere a una sustancia que permite el

almacenamiento estable del conjugado de insulina de acción prolongada. El término "estabilización" se refiere a que la pérdida de un ingrediente activo es inferior a cierta cantidad, generalmente inferior a 10 % durante cierto período y en condiciones específicas de almacenamiento. Una formulación se considera una formulación estable cuando la pureza residual del conjugado de insulina de acción prolongada en la misma es de 90 % o más y, más preferentemente, de 92 a 95 % después de haber sido almacenada a 5 ± 3 °C durante 2 años, a 25 ± 2 °C durante 6 meses, o a 40 ± 2 °C durante 1 a 2 semanas. En cuanto a las proteínas como conjugados de insulina de acción prolongada, la estabilidad de almacenamiento de las mismas es importante para proporcionar una dosificación precisa, así como para suprimir la posible formación de sustancias antigénicas contra el conjugado de insulina de acción prolongada. Durante el almacenamiento, es aceptable un 10 % de pérdida del conjugado de insulina de acción prolongada para una sustancial administración a no ser que cause la formación de agregados o fragmentos en la composición conduciendo a la formación de compuestos antigénicos.

El tampón es acetato de sodio (tampón de acetato Na). La concentración del ácido acético que constituye el tampón de acetato de sodio es preferentemente 5 mM a 100 mM, más preferentemente de 5 mM a 50 mM. El pH del tampón es de 5,6 a 7,0.

El alcohol de azúcar actúa para aumentar la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada. En la presente invención, el alcohol de azúcar se utiliza preferentemente en una cantidad de 1 a 20% (p/v) y más preferentemente en una cantidad de 2 a 15% (p/v) sobre la base del volumen total de la formulación. El alcohol de azúcar de la presente invención es preferentemente manitol.

El agente isotónico tiene el efecto de mantener la presión osmótica adecuada cuando se inyecta una solución del conjugado de insulina en el cuerpo, además de estabilizar aún más el conjugado de insulina de acción prolongada en solución. El agente isotónico es cloruro de sodio. El contenido de agente isotónico puede ajustarse de manera apropiada según el tipo y la cantidad de componentes incluidos en la formulación, de modo que una formulación líquida que comprenda toda la mezcla pueda ser una solución isotónica. Por ejemplo, se puede utilizar el agente isotónico en una concentración de 1 mg/ml a 20 mg/ml.

El tensioactivo no iónico reduce la tensión superficial de la solución de proteína para evitar la absorción o agregación de proteínas en una superficie hidrófoba. El tensioactivo no iónico es polisorbato 20.

No es apropiado utilizar un tensioactivo no iónico a alta concentración en la formulación líquida y esto se debe al hecho de que el tensioactivo no iónico a alta concentración induce efectos de interferencia cuando se mide la concentración de proteína y se determina la estabilidad de la proteína a través de procedimientos de análisis como espectroscopia UV o el enfoque isoeléctrico causando así dificultades para examinar con precisión la estabilidad de la proteína. Por lo tanto, la formulación líquida de la presente invención comprende el tensioactivo no iónico a una concentración de 0,001% a 0,02 % (p/v).

De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, cuando se añadió cloruro de sodio como agente isotónico en presencia de tampón, alcohol de azúcar y tensioactivo no iónico, la estabilidad de almacenamiento del conjugado de insulina de acción prolongada aumentó significativamente. En particular, el conjugado de insulina de acción prolongada presentó una estabilidad marcadamente alta en la formulación que comprendía acetato de sodio 10 mM, de 10 a 20 mg/ml de cloruro de sodio, manitol al 10% (p/v) y polisorbato 20 a 0,02 % (p/v), con un pH de 6,0. Además, la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada fue significativamente alta en la formulación, que comprendía acetato de sodio 10 mM, de 1,2 a 5,9 mg/ml de cloruro de sodio, de 2 a 5% (p/v) de manitol y 0,02 % (p/v) de polisorbato 20 con un pH de 6,0, para generar el equilibrio de la presión osmótica. Esto indica que cuando se utiliza cloruro sódico como agente isotónica en combinación con tampón, alcohol de azúcar y tensioactivo no iónico, según se reivindica, genera efectos sinérgicos, mejorando así la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada.

El estabilizante de la presente invención no contiene albúmina. Dado que la albúmina de suero humano disponible como un estabilizante de la proteína se produce a partir del suero humano, siempre existe la posibilidad de que pueda estar contaminada con virus patógenos de origen humano. La gelatina o la albúmina de suero bovino pueden causar enfermedades o puede ser apta para inducir una respuesta alérgica en algunos pacientes. Desprovisto de proteínas heterólogas, como puedan ser albúminas de suero de origen humano o animal o gelatina purificada, el estabilizante de la presente invención no tiene posibilidad de causar contaminación viral.

Por otra parte, el estabilizante de la presente invención puede comprender además azúcares, polialcohol o aminoácidos neutros. Los ejemplos preferentes de azúcares, que pueden agregarse adicionalmente para aumentar la estabilidad de almacenamiento del conjugado de insulina de acción prolongada, incluyen monosacáridos como manosa, glucosa, fucosa y xilosa y polisacáridos como lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa y dextrano. Los ejemplos preferentes de polialcohol incluyen propileno glicol, polietileno glicol de bajo peso molecular, glicerol, polipropileno glicol de bajo peso molecular y una combinación de los mismos.

Al mismo tiempo, la formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de la presente invención puede comprender además un conservante además del conjugado, el tampón, el agente isotónico, el alcohol de azúcar y el tensioactivo no iónico descritos anteriormente, con el fin de prevenir la contaminación microbiana en

formulaciones de varios usos.

Tal como se utiliza en el presente documento, "conservante" se refiere a un compuesto que se agrega a una formulación farmacéutica para que actúe como un antimicrobiano. Entre los ejemplos de conservante se incluye bencetonio, clorohexidina, fenol, m-cresol, alcohol bencílico, metilparabeno, propilparabeno, clorobutanol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, cloruro de benzalconio, nitrato fenilmercurio, timerosal y ácido benzoico, pero no se limita a él. Se puede usar un solo tipo de conservante individualmente o se puede usar una combinación aleatoria de dos o más tipos de conservante. Preferentemente, la formulación líquida de la presente invención puede comprender uno o más entre m-cresol, fenol y alcohol bencílico como conservante. La formulación líquida de la presente invención puede comprender de 0,001 % a 1 % (p/v) de conservante y, preferentemente, un conservante de 0,001 % a 0,5 % (p/v) de conservante y, más preferentemente de 0,0001 % a 0,25 % (p/v) de conservante.

En un ejemplo de la presente invención, se añadió 0,27% (p/v) de m-cresol como conservante en la formulación líquida de la presente invención y se evaluó el efecto de cresol sobre la estabilidad del conjugado de insulina. Como resultado, se confirmó que el conjugado se mantuvo estable en la formulación en la que se agregó conservante, sin precipitación. Por lo tanto, la formulación líquida de conjugado de insulina de la presente invención, que comprende un conservante además del estabilizante, puede usarse para varias administraciones.

La formulación líquida de la presente invención puede comprender además otras sustancias y materiales conocidos en la técnica de forma selectiva además del tampón, el agente isotónico, el alcohol de azúcar y el tensioactivo no iónico y el conservante descritos anteriormente, siempre y cuando no afecte al efecto de la presente invención.

La formulación líquida desprovista de albúmina del conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la presente invención que proporciona estabilidad al conjugado de insulina de acción prolongada no tiene riesgo de contaminación viral, al mismo tiempo que proporciona una excelente estabilidad de almacenamiento con una formulación simple y, por lo tanto, la formulación de la presente invención se puede proporcionar de forma más rentable en comparación con otro estabilizante o formulación liofilizada.

Además, dado que la formulación líquida de la presente invención comprende el conjugado de insulina de acción prolongada que tiene una mayor duración de la actividad fisiológica en comparación con un tipo silvestre, se puede utilizar como una formulación de fármaco eficaz reteniendo la actividad de la proteína en el cuerpo durante un período más largo en comparación con la formulación de insulina convencional. Además, la formulación líquida de la presente invención proporciona una excelente estabilidad para almacenar un conjugado de insulina de acción prolongada a baja concentración, así como a una concentración alta.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar la formulación líquida de la presente invención.

La formulación líquida de la presente invención se puede preparar generando un conjugado de insulina de acción prolongada en el que se une una insulina, que es un péptido fisiológicamente activo, con una región Fc de inmunoglobulina, y mezclando el conjugado de insulina de acción prolongada con un estabilizante que comprende un tampón, alcohol de azúcar, tensioactivo no iónico y agente isotónico, en el que el tampón es un tampón acetato que tiene un pH comprendido entre 5,6 y 7,0; el alcohol de azúcar es manitol o sacarosa; el tensioactivo no iónico es polisorbato 20 que tiene una concentración de 0,001 a 0,02 % (p/v); y el agente isotónico es cloruro sódico. Además, se puede preparar una formulación líquida estable de conjugado de insulina de acción prolongada para varios usos agregando un conservante además del estabilizante.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para su uso para prevenir o tratar la diabetes, que comprende el conjugado de insulina.

El conjugado de insulina puede estar en una formulación líquida, que es la descrita.

Tal como se utiliza en el presente documento, "diabetes" se refiere a una enfermedad metabólica en la que se carece de secreción de insulina o la insulina no puede funcionar correctamente. Al administrar la composición de la presente invención a un sujeto, la diabetes puede tratarse regulando el nivel de glucosa en sangre.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a todas las acciones que pueden aliviar o cambiar beneficiosamente los síntomas de la diabetes administrando la composición de la presente invención, y el término "prevención" se refiere a todas las acciones que suprimen o retrasan la aparición de la diabetes mediante la administración de la composición. El tratamiento de la diabetes que alivia o cambia de manera beneficiosa los síntomas puede aplicarse a cualquier mamífero que pueda desarrollar diabetes y, entre los ejemplos de dichos mamíferos se incluyen seres humanos y primates, así como ganado como vacas, cerdos, ovejas, caballos, perros y gatos sin limitación y, preferentemente, seres humanos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "administración" se refiere a la introducción de una cantidad predeterminada de una sustancia en el paciente mediante cierto procedimiento adecuado. Las composiciones pueden administrarse a través de cualquiera de las vías convencionales, siempre y cuando sea capaz de alcanzar un tejido objetivo. Las vías de administración incluyen la administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero no se limitan a ellas. Sin

embargo, dado que los péptidos se digieren tras la administración oral, será necesario revestir o formular los principios activos de una composición para administración oral para protegerlos contra la degradación en el estómago. Preferentemente, el conjugado puede administrarse en una forma inyectable. Asimismo, las composiciones pueden administrarse utilizando un determinado aparato capaz de transportar los principios activos a la célula diana.

Por otra parte, la composición farmacéutica de la presente invención se puede determinar según varios factores que incluyen los tipos de enfermedades que se van a tratar, las rutas de administración, la edad, el sexo y el peso del paciente y la gravedad de la enfermedad, así como los tipos de Componente activo del fármaco.

Asimismo, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender vehículos farmacéuticamente aceptables. Tal como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o diluyente que no interrumpe la actividad fisiológica ni las propiedades del compuesto administrado sin estimular a un sujeto. 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 formulación inyectable, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un agente de tampón, un agente conservante, un analgésico, un solubilizante, un agente isotónico y un estabilizante. Para formulaciones de administración tópica, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir una base, un excipiente, un lubricante y un conservante. La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en diversas formas mediante la adición de los vehículos farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, para administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para preparaciones inyectables, la composición farmacéutica puede formularse en una ampolla mono-dosis o en un envase multi-dosis. La composición farmacéutica también puede formularse en soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas y formulación de liberación sostenida.

La formulación líquida del conjugado de insulina de acción prolongada de la presente invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de conjugado de insulina de acción prolongada. En general, la cantidad terapéuticamente eficaz de Lantus (Insulin glargine; Sanofi Aventis), por ejemplo, es de aproximadamente 0,07 mg a 3,7 mg al día. Por otro lado, la dosis máxima aceptable de insulina de la presente invención es de hasta aproximadamente 0,5 mg a 25,9 mg por día, ya que solo es necesario administrarla una vez cada varias semanas sin la necesidad de una administración frecuente.

La composición de la presente invención que comprende el conjugado de insulina de acción prolongada puede reducir eficazmente el nivel de glucosa en sangre incluso con una única administración a la semana sin causar el efecto secundario del aumento de peso y, por lo tanto, puede utilizarse de manera efectiva para prevenir o tratar la diabetes.

Ejemplo 1: Confirmación de los factores que determinan la estabilidad de la formulación líquida del conjugado de insulina de acción prolongada

Se desarrolló el conjugado de insulina de acción prolongada para que tuviera una mayor semivida en la sangre sin causar un nivel bajo de glucosa en la sangre en el cuerpo. El conjugado de insulina, en el que se conjugan una región Fc de inmunoglobulina, un polímero no peptídico y la insulina específicamente en el sitio a través de un enlace covalente, tiene una mayor semivida en la sangre y puede reducir notablemente el riesgo de un nivel bajo de glucosa en la sangre.

Para confirmar la estabilidad de la formulación líquida del conjugado de insulina de acción prolongada, se prepararon las formulaciones de las composiciones de la Tabla 1 y se almacenaron a 40 °C durante 2 semanas, y se analizó su estabilidad por cromatografía de intercambio iónico (IE-HPLC).

En este momento, los principales factores comparados para determinar sus efectos sobre la estabilidad del conjugado fueron el pH, el tipo y concentración de tampón, el tipo de agente isotónico, la concentración de alcohol de azúcar que consiste en manitol, el tipo de tensioactivo, la concentración de tensioactivo que consiste en polisorbato 20, la presencia de otros aditivos y la adición de metionina y cloruro de sodio.

Los resultados de IE-HPLC (%) de la Tabla 1 representan el valor de "% de área/% de área de partida" que demuestra la pureza residual del conjugado de insulina de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

[Tabla 1]

Factores principales		IE-HPLC (%)
pH	5,0~5,4	Precipitación de proteína
	5,6	87,9
	6,0	88,1

ES 2 715 326 T3

(continuación)

Factores principales		IE-HPLC (%)
	6,5	81,9
	7,0	70,4
Tipo de tampón	Acetato de sodio	91,5
	Citrato sódico	90,5
	Fosfato sódico	89,4
	Histidina	Precipitación de proteína
Concentración de tampón	Acetato de sodio 5 mM	83,2
	Acetato de sodio 10 mM	83,6
	Acetato de sodio 20 mM	83,5
	Acetato de sodio 40 mM	83,4
Tipo de agente isotónico	Cloruro sódico	83,5
	Glicerina	81,7
	Sorbitol	81,6
Concentración de manitol	2,5 %	74,4
	5,0 %	76,1
	10,0 %	76,8
Tipo de tensioactivo	Polisorbato 20	83,5
	Polisorbato 80	83,3
	Polisorbato 188	83,0
Concentración de polisorbato 20	0,005 %	88,4
	0,01 %	88,5
	0,02 %	88,9
Presencia de otros aditivos	p/0 cloruro de zinc	77,9
	p/20 mg/ml cloruro de zinc	70,9
	p/0 fenol	74,4
	p/1,5 mg/ml fenol	73,5
	p/0 metionina	74,4
	p/0,1 mg/ml metionina	77,0

[Tabla 2]

	pH	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
Nº 1	5,6	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	10 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20

(continuación)

	pH	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
Nº 2	6,0	Acetato de sodio mM	10 mg/ml NaCl	10 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20

5 Como resultado del análisis, la formulación líquida del conjugado de insulina de acción prolongada fue sobre todo estable cuando comprendió un tampón que consistió en acetato de sodio, un agente isotónico que consistió en cloruro de sodio, un alcohol de azúcar que consistió en manitol, un tensioactivo que consistió en polisorbato 20, a un pH de 5,6 o 6,0, tal como se muestra en la Tabla 2.

Ejemplo 2: Evaluación de la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada dependiendo de las concentraciones de agente isotónico y tensioactivo

10 Sobre la base de la formulación líquida confirmada en el Ejemplo 1 (acetato de sodio 10 mM, a pH 6,0, 10 mg/ml cloruro de sodio, manitol al 10 % (p/v), polisorbato 20 al 0,02 % (p/v)), se examinó la estabilidad de la el conjugado de insulina de acción prolongada dependiendo de las concentraciones de agente isotónico y tensioactivo. En este momento, las concentraciones del agente isotónico y el tensioactivo se establecieron dentro del intervalo máximo aceptable recomendado por las formulaciones disponibles en el mercado y los centros autorizados.

15 Se prepararon las formulaciones líquidas de conjugado de insulina de acción prolongada en las composiciones de la Tabla 3 y se almacenaron a 40 °C durante 4 semanas. A continuación, se examinó la estabilidad por IE-HPLC y cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC).

Los resultados de IE-HPLC (%) y SE-HPLC (%) de la Tabla 4 representan el valor de "% de área/% de área de partida" que demuestra la pureza residual del conjugado de insulina de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

20

[Tabla 3]

	pH	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
Grupo de control	6,0	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	10 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20
Nº 1	6,0	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	10 % Manitol	0,2 % Polisorbato 20
Nº 2	6,0	Acetato de sodio 10 mM	20 mg/ml NaCl	10 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20

[Tabla 4]

	IE-HPLC (%)					SE-HPLC (%)				
	Inicio	1 sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.	Inicio	1 sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.
Grupo de control	100	90,47	81,82	73,64	64,92	100	97,26	95,66	92,38	90,16
Nº 1	100	90,29	81,97	73,38	N/A*	100	97,19	95,54	92,18	N/A
Nº 2	100	91,44	83,66	75,62	66,76	100	97,79	96,46	93,87	92,02

N/A: Datos no disponibles debido a la precipitación por agregación.

25 Tal como se muestra arriba, cuando se incrementó la concentración de cloruro de sodio a 20 mg/ml (Grupo de ensayo Nº 2) en la formulación líquida confirmada en el Ejemplo 2 (acetato de sodio 10 mM, pH 6,0, cloruro de sodio 10 mg/ml, 10 % (p/v) manitol, 0,02 % (p/v) polisorbato 20), la estabilidad del conjugado fue la mayor. Por otro lado, cuando la concentración de polisorbato 20 se incrementó a 0,2 % (p/v) (Grupo de ensayo Nº 1), la precipitación de proteínas tuvo lugar 3 semanas después de almacenar la formulación y al cabo de 4 semanas de almacenamiento, aumentó el nivel de precipitación (Tabla 4).

30 **Ejemplo 3: Evaluación de la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada dependiendo del tipo de alcohol de azúcar**

35 Entre los ejemplos del alcohol de azúcar que se puede agregar a la formulación para mejorar la estabilidad de almacenamiento del conjugado de insulina de acción prolongada se incluyen monosacáridos como manosa, glucosa, fucosa y xilosa; y polisacáridos como lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa y dextrano. Entre ellos, se analizó la sacarosa en cuanto a su efecto en la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada, ya que se confirmó que la sacarosa tenía el efecto de reducir la desamidación (J. of Pharmaceutical Sciences, Vol. 94, 2005). En este

momento, la concentración de sacarosa se encontraba dentro del intervalo máximo aceptable recomendado por las formulaciones disponibles comercialmente y los centros autorizados.

5 Se prepararon las formulaciones líquidas de conjugado de insulina de acción prolongada de las composiciones de la Tabla 5 y se almacenaron a 40 °C durante 4 semanas, y se examinó la estabilidad de las mismas realizando una prueba de estabilidad utilizando IE-HPLC y SE-HPLC. IE-HPLC (%) y SE-HPLC (%) de la Tabla 6 representan el valor de "% de área/% de área de partida" que demuestra la pureza residual del conjugado de insulina de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

[Tabla 5]

	pH	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
Grupo de control	6,0	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	10 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20
Nº 1	6,0	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	7 % sacarosa	0,02 % Polisorbato 20
Nº 2	6,0	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	7 % sacarosa	0,2 % Polisorbato 20
Nº 3	6,0	Acetato de sodio 10 mM	20 mg/ml NaCl	7 % sacarosa	0,02 % Polisorbato 20

10

[Tabla 6]

	IE-HPLC (%)					SE-HPLC (%)				
	Inicio	1 sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.	Inicio	1 sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.
Grupo de control	100	90,47	81,82	73,64	64,92	100	97,26	95,66	92,38	90,16
Nº 1	100	89,46	82,06	73,28	63,08	100	97,21	95,63	92,47	90,28
Nº 2	100	90,43	82,00	73,42	61,25	100	96,96	95,62	92,43	90,21
Nº 3	100	90,45	81,96	73,84	64,90	100	97,27	95,77	92,85	90,52

15

Tal como queda indicado, cuando se agregó sacarosa en lugar de manitol como un alcohol de azúcar, que se puede agregar para mejorar la estabilidad de almacenamiento del conjugado de insulina de acción prolongada (grupo de ensayo Nº 1), la estabilidad de la formulación fue similar a la del grupo de control de formulación líquida (acetato de sodio 10 mM, pH 6,0, cloruro de sodio 10 mg/ml, manitol al 10 % (p/v), polisorbato 20 al 0,02 % (p/v)). Asimismo, cuando la concentración de cloruro de sodio se incrementó a 20 mg/ml en la formulación líquida que comprende sacarosa (grupo de ensayo Nº 3), la estabilidad de la formulación líquida fue similar a la del grupo de control de la formulación líquida. Asimismo, cuando se incrementó la concentración de polisorbato 20 a 0,2 % (p/v) (grupo de ensayo Nº 2), la estabilidad de la formulación líquida se redujo en comparación con el grupo sin el aumento de la concentración de polisorbato 20 y también causó la precipitación de proteínas al cabo de 3 semanas de almacenamiento. En cuanto al grupo de ensayo Nº 2, se examinó la pureza después de eliminar los precipitados y se confirmó que se había reducido la estabilidad del grupo de ensayo Nº 2 en comparación con otras formulaciones (Tabla 6).

20

Ejemplo 4: Evaluación de la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada a varios pH

25

Sobre la base de la formulación líquida que consiste en tampón, cloruro de sodio, manitol y polisorbato 20, se examinó la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada a varios pH.

Se prepararon las formulaciones líquidas de conjugado de insulina de acción prolongada de la composición de la Tabla 7 y se almacenaron a 40 °C durante 4 semanas. A continuación, se examinó la estabilidad de las formulaciones supervisando la precipitación de proteínas a simple vista.

30

[Tabla 7]

	pH	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
Grupo de control	6,0	Acetato de sodio 10 mM	mg/ml NaCl 10	10 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20
Nº 1	5,2	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	10 % Manitol	0,2 % Polisorbato 20
Nº 2	5,6	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	10 % Manitol	0,2 % Polisorbato 20
Nº 3	6,0	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	10% Manitol	0,2 % Polisorbato 20

(continuación)

	pH	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
Nº 4	5,2	Acetato de sodio 10 mM	20 mg/ml NaCl	10% Manitol	0,02 % Polisorbato 20
Nº 5	5,6	Acetato de sodio 10 mM	20 mg/ml NaCl	10% Manitol	0,02 % Polisorbato 20
Nº 6	6,0	Acetato de sodio 10 mM	20 mg/ml NaCl	10% Manitol	0,02 % Polisorbato 20
Nº 7	5,2	Acetato de sodio 10 mM	20 mg/ml NaCl	10% Manitol	0,2 % Polisorbato 20
Nº 8	5,6	Acetato de sodio 10 mM	20 mg/ml NaCl	10% Manitol	0,2 % Polisorbato 20
Nº 9	6,0	Acetato de sodio 10 mM	20 mg/ml NaCl	10% Manitol	0,2 % Polisorbato 20

5 La duración de la ausencia de precipitación de proteínas (en semana) en la Figura 1 representa el tiempo durante el cual no se produjo la precipitación de proteínas después de almacenar la formulación a 40 °C. Tal como se muestra arriba, en acetato de sodio 10 mM, pH 5,2 (Grupos de ensayo Nº 1, Nº 4 y Nº 7), se produjo precipitación de proteínas a 40 °C en el curso de la primera semana de almacenamiento. En acetato de sodio 10 mM, pH 5,6 (grupos de ensayo Nº 2, Nº 5 y Nº 8), tuvo lugar la precipitación de proteínas a 40 °C en el curso de las 2 semanas de almacenamiento. Sin embargo, cuando se almacenó en acetato de sodio 10 mM, pH 6,0 (grupos de ensayo Nº 3, Nº 6 y Nº 9), no tuvo lugar la precipitación de proteínas a 40 °C durante hasta 3 semanas. Entre estos, cuando la concentración de cloruro de sodio se incrementó a 20 mg/ml en acetato de sodio 10 mM, pH 6,0 (grupo de ensayo Nº 6), la estabilidad del conjugado fue la mayor (Figura 1).

Ejemplo 5: Evaluación de la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada dependiendo de las altas concentraciones de agente isotónico y tensioactivo individualmente o en combinación

15 Una vez confirmada la formulación líquida en los Ejemplos 1 a 4 (acetato de sodio 10 mM, pH 6,0, 10 mg/ml de cloruro de sodio, 10% (p/v) de manitol, 0,02 % (p/v) de polisorbato 20) como base, se agregaron 20 mg/ml de cloruro de sodio como agente isotónico a alta concentración y el 0,2 % (p/v) de polisorbato 20 como agente tensioactivo a alta concentración forma individual o simultáneamente. A continuación, se comparó la estabilidad de las formulaciones.

20 Se prepararon las formulaciones líquidas de conjugado de insulina de acción prolongada de la composición de la Tabla 8 y se almacenaron a 40 durante 4 semanas. Luego se examinó su estabilidad realizando una prueba de estabilidad utilizando IE-HPLC y SE-HPLC.

IE-HPLC (%) y SE-HPLC (%) de la Tabla 9 representan el valor de "% de área% de área de partida" que demuestra la pureza residual del conjugado de insulina de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

25 [Tabla 8]

	pH	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
Grupo de control	6,0	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	10 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20
Nº 1	6,0	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	10 % sacarosa	0,2 % Polisorbato 20
Nº 2	6,0	Acetato de sodio 10 mM	20 mg/ml NaCl	10 % sacarosa	0,02 % Polisorbato 20
Nº 3	6,0	Acetato de sodio 10 mM	20 mg/ml NaCl	10 % sacarosa	0,2 % Polisorbato 20

[Tabla 9]

	IE-HPLC (%)					SE-HPLC (%)				
	Inicio	1 sem.	2 sem.	3sem.	4 sem.	Inicio	1 sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.
Grupo de control	100	90,47	81,82	73,64	64,92	100	97,26	95,66	92,38	90,16
Nº 1	100	90,29	81,97	73,38	N/A	100	97,19	95,54	92,18	N/A
Nº 2	100	91,44	83,66	75,62	66,76	100	97,79	96,46	93,87	92,02

(continuación)

	IE-HPLC (%)					SE-HPLC (%)				
	Inicio	1 sem.	2 sem.	3sem.	4 sem.	Inicio	1 sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.
N° 3	100	91,37	N/A	N/A	N/A	100	97,83	N/A	N/A	N/A

Tal como se muestra arriba, cuando se incrementó la concentración de cloruro de sodio a 20 mg/ml (grupo de ensayo N° 2) en comparación con el grupo de control de la formulación líquida (acetato de sodio 10 mM, pH 6,0, cloruro de sodio 10 mg/ml, 10% (p/v) manitol, 0,02 % (p/v) polisorbato 20), la estabilidad del conjugado fue la máxima. Por otro lado, cuando se incrementó la concentración de polisorbato 20 a 0,2 % (p/v) (grupo de ensayo N° 1), la precipitación de proteínas ocurrió después de 3 semanas de almacenamiento, que se incrementó después de 4 semanas de almacenamiento. Además, cuando se añadieron 20 mg/ml de cloruro sódico como agente isotónico a alta concentración y 0,2 % (p/v) de polisorbato 20 como tensioactivo a alta concentración simultáneamente (grupo de ensayo N° 3), se produjo una precipitación de proteínas a 40 dentro de las 2 semanas de almacenamiento (Tabla 9 y Figura 2).

Ejemplo 6: Evaluación de la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada dependiendo de la adición de agente isotónico a baja concentración y alcohol de azúcar a baja concentración

Una vez confirmada la formulación líquida en los Ejemplos 1 a 4 (acetato de sodio 10 mM, pH 6,0, 10 mg/ml de cloruro de sodio, 10 % (p/v) de manitol, 0,02 % (p/v) de polisorbato 20) como base, se prepararon formulaciones líquidas que tenían una combinación de 1,2 a 5,9 mg/ml de cloruro de sodio como agente isotónico a baja concentración y de 2 a 5 % (p/v) de manitol como alcohol de azúcar a baja concentración y se examinó la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada.

Se prepararon las formulaciones líquidas de conjugado de insulina de acción prolongada de la composición de la Tabla 10 y se almacenaron a 25 °C durante 4 semanas. A continuación, se examinó la estabilidad del conjugado realizando una prueba de estabilidad utilizando IE-HPLC y SE-HPLC.

IE-HPLC (%) y SE-HPLC (%) de la Tabla 11 representan el valor de "% del área/% del área de partida" que demuestra la pureza residual del conjugado de insulina de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

[Tabla 10]

	pH	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
Grupo de control	6,0	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	10 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20
N° 1	6,0	Acetato de sodio 10 mM	5,9 mg/ml NaCl	2 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20
N° 2	6,0	Acetato de sodio 10 mM	1,2 mg/ml NaCl	5 % Manitol	0,2 % Polisorbato 20

[Tabla 11]

	IE-HPLC (%)					SE-HPLC (%)				
	Inicio	1 sem.	2 sem.	3sem.	4 sem.	Inicio	1 sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.
Grupo de control	100	99,75	98,86	97,49	95,79	100	99,80	99,53	99,31	99,15
N° 1	100	99,72	98,87	97,50	95,78	100	99,80	99,55	99,33	99,14
N° 2	100	99,72	98,85	97,53	95,72	100	99,78	99,54	99,32	98,99

Tal como se muestra arriba, las formulaciones líquidas que comprenden 1,2 a 5,9 mg/ml de cloruro de sodio como agente isotónico y de 2 a 5 % (p/v) de manitol como alcohol de azúcar (grupo de ensayo N° 1, N° 2) presentaron una estabilidad comparable con la formulación líquida confirmada en los Ejemplos 1 a 4 (acetato de sodio 10 mM, pH 6,0, 10 mg/ml de cloruro de sodio, manitol al 10 % (p/v), polisorbato 20 al 0,02 % (p/v)).

Ejemplo 7: Evaluación de la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada dependiendo de la adición de conservante

Se comparó la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada al añadir el conservante a la formulación líquida confirmada en los Ejemplos 1 a 4 (acetato de sodio 10 mM, pH 6,0, cloruro de sodio 10 mg/ml, manitol al 10 % (p/v), 0,02 % (p/v) de polisorbato 20) y a la formulación líquida confirmada en el Ejemplo 6 (acetato de sodio 10

mM, pH 6,0, de 1,2 a 5,9 mg/ml de cloruro de sodio, 2 a 5% (p/v) manitol, 0,02 % (p/v) polisorbato 20) para generar el equilibrio de la presión osmótica.

5 Se preparó la formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada en la composición de la Tabla 12 y se almacenó a 25 °C durante 4 semanas. A continuación, se examinó la estabilidad del conjugado realizando una prueba de estabilidad utilizando IE-HPLC y SE-HPLC.

IE-HPLC (%) y SE-HPLC (%) de la Tabla 13 representan el "% de área/área de partida" que demuestra la pureza residual del conjugado de insulina de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

[Tabla 12]

	pH	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo	Conservante
Grupo de control	6,0	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	10 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20	-
Nº 1	6,0	Acetato de sodio 10 mM	10 mg/ml NaCl	10 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20	0,27 % m-cresol
Nº 2	6,0	Acetato de sodio 10 mM	5,9 mg/ml NaCl	2 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20	-
Nº 3	6,0	Acetato de sodio 10 mM	5,9 mg/ml NaCl	2 % Manitol	0,02 % Polisorbato 20	0,27 % m-cresol
Nº 4	6,0	Acetato de sodio 10 mM	1,2 mg/ml NaCl	5 % Manitol	0,2 % Polisorbato 20	-
Nº 5	6,0	Acetato de sodio 10 mM	1,2 mg/ml NaCl	5 % Manitol	0,2 % Polisorbato 20	0,27 % m-cresol

10

[Tabla 13]

	IE-HPLC (%)					SE-HPLC (%)				
	Inicio	1 sem.	2 sem.	3sem.	4 sem.	Inicio	1 sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.
Grupo de control	100	99,75	98,86	97,49	95,79	100	99,80	99,53	99,31	99,15
Nº 1	100	99,67	98,55	96,66	94,54	100	99,64	99,30	98,62	98,31
Nº 2	100	99,72	98,87	97,50	95,78	100	99,80	99,55	99,33	99,14
Nº 3	100	99,65	98,68	96,64	94,61	100	99,62	99,32	98,63	98,33
Nº 4	100	99,72	98,85	97,53	95,72	100	99,78	99,54	99,32	98,99
Nº 5	100	99,63	98,63	96,59	94,53	100	99,59	99,18	98,49	98,01

15 Tal como queda indicado, las formulaciones líquidas que comprenden 0,27% (p/v) de m-cresol como conservante (grupos de ensayo Nº 1, Nº 3 y Nº 5) presentaron una estabilidad comparable con las formulaciones líquidas sin el conservante (grupo de control, Nº 2 y Nº 4), como se muestra al agregar 0,27% (p/v) de m-cresol a la formulación líquida confirmada en los Ejemplos 1 a 4 (acetato de sodio 10 mM, pH 6,0, cloruro de sodio 10 mg/ml, 10% (p/v) manitol, 0,02 % (p/v) polisorbato 20) y a la formulación líquida confirmada en el Ejemplo 6 para la misma presión osmótica (acetato de sodio 10 mM, pH 6,0, 1,2 a 5,9 mg/ml de cloruro de sodio, de 2 a 5 % (p/v) manitol, 0,02 % (p/v) polisorbato 20).

20 Estos resultados demuestran que la composición de la formulación líquida de la presente invención podría mantener una alta estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada, incluso cuando se añade un conservante a la composición.

25 Sobre la base de esta descripción, las personas expertas en la materia podrán deducir que es posible realizar diversas modificaciones y cambios sin apartarse del ámbito y espíritu de la invención. Por lo tanto, debe entenderse que la realización anterior no es exhaustiva, sino ilustrativa en todos los aspectos. El ámbito de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas en lugar de por la descripción que las precede y, por lo tanto, todos los cambios y modificaciones que se encuentran dentro de los límites de las reivindicaciones, o equivalentes de dichos

objetivos y límites, por lo tanto, deben ser abarcados por el reivindicaciones.

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Una formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada

<130> OPA13095/PCT

5 <150> 10-2012-0081477

<151> 25-07-2012

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

10 <211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

15 <210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

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

20

REIVINDICACIONES

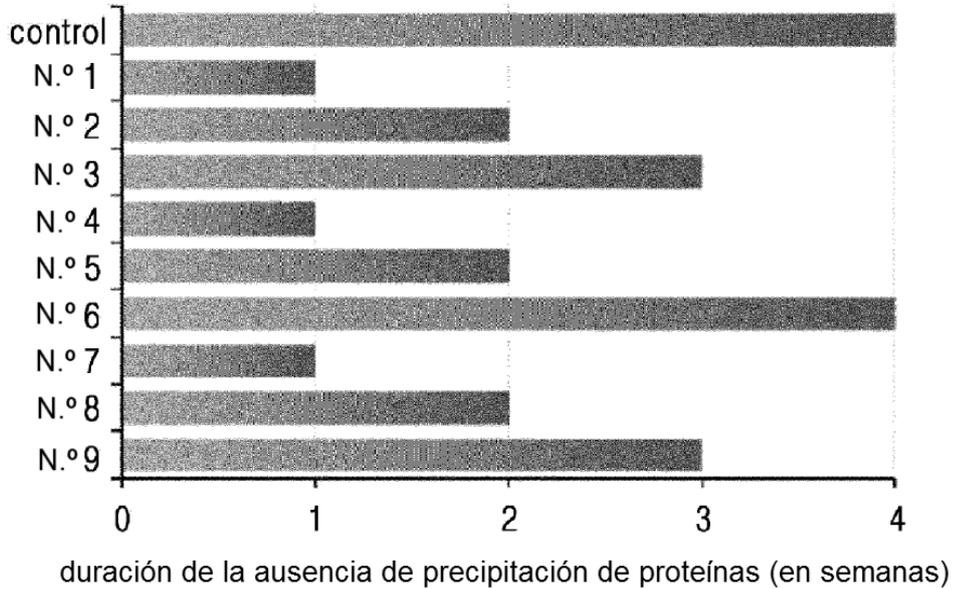
- 5 1. Una formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un conjuntado de insulina de acción prolongada, en el que una insulina, que es un péptido fisiológicamente activo, se une a una región Fc de inmunoglobulina; y un estabilizante desprovisto de albúmina, en el que el estabilizante comprende un tampón, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y un agente isotónico, en la que:
- 10 el tampón es tampón acetato que tiene un pH comprendido entre 5,6 y 7,0; el alcohol de azúcar es manitol o sacarosa; el tensioactivo no iónico es polisorbato 20 que tiene una concentración de 0,001 a 0,02 % (p/v); y el agente isotónico es cloruro sódico.
2. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la insulina tiene la misma secuencia de aminoácidos que la insulina nativa.
- 15 3. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la insulina es un derivado de insulina que se genera por sustitución, supresión o inserción de aminoácido de una insulina nativa o un análogo de péptido que presenta una actividad similar a la insulina nativa.
4. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc derivada de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.
- 20 5. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la región Fc de inmunoglobulina es un híbrido de dominios de diferentes orígenes derivados de inmunoglobulinas seleccionadas del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.
6. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la región Fc de inmunoglobulina es un dímero o multímero que consiste en inmunoglobulinas monocatenarias de dominios del mismo origen.
- 25 7. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc IgG4 aglicosilada humana.
8. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el conjugado se une mediante el uso de un polímero no peptídico o una técnica de recombinación.
9. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el polímero no peptídico es un polietilén glicol.
- 30 10. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el polímero no peptídico se selecciona del grupo que consiste en un polímero biodegradable como polipropilén glicol, un copolímero de etilén glicol y propilén glicol, un poliol polioxietilado, poli(alcohol vinílico), polisacárido, dextrano, éter polivinil étilo, poli(ácido láctico) (PLA) y ácido poli láctico-glicólico (PLGA), un polímero de lípido; quitinas; un ácido hialurónico; y una combinación de los mismos.
- 35 11. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cantidad farmacéutica eficaz del conjugado de insulina de acción prolongada tiene una concentración de 10 mg/ml a 200 mg/ml.
12. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración del alcohol de azúcar es de 1 % (p/v) a 15 % (p/v) en base al volumen total de solución.
- 40 13. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración del tampón es de 5 mM a 50 mM.
14. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración del agente isotónico es de 0,5 mg/ml a 20 mg/ml.
- 45 15. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizante comprende además una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en azúcares, polialcoholes y aminoácidos.
16. Una formulación líquida de un conjugado de insulina de acción prolongada que comprende un conjugado de insulina de acción prolongada en el que están unidos insulina y una región Fc de inmunoglobulina mediante polietilén glicol; y un estabilizante desprovisto de albúmina en el que el estabilizante comprende un tampón acetato, manitol, polisorbato 20 y cloruro sódico, en el que:
- 50 el tampón acetato tiene un pH comprendido entre 5,6 y 7,0; y

el polisorbato 20 tiene una concentración de 0,001 a 0,02 % (p/v).

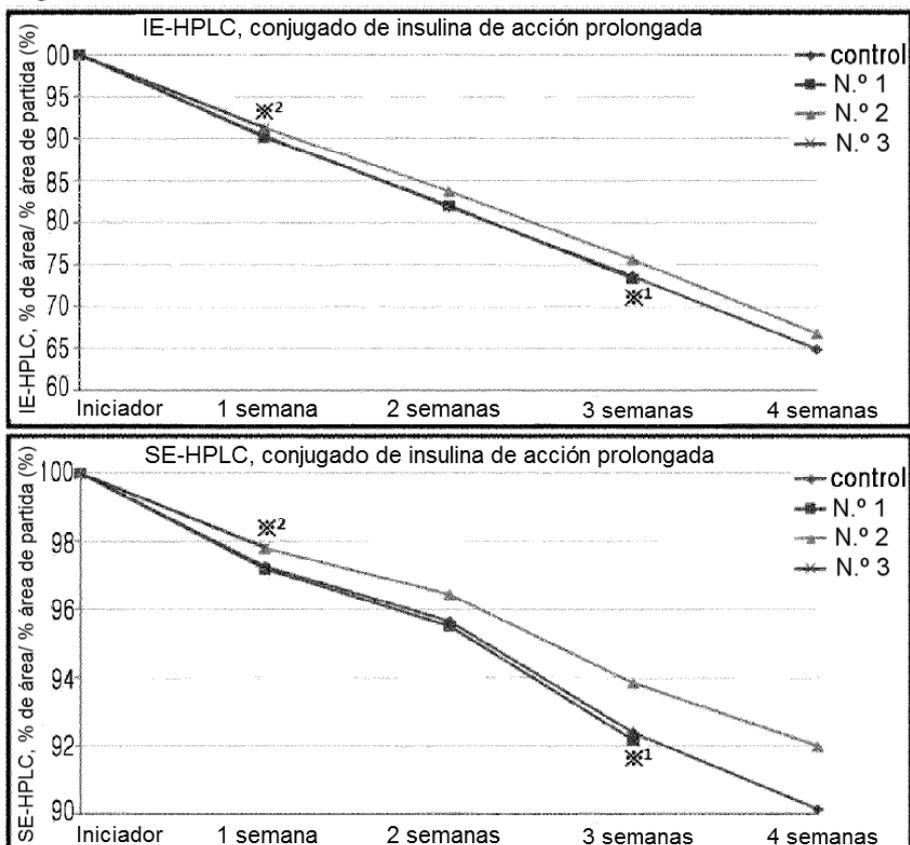
17. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el estabilizante comprende 10 mM de acetato de sodio, 10 % (p/v) de manitol, de 10 a 20 mg/ml de cloruro sódico y 0,02 % (p/v) de polisorbato 20 y tiene un pH de 6,0.
- 5 18. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el estabilizante comprende 10 mM de acetato de sodio, de 2 % a 5 % (p/v) de manitol, de 1 a 6 mg/ml de cloruro sódico y 0,02 % (p/v) de polisorbato 20 y tiene un pH de 6,0.
19. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además uno o más conservantes seleccionados del grupo que consiste en m-cresol, fenol y alcohol bencílico.
- 10 20. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 19, en la que la concentración del conservante es de 0,001 % a 1 % (p/v) en base al volumen total de solución.
21. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 19, en la que el conservante es m-cresol.
- 15 22. La formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 19, que es para varias administraciones.
23. Un procedimiento de preparación de la formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende (a) preparar un conjugado de insulina de acción prolongada en el que se une una insulina, que es un péptido fisiológicamente activo, con una región Fc de inmunoglobulina; y (b) mezclar el conjugado de insulina de acción prolongada preparado en la etapa (a) con un estabilizante que comprende tampón, alcohol de azúcar, tensioactivo no iónico y cloruro sódico como un agente isotónico, en el que:
- 20 el tampón es un tampón acetato que tiene un pH comprendido entre 5,6 y 7,0;
el alcohol de azúcar es manitol o sacarosa; y
25 el tensioactivo no iónico es polisorbato 20 que tiene una concentración de 0,001 a 0,02 % (p/v).
24. Un procedimiento de preparación de la formulación líquida de conjugado de insulina de acción prolongada de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, que comprende: (a) preparar un conjugado de insulina de acción prolongada, en el que se une una insulina, que es un péptido fisiológicamente activo, con una región Fc de inmunoglobulina; y (b) mezclar el conjugado de insulina de acción prolongado preparado en la etapa (a) con un estabilizante que comprende tampón, alcohol de azúcar, tensioactivo no iónico y cloruro sódico como un agente isotónico, en el que:
- 30 el tampón es un tampón acetato que tiene un pH comprendido entre 5,6 y 7,0;
el alcohol de azúcar es manitol o sacarosa;
el tensioactivo no iónico es polisorbato 20 que tiene una concentración de 0,001 a 0,02 % (p/v).

35

[Fig. 1]



[Fig. 2]



- ✖¹ N.º 1 (0,2 % (v/v) polisorbato 20):
precipitación de proteína al cabo de 3 semanas
- ✖² N.º 3 (20 mg/ml NaCl 0,2 % (v/v) polisorbato 20):
precipitación de proteína al cabo de 1 semana