(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 738 676**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)
C07K 14/62 (2006.01)
C07K 17/08 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2014** **PCT/KR2014/001597**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014** **WO14133327**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2014** **E 14757574 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** **EP 2963055**

(54) Título: **Conjugado de insulina específico de sitio**

(30) Prioridad:

26.02.2013 KR 20130020703

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.01.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

JANG, MYUNG HYUN;
KIM, DAE JIN;
HWANG, SANG YOUN;
KIM, HYUN UK;
JUNG, SUNG YOUB y
KWON, SE CHANG

(74) Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 738 676 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugado de insulina específico de sitio

Campo

La presente divulgación se refiere a un conjugado en el que un ligador polimérico no peptídico y una región constante de inmunoglobulina están ligados específicamente a un residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina excluyendo el extremo N-terminal del mismo a través de un enlace covalente, y un procedimiento de preparación del mismo.

Descripción de la técnica relacionada

La insulina es un péptido secretado por las células beta del páncreas humano como un material que desempeña un papel muy importante en el control del nivel de glucosa en sangre en el cuerpo. En los casos en que la insulina no se secreta adecuadamente o la insulina segregada no actúa adecuadamente en el cuerpo, la glucosa en la sangre no se puede controlar y aumenta, lo que provoca el estado de diabetes. El caso mencionado anteriormente se conoce como diabetes mellitus tipo 2, y el caso en el que la insulina no se secreta del páncreas para aumentar la glucosa en sangre se conoce como diabetes mellitus tipo 1. La diabetes mellitus tipo 2 se trata con un agente hipoglucemiante oral que incluye un material químico como componente principal y, en algunos pacientes, también se trata con insulina. Por otro lado, el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 requiere necesariamente la administración de insulina.

La terapia con insulina tan ampliamente utilizada en el momento actual es un procedimiento de administración de insulina mediante inyección antes y después de las comidas. Sin embargo, tal terapia de insulina requiere que se administre constantemente tres veces al día, y por lo tanto causa mucho sufrimiento e inconvenientes en los pacientes. Para superar tales problemas, se han realizado varios intentos. Uno de ellos fue un intento de administrar fármacos peptídicos en el cuerpo mediante inhalación a través de cavidades orales o nasales al aumentar la permeabilidad de la membrana biológica de los fármacos peptídicos. Sin embargo, tal procedimiento muestra una eficacia significativamente baja de la administración de péptidos en el cuerpo en comparación con la inyección. En consecuencia, todavía hay muchas dificultades para mantener la actividad *in vivo* de los fármacos peptídicos en las condiciones requeridas.

Además, se ha intentado un procedimiento para retrasar la absorción después de la administración subcutánea de fármacos excesivos. De acuerdo con esto, se ha presentado un procedimiento para mantener la concentración de fármacos en la sangre a través de una única administración diaria. Algunos han sido aprobados como productos medicinales (por ejemplo, Lantus, Sanofi-Aventis) y actualmente se administran a pacientes. El estudio para modificar la insulina con ácidos grasos para fortalecer la unión de un polímero de insulina y extender la duración a través de la unión a la albúmina presente en el sitio de administración y en la sangre ha progresado, y los fármacos producidos con este procedimiento han sido aprobados como medicamentos (Levemir, NovoNordisk). Sin embargo, tales procedimientos tienen el efecto secundario de causar dolor en el sitio de administración, además de que el intervalo de administración de una única inyección diaria todavía causa un inconveniente significativo para los pacientes.

Mientras tanto, ha sido reportado que la región N- o C-terminal, es decir, el residuo de aminoácido en la posición 29 de la cadena beta de insulina, no influye significativamente en la unión de la insulina al receptor de insulina (Jens Brange y Aage Volund, Adv. Drug Deliv. Rev., 35(2-3): 307-335 (1999); Peter Kurtzhals et al., Diabetes, 49(6): 999-1005 (2000)).

Por consiguiente, los presentes inventores han estudiado para desarrollar un procedimiento para modificar un residuo de aminoácido en la región C-terminal de la cadena beta de insulina con un polímero no peptídico y una región constante de inmunoglobulina, y encontraron que este procedimiento es se usa para preparar un conjugado que tiene mayor afinidad de unión al receptor de insulina que los conjugados preparados modificando otros sitios de insulina, como un extremo N-terminal.

El documento WO 2012/1659156 se refiere a composiciones para la prevención o el tratamiento de la diabetes que comprenden un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado peptídico insulinotrópico de acción prolongada y un procedimiento terapéutico para el tratamiento de la diabetes.

El documento WO 2011/122921 se refiere a un conjugado de insulina que tiene una durabilidad y estabilidad *in vivo* mejoradas, que se prepara enlazando covalentemente la insulina con una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico, una formulación de acción prolongada que comprende el mismo, y procedimiento de preparación del mismo.

El documento KR 2011 0134210 se refiere a un complejo de insulina y una formulación de acción prolongada

que contiene el mismo para mantener una alta actividad peptídica *in vivo* y para mejorar el cumplimiento satisfactorio del tratamiento.

Hinds et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:505-530 (2002) describe una investigación para determinar si la unión de sitio específico de poli(etilenglicol) a la insulina podría mejorar las propiedades físicas y farmacológicas de la insulina sin afectar negativamente a su actividad biológica o propiedades inmunológicas.

Sumario

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un conjugado de insulina que se prepara ligando selectivamente el sitio de una región Fc de inmunoglobulina a un residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina excluyendo el extremo N-terminal del mismo a través de un polímero no peptídico y un procedimiento de preparación del mismo. La invención está definida por las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A a 1B muestran un perfil y una fotografía en gel de SDS-PAGE de insulina mono-pegilada purificada utilizando una columna Source 15S.

Las Figuras 2 a 3 muestran insulina-PEG resultante de la pegilación de sitio específico en el 29.º residuo de aminoácido de la cadena beta.

La Figura 3 muestra el resultado de analizar la pureza del conjugado final purificado.

La Figura 4 muestra sensogramas de unión del conjugado de insulina al receptor de insulina, en el que (A) representa un conjugado de insulina N-terminal, (B) representa un conjugado de insulina B29 y cada curva de arriba a abajo representa la concentración de sustancia de 1000, 500, 250, 125, o 62,5 nM.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

En un aspecto para lograr el objeto anterior, la presente divulgación proporciona un conjugado de insulina, caracterizado porque la insulina y una región Fc de inmunoglobulina están ligadas a cada insulina y la región Fc de inmunoglobulina están ligadas entre sí mediante un ligador polimérico no peptídico seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, un polímero biodegradable, un polímero lipídico, quitina, ácido hialurónico y una combinación de los mismos, y un extremo del polímero no peptídico está ligado a un residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina excluyendo el extremo N-terminal del mismo y el otro extremo está ligado a la región Fc de inmunoglobulina.

Preferentemente, el polímero no peptídico puede estar ligado a uno cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 29 de la cadena beta de insulina.

Más preferentemente, el polímero no peptídico puede estar ligado a uno cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 25 a 29 de la cadena beta de insulina.

De manera mucho más preferente, el polímero no peptídico puede estar ligado al residuo de lisina en la posición 29 de la cadena beta de insulina.

Preferentemente, el residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina, al que está ligado el polímero no peptídico, puede tener un grupo amino o un grupo tiol.

Preferentemente, la insulina puede ser una insulina nativa, o una variante que se prepara por cualquier procedimiento de sustitución, adición, deleción y modificación de algunos aminoácidos de la insulina nativa o por una combinación de los mismos, un derivado de insulina, un agonista de la insulina, o un fragmento del mismo.

Preferentemente, ambos extremos del polímero no peptídico se pueden unir a un grupo amino o un grupo tiol de la cadena lateral del residuo de aminoácido de una región Fc de inmunoglobulina y la cadena beta de insulina, respectivamente.

Preferentemente, el aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural o de origen no natural.

Preferentemente, la región Fc de inmunoglobulina puede estar aglicosilada.

Preferentemente, la región Fc de inmunoglobulina está compuesta de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en los dominios CH1, CH2, CH3 y CH4.

Preferentemente, la región Fc de inmunoglobulina puede incluir además una región bisagra.

Preferentemente, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una región Fc derivada de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.

Preferentemente, cada dominio de la región Fc de inmunoglobulina puede ser un híbrido de dominios de un origen diferente derivado de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.

Preferentemente, la región Fc de inmunoglobulina puede ser un dímero o un multímero compuesto de inmunoglobulinas monocatenarias compuestas de dominios del mismo origen.

Preferentemente, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una región Fc de IgG4.

Preferentemente, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una región Fc de IgG4 aglicosilada humana.

Preferentemente, el polímero no peptídico se puede unir al grupo amino o al grupo tiol de la cadena lateral del residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina para formar un enlace peptídico, hemitioacetal, imina o tiodioxopirrolidinilo.

Preferentemente, ambos extremos del polímero no peptídico pueden tener cada uno independientemente un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida.

Preferentemente, el derivado de succinimida puede ser succinimidil carboximetilo, succinimidil valerato, succinimidil metil butanoato, succinimidil metil propionato, succinimidil butanoato, succinimidil propionato, N-hidroxisuccinimida o succinimidil carbonato.

Preferentemente, ambos extremos del polímero no peptídico pueden tener un grupo reactivo de butiraldehído o un grupo reactivo de succinimidil valerato, respectivamente.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una formulación de insulina de acción prolongada que tiene una duración y estabilidad *in vivo* mejoradas, incluido el conjugado de insulina.

Preferentemente, la formulación se puede usar para el tratamiento de la diabetes.

En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento de preparación del conjugado de insulina, que incluye las etapas de: (1) enlazar covalentemente un polímero no peptídico a un residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina excluyendo el extremo N-terminal del mismo; (2) aislar un complejo de insulina, en el que el polímero no peptídico está ligado covalentemente al residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina excluyendo el extremo N-terminal del mismo, de la mezcla de reacción de (1); y (3) enlazar covalentemente una región Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico del complejo aislado para producir un conjugado de insulina, en el que la región Fc de inmunoglobulina y la insulina están ligadas a cada extremo del polímero no peptídico.

Preferentemente, el polímero no peptídico se puede unir al grupo amino o al grupo tiol de la cadena lateral del residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina para formar un enlace peptídico, hemitioacetal, imina o tiodioxopirrolidinilo.

Preferentemente, ambos extremos del polímero no peptídico pueden tener cada uno independientemente un derivado de aldehído, un derivado de maleimida, o un derivado de succinimida como un grupo reactivo.

Preferentemente, ambos extremos del polímero no peptídico se pueden unir a un grupo amino o un grupo tiol del residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina excluyendo el extremo N-terminal del mismo y una región Fc de inmunoglobulina, respectivamente.

Preferentemente, ambos extremos del polímero no peptídico pueden tener cada uno independientemente un derivado de aldehído o un derivado de succinimida como un grupo reactivo.

Preferentemente, la Etapa (1) se puede realizar en un entorno alcalino de pH 9,0±2.

Preferentemente, una proporción molar de la insulina y el polímero no peptídico en la Etapa (1) puede ser de 1:1,5 a 1:10.

Preferentemente, una proporción molar del complejo de insulina y la región Fc de inmunoglobulina en la Etapa (3) puede ser de 1:1 a 1:10.

En un aspecto para lograr el objeto anterior, la presente divulgación proporciona un conjugado de insulina, caracterizado porque la insulina y una región Fc de inmunoglobulina están ligadas entre sí a través de un ligador polimérico no peptídico seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, un polímero biodegradable, un polímero lipídico, quitina, ácido hialurónico y una combinación de los mismos, y un extremo del polímero no peptídico está ligado a un residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina excluyendo el extremo N-terminal del mismo y el otro extremo está ligado a la región Fc de inmunoglobulina.

En la presente divulgación, la insulina es un tipo de péptido fisiológicamente activo secretado por el páncreas cuando el nivel de glucosa en la sangre aumenta, lo que funciona para controlar los niveles de glucosa en la sangre al hacer que el hígado, los músculos esqueléticos y el tejido adiposo absorban la glucosa de la sangre y la almacenen como glucógeno, y al suprimir el metabolismo para utilizar la grasa como fuente de energía. Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "insulina" incluye agonistas, precursores, derivados, fragmentos o variantes de insulina, así como insulina nativa. Preferentemente, la insulina incluye insulina nativa, insulina de acción rápida e insulina de acción prolongada sin limitación.

La insulina nativa es una hormona secretada por el páncreas y desempeña un papel crítico en el control de los niveles de glucosa en sangre al promover la captación celular de glucosa e inhibir la lipólisis. La insulina que tiene la función de regular los niveles de glucosa en la sangre se produce a partir de un precursor de proinsulina sin la función de regular los niveles de glucosa en la sangre, a través de una serie de procesos. Las secuencias de aminoácidos de la insulina nativa 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-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID NO: 2)

Preferentemente, la insulina puede ser una insulina nativa, o una variante que se prepara por cualquier procedimiento de sustitución, adición, deleción y modificación de algunos aminoácidos de la insulina nativa o por una combinación de los mismos, un derivado de insulina, un agonista de la insulina, o un fragmento del mismo.

El agonista de insulina denota una sustancia que se une al receptor de insulina para mostrar la actividad biológica igual a la de la insulina, que es irrelevante para la estructura de la insulina.

El derivado de insulina denota un péptido que muestra una homología de secuencia de al menos 80% en una secuencia de aminoácidos en comparación con la insulina nativa, tiene algunos grupos de residuos de aminoácidos que están alterados por sustitución química (por ejemplo, alfa-metilación, alfa-hidroxilación), eliminación (por ejemplo, desaminación) o modificación (por ejemplo, N-metilación, glicosilación, ácidos grasos), y tiene la función de controlar la glucosa en la sangre en el cuerpo.

El fragmento de insulina denota un fragmento que tiene uno o más aminoácidos agregados o eliminados en el extremo amino o carboxilo de la insulina, en el que los aminoácidos agregados pueden ser aminoácidos de origen no natural (por ejemplo, un aminoácido tipo D), y este fragmento de insulina tiene la función de controlar el nivel de glucosa en la sangre en el cuerpo.

La variante de insulina denota un péptido que difiere de la insulina en una o más secuencias de aminoácidos, y retiene la función de controlar la glucosa en sangre en el cuerpo.

Además, los respectivos procedimientos de preparación de los agonistas, derivados, fragmentos y variantes de la insulina se pueden usar individualmente o en combinación. Por ejemplo, el péptido de insulina también incluye un péptido que tiene uno o más aminoácidos diferentes de los de la insulina nativa y la desaminación del residuo de aminoácido N-terminal, y tiene la función de controlar el nivel de glucosa en la sangre en el cuerpo.

En una realización específica, la insulina puede producirse mediante una tecnología de recombinación, y también es posible sintetizar la insulina mediante un procedimiento en fase sólida.

El conjugado de insulina de la presente divulgación se caracteriza porque se prepara enlazando covalentemente la cadena beta de insulina y una región Fc de inmunoglobulina a cada extremo del polímero no peptídico como un ligador, en el que el polímero no peptídico tiene grupos reactivos en ambos extremos. Preferentemente, ambos extremos del polímero no peptídico se pueden unir a un grupo amino o un grupo tiol de la cadena lateral del residuo de aminoácido de la región Fc de inmunoglobulina y la cadena beta de insulina, respectivamente.

En este sentido, el aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural o de origen no natural, pero no hay limitación, siempre que el aminoácido contenga un grupo amino o un grupo tiol para formar un enlace covalente, juntos con el polímero no peptídico.

En la presente divulgación, se encontró que la afinidad de unión al receptor de insulina difiere variando el sitio de unión de PEG-Fc en la cadena beta de insulina en la preparación de un conjugado de polietilenglicol (PEG) y una región constante de inmunoglobulina (en lo sucesivo, conocida como inmunoglobulina Fc o Fc) para mejorar la estabilidad de la insulina en la sangre. Además, los presentes inventores demostraron un sitio de unión que aumenta la afinidad de unión de la insulina para mejorar su actividad. Por ejemplo, identificaron un sitio de unión que mejora la estabilidad de la sangre mediante la unión con PEG-Fc y no reduce la actividad sin inhibir la unión con los receptores de insulina. En el caso de que la cadena alfa de insulina se use para formar un conjugado, su actividad se reduce notablemente. Por lo tanto, se pretendía explorar un sitio de unión óptimo en la cadena beta de la insulina. Como resultado, se confirmó que el sitio de unión del polímero no peptídico puede ser cualquier residuo de aminoácido que tenga un grupo amino o un grupo tiol, excluyendo el extremo N-terminal de la cadena beta de la insulina.

Preferentemente, el polímero no peptídico puede estar ligado a uno cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 29 de la cadena beta de insulina. Más preferentemente, el polímero no peptídico puede estar ligado a uno cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 25 a 29 de la cadena beta de insulina. Mucho más preferentemente, el polímero no peptídico puede estar ligado al residuo de lisina en la posición 29 de la cadena beta de insulina.

Preferentemente, el residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina, al que está ligado el polímero no peptídico, puede tener un grupo amino o un grupo tiol. Por ejemplo, el residuo de aminoácido puede ser lisina, cisteína o un derivado del mismo, pero no se limita a los mismos.

En una realización específica de la presente divulgación, se prepararon conjugados al ligar PEG-Fc al extremo N-terminal o el 29.º residuo de lisina de la cadena beta de insulina, respectivamente, y se examinaron las afinidades de unión de los respectivos conjugados de insulina con los receptores de insulina. Como resultado, el conjugado de insulina preparado al ligar PEG-Fc al 29.º residuo de lisina de la cadena beta de insulina mostró una mayor afinidad de unión (aproximadamente 3,6 veces) que el conjugado de insulina preparado al ligar PEG-Fc al extremo N-terminal de la insulina. cadena beta (Ejemplo 4, Tabla 1). Tal aumento en la afinidad de unión al receptor de insulina indica una actividad incrementada del conjugado de insulina correspondiente.

Sin embargo, el sitio de unión del polímero no peptídico para la preparación de un conjugado que mantiene la actividad de la insulina y tiene una estabilidad mejorada no se limita al 29.º residuo de la cadena beta de la insulina. Los conjugados preparados uniendo el polímero no peptídico a la cadena beta de la insulina, preferentemente la región C-terminal, más preferentemente cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 29, y mucho más preferentemente cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 25 a 29 también se incluyen en el ámbito de la presente divulgación. Por ejemplo, la insulina nativa puede estar enlazada covalentemente al polímero no peptídico a través del grupo ε-amino del único residuo de lisina en la posición 29 de la cadena beta. Una variante de insulina o un derivado que contiene un residuo de aminoácido que tiene un grupo amino o un grupo tiol en otros sitios también puede ligarse con el polímero no peptídico en la posición de aminoácido correspondiente, y estos conjugados también están incluidos en el ámbito de la presente invención.

Cuando se prepara el conjugado que mantiene la actividad de insulina, el residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina puede reemplazarse con un residuo de lisina o cisteína para una preparación conveniente. Por ejemplo, un derivado de insulina formado al reemplazar el residuo de aminoácido en el extremo C terminal de la cadena beta de insulina con un residuo de lisina o cisteína se usa para preparar un conjugado de insulina con facilidad, y un conjugado de insulina preparado usando este derivado de insulina también se incluye en el ámbito de la presente divulgación.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "polímero no peptídico" significa un polímero biocompatible formado mediante al ligar dos o más unidades de repetición, y las unidades de repetición están ligadas entre sí mediante un enlace peptídico pero cualquier enlace covalente. El polímero no peptídico se puede seleccionar del

grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, polivinil éter, un polímero biodegradable tal como PLA (ácido poliláctico) y PLGA (ácido poliláctico-glicólico), un polímero lipídico, quitina, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos, y preferentemente, polietilenglicol (PEG). Los derivados de los mismos que son bien conocidos en la técnica y se preparan fácilmente dentro de la experiencia de la técnica también se incluyen en el ámbito de la presente divulgación.

El ligador peptídico que se usa en la proteína de fusión obtenida por un procedimiento de fusión en marco convencional tiene inconvenientes en cuanto a que se escinde fácilmente *in vivo* por una enzima proteolítica, y por lo tanto un efecto suficiente de aumentar la vida media en sangre del fármaco activo por un vehículo no se puede obtener como se esperaba. En la presente divulgación, sin embargo, el polímero que tiene resistencia a la enzima proteolítica se puede usar para mantener la vida media en sangre del péptido similar a la del vehículo. Por lo tanto, cualquier polímero no peptídico puede usarse sin limitación, siempre que sea un polímero que tenga la función mencionada anteriormente, es decir, un polímero que tenga resistencia a la enzima proteolítica *in vivo*. El polímero no peptídico tiene un peso molecular que varía de 1 a 100 kDa, y preferentemente, de 1 a 20 kDa. Además, el polímero no peptídico de la presente divulgación ligado al polipéptido fisiológicamente activo, puede ser un polímero o una combinación de diferentes tipos de polímeros.

El polímero no peptídico usado en la presente divulgación tiene un grupo reactivo capaz de unirse a la región Fc de inmunoglobulina y al fármaco proteico.

Preferentemente, el polímero no peptídico se puede unir al grupo amino o al grupo tiol de la cadena lateral del residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina para formar un enlace peptídico, hemitioacetal, imina o tiodioxopirrolidinilo.

Los ejemplos no limitantes de los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no peptídico pueden incluir un grupo aldehído tal como un grupo propionaldehído o un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida. El derivado de succinimida puede ser succinimidil carboximetilo, succinimidil valerato, succinimidil metil butanoato, succinimidil metil propionato, succinimidil butanoato, succinimidil propionato, N-hidroxisuccinimida o succinimidil carbonato, pero no se limita a los mismos. Se puede usar sin limitación cualquier grupo reactivo que sea selectivamente capaz de formar un enlace covalente, junto con el grupo amino o tiol del residuo de aminoácido de la región Fc de inmunoglobulina y la cadena beta de insulina.

Los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes entre sí. Por ejemplo, el polímero no peptídico puede poseer un grupo succinimida en un extremo, y un grupo aldehído tal como un grupo propionaldehído o un grupo butiraldehído en el otro extremo. Cuando se usa polietilenglicol que tiene grupos hidroxi reactivos en ambos extremos del mismo como polímero no peptídico, el grupo hidroxi puede activarse a diversos grupos reactivos mediante reacciones químicas conocidas, o se puede usar polietilenglicol que tiene un grupo reactivo modificado disponible comercialmente de manera que pueda preparar el conjugado de proteínas de la presente divulgación.

Preferentemente, el polímero no peptídico puede tener un grupo butiraldehído y un grupo reactivo de succinimidil valerato en ambos extremos, respectivamente.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "región Fc de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que contiene la región constante de cadena pesada 2 (CH2) y la región constante de cadena pesada 3 (CH3) de una inmunoglobulina, excluyendo las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, la región constante de cadena pesada 1 (CH1) y la región constante de cadena ligera 1 (CL1) de la inmunoglobulina. Puede incluir además una región bisagra en la región constante de cadena pesada. Además, la región Fc de inmunoglobulina puede contener una parte o la totalidad de la región Fc, incluida la región constante de cadena pesada 1 (CH1) y/o la región constante de cadena ligera 1 (CL1), excepto las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, siempre que tenga un efecto sustancialmente similar o mejor que el de la forma nativa. Además, puede ser una región que tenga una deleción en una porción relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de CH2 y/o CH3. Es decir, la región Fc de inmunoglobulina puede incluir 1) un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4, 2) un dominio CH1 y un dominio CH2, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3, 5) una combinación de uno o más dominios y una región bisagra de inmunoglobulina (o una porción de la región bisagra), y 6) un dímero de cada dominio de las regiones constantes de la cadena pesada y la luz cadena constante de la región.

La región Fc de inmunoglobulina es segura para su uso como vehículo farmacológico porque es un polipéptido biodegradable que se metaboliza *in vivo*. Además, la región Fc de inmunoglobulina tiene un peso molecular relativamente bajo, en comparación con todas las moléculas de inmunoglobulina y, por lo tanto, es ventajosa en términos de preparación, purificación y rendimiento del conjugado. 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, se puede esperar que la región Fc de inmunoglobulina

pueda aumentar considerablemente la homogeneidad de las sustancias y sea menos antigénica en sangre.

La región Fc de inmunoglobulina se puede derivar de seres humanos u otros animales, incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayos, y preferentemente, seres humanos. Además, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una región Fc que se deriva de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, o se fabrica mediante combinaciones de los mismos o híbridos de los mismos. Preferentemente, se deriva de IgG o IgM, que se encuentran entre las proteínas más abundantes en la sangre humana, y más preferentemente, de IgG, que se sabe que mejora las vidas medias de las proteínas de unión al ligando.

Mientras tanto, "combinación", como se usa en la presente memoria descriptiva, significa que los polipéptidos que codifican regiones Fc de inmunoglobulina monocatenaria del mismo origen están ligados 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 de IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc e IgE Fc.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "híbrido" significa que las secuencias que codifican dos o más regiones Fc de inmunoglobulina de diferente origen están presentes en una región Fc de inmunoglobulina monocatenaria. En la presente divulgación, son posibles varios tipos de híbridos. Es decir, son posibles híbridos de dominio compuestos de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 y CH4 de IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc e IgD Fc, y pueden incluir la región bisagra.

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

Es decir, como el vehículo farmacológico de la presente divulgación, la región Fc de inmunoglobulina más preferente es una región Fc no glicosilada derivada de IgG4 humana. La región Fc derivada de humanos es más preferente que una región Fc derivada de no humanos que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y causar respuestas inmunes indeseables, como la producción de un nuevo anticuerpo contra el antígeno.

Mientras tanto, la región Fc de inmunoglobulina puede estar en la forma de tener cadenas de azúcar nativas, cadenas de azúcar aumentadas en comparación con una forma nativa o cadenas de azúcar reducidas 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 mediante procedimientos comunes en la técnica, como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático y un procedimiento de ingeniería genética que utiliza un microorganismo. En este caso, la eliminación de las cadenas de azúcar de la región Fc produce una disminución brusca 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 del complemento, por lo que no induce respuestas inmunitarias innecesarias *in vivo*. A este respecto, una región Fc de inmunoglobulina en una forma desglicosilada o aglicosilada puede ser más adecuada para el objeto de la presente divulgación como un vehículo farmacológico.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "desglicosilación" significa eliminar enzimáticamente restos de azúcar de una región Fc, y "aglicosilación" significa que una región Fc se produce en una forma no glicosilada por un procariota, preferentemente, *E. coli*.

Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente divulgación incluye un derivado de secuencia (mutante) del mismo, así como una secuencia de aminoácidos nativa. Un derivado de secuencia de aminoácidos tiene una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos nativa debido a la deleción, inserción, sustitución no conservativa o conservativa de uno o más residuos de aminoácidos, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en IgG Fc, los restos de aminoácidos que se sabe que son importantes en la unión, pueden usarse como dianas adecuadas para la modificación en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322, o 327 a 331. Además, son posibles otros diversos derivados, incluidos los derivados que tienen una deleción de una región capaz de formar un enlace disulfuro, una eliminación de varios residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de una forma Fc nativa, o una adición de un residuo de metionina al extremo N-terminal de una forma Fc nativa. Además, para eliminar las funciones efectoras, se puede producir una deleción en un sitio de unión al complemento, como un sitio de unión a C1q y un sitio de ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos). Las técnicas de preparación de tales derivados de secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se describen en los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478.

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 que se producen más comunmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, en ambas

direcciones.

La región Fc, si se desea, puede modificarse por fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación o similares.

Los derivados de Fc mencionados anteriormente son derivados que tienen una actividad biológica idéntica a la de la región Fc de inmunoglobulina de la presente divulgación o una estabilidad estructural mejorada frente al calor, el pH o similares. Además, estas regiones constantes de inmunoglobulina pueden obtenerse a partir de formas nativas aisladas de humanos y otros animales, incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayos, o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos de células animales transformadas. o microorganismos. En este caso, pueden obtenerse 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 regiones Fab y Fc, y el tratamiento con pepsina produce la producción de pF'c y $F(ab)_2$. Estos fragmentos pueden someterse a cromatografía de exclusión por tamaño para aislar Fc o pF'c.

Preferentemente, una región Fc de inmunoglobulina derivada de humano puede ser una región constante de inmunoglobulina recombinante que se obtiene de un microorganismo.

En la presente divulgación, la unión de la región Fc de inmunoglobulina y el polímero no peptídico se forma por un enlace covalente entre el otro grupo reactivo terminal del polímero no peptídico que no se une con la insulina y el grupo amino o tiol del residuo de aminoácido de la región Fc de inmunoglobulina, como la unión de la cadena beta de insulina y el polímero no peptídico. Por lo tanto, el polímero no peptídico se une al extremo N-terminal de la región Fc de inmunoglobulina, o al grupo amino del residuo de lisina o al grupo tiol del residuo de cisteína dentro de la región Fc de inmunoglobulina. A este respecto, no hay limitación en la posición del residuo de aminoácido en la región Fc de inmunoglobulina, a la que se une el polímero no peptídico.

En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una formulación de insulina de acción prolongada con actividad *in vivo* mejorada, que incluye el conjugado de insulina. La formulación de acción prolongada puede ser una composición para el tratamiento de la diabetes.

Además, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar la diabetes administrando la formulación de insulina de acción prolongada a un sujeto que la necesite.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "administración" significa la introducción de una sustancia predeterminada en un paciente mediante un cierto procedimiento adecuado. El conjugado de la presente divulgación se puede administrar a través de cualquiera de las vías comunes, siempre que sea capaz de alcanzar un tejido deseado. Se puede realizar la administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero la presente divulgación no se limita a ello. Sin embargo, dado que los péptidos se digieren con la administración oral, los ingredientes activos de una composición para administración oral deben recubrirse o formularse para protegerlos contra la degradación en el estómago. Preferentemente, la presente composición se puede administrar en una forma inyectable. Además, la formulación de acción prolongada puede administrarse utilizando un determinado aparato capaz de transportar los ingredientes activos a una célula diana.

La formulación de acción prolongada que incluye el conjugado de la presente divulgación puede incluir vehículos farmacéuticamente aceptables. Para la administración oral, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un aglutinante, un lubricante, un desintegrador, un excipiente, un solubilizante, un agente dispersante, un estabilizante, un agente de suspensión, un agente colorante, un perfume o similares. Para preparaciones inyectables, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un agente tamponante, un agente conservante, un analgésico, un solubilizante, un agente isotónico y un estabilizador. Para preparaciones para administración tópica, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir una base, un excipiente, un lubricante, un agente conservante o similares. La formulación de acción prolongada de la presente divulgación puede formularse en una variedad de formas de dosificación en combinación con los vehículos farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente. Por ejemplo, para administración oral, la formulación puede prepararse en comprimidos, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para preparaciones inyectables, la formulación puede prepararse en una ampolla de dosis única o en un recipiente de múltiples dosis. La formulación también puede formularse en soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas y preparaciones de liberación sostenida.

Por otro lado, los ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados para la formulación incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio, aceites minerales o similares. Además, la formulación puede incluir además rellenos, agentes anticoagulantes, lubricantes, humectantes,

perfumes, antisépticos o similares.

Además, la formulación de acción prolongada de la presente divulgación se puede determinar por varios factores relacionados que incluyen los tipos de enfermedades a tratar, las vías de administración, la edad del paciente, el sexo, el peso y la gravedad de la enfermedad, así como por los tipos de fármaco como componente activo. Dado que la composición farmacéutica de la presente divulgación tiene una excelente duración y titulación *in vivo*, reduce en gran medida la frecuencia de administración de la formulación farmacéutica de la presente divulgación.
La formulación de acción prolongada de la presente divulgación mejora la estabilidad *in vivo* de la insulina mientras mantiene su actividad, y por lo tanto es efectiva para el tratamiento de la diabetes.

En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento de preparación del conjugado de insulina, que incluye las etapas de: (1) enlazar covalentemente un polímero no peptídico a un residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina excluyendo el extremo N-terminal del mismo; (2) aislar un complejo de insulina, en el que el polímero no peptídico está ligado covalentemente al residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina excluyendo el extremo N-terminal del mismo, de la mezcla de reacción de (1); y (3) enlazar covalentemente una región Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico del complejo aislado para producir un conjugado de insulina, en el que la región Fc de inmunoglobulina y la insulina están ligadas a cada extremo del polímero no peptídico.

Como se describió anteriormente, el polímero no peptídico se puede unir preferentemente al grupo amino o al grupo tiol de la cadena lateral del residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina para formar un enlace peptídico, hemitioacetal, imina o tiodioxopirrolidinilo. A este respecto, ambos extremos del polímero no peptídico son cada uno independientemente un derivado de aldehído, un derivado de maleimida o un derivado de succinimida como grupo reactivo, pero no están limitados a ellos.

Como se describió anteriormente, ambos extremos del polímero no peptídico se pueden unir preferentemente al grupo amino o al grupo tiol de la cadena lateral del residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina excluyendo el extremo N-terminal del mismo y la región Fc de inmunoglobulina., respectivamente.

Preferentemente, el polímero no peptídico puede tener un derivado de aldehído y un derivado de succinimida como un grupo reactivo en ambos extremos, respectivamente. A este respecto, la Etapa (1) se puede realizar en un entorno alcalino de pH 9,0±2. Si la reacción se puede permitir en un ambiente ácido inferior al pH 7, el polímero no peptídico se puede unir al grupo amino N-terminal. El intervalo de pH anterior puede controlarse, dependiendo de la clase del grupo reactivo del polímero no peptídico y la clase del grupo reactivo del residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina, que reacciona con el mismo, por ejemplo, un grupo amino o un grupo tiol. Por ejemplo, si el PEG que tiene un derivado de succinimida como grupo reactivo se usa como polímero no peptídico y está destinado a unirse al grupo amino de la lisina dentro de la insulina, el pH se controla a 9,0, lo que lleva a la formación de un complejo de insulina, en el que el polímero no peptídico se une selectivamente al grupo amino de la lisina, no al grupo amino N-terminal.

En la Etapa (1) de enlace del polímero no peptídico a la cadena beta de insulina, una proporción molar de reacción de insulina y el polímero puede ser preferentemente de 1:1,5 a 1:10, y más preferentemente de 1:2. Además, en la Etapa (3) de enlace covalente de la región Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico del complejo de insulina, una proporción molar del complejo de insulina y la región Fc de inmunoglobulina puede ser preferentemente de 1:1 a 1:10, y más preferentemente 1:1,2.

En una realización específica de la presente divulgación, la insulina se pega de forma selectiva con un alto rendimiento utilizando un ligador de PEG que contiene independientemente cada uno de los grupos reactivos de succinimida y aldehído en ambos extremos, y la pegilación del 29.º residuo de la cadena beta de insulina fue identificada por un procedimiento de mapeo (Figuras 2 a 3). Además, los presentes inventores ligaron una región constante de inmunoglobulina a la insulina mono-pegilada preparada de este modo para preparar un conjugado de región constante polimérica de inmunoglobulina e insulina no-peptidílica.

Se examinó la afinidad de unión del conjugado de insulina preparado al receptor de insulina. Como resultado, el conjugado de insulina mostró una afinidad de unión aproximadamente 3,6 veces mayor que el conjugado preparado al ligar PEG-Fc al extremo N-terminal de la insulina, lo que indica una eficacia superior del conjugado de la presente divulgación.

En lo sucesivo, la presente divulgación se describirá con más detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo para fines ilustrativos, y la invención no pretende estar limitada por estos Ejemplos.

Ejemplo 1: reacción de PEGilación del 29.° aminoácido de la cadena beta de insulina y purificación de insulina mono-pegilada

La insulina en polvo se disolvió en HCl 10 mM, y luego se hizo reaccionar con 3,4 K butiraldehído-PEG-succinimidil valerato (PEG que tiene un grupo butil aldehído y un grupo de succinimidil valerato como grupos funcionales en cada extremo, Laysan Bio, Inc., EE.UU.) a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora a una proporción molar de insulina: PEG de 1:2 y una concentración de insulina de 1,5 mg/ml para pegilar el 29.º residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina. Esta reacción se realizó en borato de sodio 60,8 mM y 45%: isopropanol a pH 9,0. La solución de reacción se purificó con la columna Source S (GE Healthcare) usando un tampón que contiene citrato de sodio (pH 3,0) y etanol al 45%, y un gradiente de concentración de KCl para dar insulina mono-pegilada (Figuras 1a a 1b).

Ejemplo 2: Identificación del sitio de pegilación de la insulina mono-pegilada

Con el fin de identificar el sitio de unión de PEG 3,4K en la insulina pegilada de acuerdo con el Ejemplo 1, se usó un procedimiento de mapeo Glu-C. Se agregaron 10 µg de endoproteinasa Glu-C con una concentración de 1 mg/ml a 50 µg de insulina mono-pegilada con una concentración de 1 mg/ml. La solución de reacción fue HEPES 50 mM a pH 7,5 y la reacción se dejó a 25°C durante 8 horas. Luego, se agregaron 50 µl de HCl 1 N para terminar la reacción. Se usó cromatografía inversa HPLC para el mapeo. El resultado se proporciona en la Figura 2.

Como se muestra en la Figura 2, se observó un desplazamiento del pico que contenía el 29.º aminoácido de la cadena beta de insulina, lo que indica la pegilación del 29.º aminoácido de la cadena beta de insulina con PEG 3,4K.

Ejemplo 3: Preparación de conjugado de insulina mono-pegilada e inmunoglobulina Fc

Con el fin de preparar un conjugado de fragmento Fc de insulina-PEG-inmunoglobulina, se hizo reaccionar insulina mono-PEGilada preparada por el procedimiento del Ejemplo 1 y un fragmento Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:1,2 con un nivel de proteína total de 20 mg/ml a 25°C durante 13 horas. A este respecto, la solución de reacción contenía HEPES 100 mM y cloruro de sodio 2 M (NaCl) a un pH de 8,2, y además contenía cianoborohidruro de sodio 20 mM como agente reductor.

Una vez completada la reacción, la solución de reacción se pasó a través de la columna Source Q (GE Healthcare) para separar y purificar la insulina no reaccionada, el fragmento Fc de inmunoglobulina no reaccionado, el conjugado fragmento de inmunoglobulina PEG-insulina PEG y el conjugado de fragmento de inmunoglobulina Fc acoplado con dos o más insulina mono-PEGilada (insulina-PEG) que utiliza Tris-HCl (pH 7,5) y un gradiente de concentración de NaCl.

Luego, se utilizó la Fuente ISO (GE Healthcare) para eliminar cualquier inmunoglobulina residual Fc y el conjugado de insulina de acoplamiento múltiple, obteniendo así el conjugado de insulina-PEG-inmunoglobulina Fc. En este caso, la elución se realizó utilizando un gradiente de concentración de sulfato de amonio que contiene Tris-HCl (pH 7,5). La pureza del conjugado así preparado se analizó mediante HPLC usando cromatografía inversa, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño (Figura 3).

Ejemplo 4: Medición de la afinidad de unión al receptor de insulina del conjugado de insulina según el sitio de unión de PEG-Fc dentro de la cadena beta de insulina

Con el fin de medir las afinidades de unión al receptor de insulina de un conjugado de insulina preparado mediante el enlace de PEG-Fc al extremo N-terminal de la insulina y un conjugado de insulina mediante el enlace de PEG-Fc a B29, se usó SPR (resonancia de plasmón superficial, BIACORE 3000). Como receptores de insulina, el ECD (dominio extracelular) se expresó en células HEK293F y luego se purificó. Los receptores de insulina expresados de este modo se inmovilizaron en un chip CM5 mediante acoplamiento de amina, y se aplicaron de 1 µM a 6,25 nM del conjugado de insulina N-terminal o B29 y se midieron sus afinidades de unión. Estos conjugados de insulina se diluyeron utilizando un tampón de unión (HBS-EP) y se unieron al chip inmovilizado de conjugado de insulina durante 4 minutos, y se disociaron durante 6 minutos. Luego, para unir los conjugados de insulina en diferentes concentraciones, se aplicó NaCl 50 mM/NaOH 5 mM a los conjugados de insulina acoplados con los receptores de insulina durante aproximadamente 30 segundos. La afinidad de enlace se analizó utilizando el modelo de enlace Langmuir 1:1 del programa de software BIAevaluation. Los resultados se proporcionan en la Figura 4.

Como se muestra en la Figura 4, se encontró que tanto los conjugados de insulina N-terminal como B29 se unían a los receptores de insulina de una manera dependiente de la concentración. Las afinidades de unión de estos conjugados de insulina a los receptores de insulina se muestran en la Tabla 1. En detalle, el conjugado de insulina B29 tiene una constante de asociación que es aproximadamente 1,8 veces más alta que la del conjugado de insulina N-terminal, lo que indica que la unión de la insulina B29 El conjugado con el receptor de insulina es más rápido que el del conjugado de insulina N-terminal. El conjugado de insulina B29 tiene una constante de velocidad de disociación que es aproximadamente 1,8 veces más baja que la del conjugado de insulina N-terminal, lo que indica que, después de la unión, la unión del conjugado de insulina B29 al receptor de

insulina se mantiene más estable. Los resultados de la comparación de la afinidad de unión entre los conjugados de insulina N-terminal y B29 mostraron que la afinidad de unión del conjugado de insulina B29 es aproximadamente 3,6 veces mayor que la del conjugado de insulina N-terminal.

Tabla 1

Comparación de la afinidad de unión al receptor de insulina entre el conjugado de insulina N-terminal y el conjugado de insulina B29			
Conjugado de insulina	k_a (1/ms, X10^5)	k_d (1/s, X10^3)	K_D (nM)
Extremo N-terminal	0,06 ± 0,01	3,86 ± 0,15	692,5 ± 50,2
B29	0,11 ± 0,02	2,15 ± 0,22	191,5 ± 50,2
k_a: tasa de asociación constante k_d: constante de velocidad de disociación K_D: constante de afinidad			

Efecto

El conjugado de insulina de la presente divulgación exhibe una afinidad de unión notablemente aumentada a los receptores de insulina, y por lo tanto la actividad *in vivo* de la insulina se mejora enormemente, por lo que se usa en el desarrollo de una formulación de insulina de acción prolongada con alta eficiencia.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de insulina, en el que la insulina y una región Fc de inmunoglobulina están ligadas entre sí a través de un ligador polimérico no peptídico seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, un polímero biodegradable, un polímero lipídico, quitina, ácido hialurónico y una combinación de los mismos, y un extremo del polímero no peptídico está ligado a cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 29 de una cadena beta de insulina y el otro extremo de la misma está ligado a la región Fc de inmunoglobulina; en el que la insulina es una insulina nativa o tiene al menos un 80% de homología con la insulina nativa.

2. El conjugado de insulina según la reivindicación 1, en el que el polímero no peptídico está ligado a uno cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 25 a 29 de la cadena beta de insulina.

3. El conjugado de insulina según la reivindicación 1, en el que el polímero no peptídico está ligado al residuo de lisina en la posición 29 de la cadena beta de insulina.

4. El conjugado de insulina según la reivindicación 1, en el que el residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina, al que está ligado el polímero no peptídico, tiene un grupo amino o un grupo tiol.

5. El conjugado de insulina según la reivindicación 1, en el que la insulina es una insulina nativa, o una variante que se prepara mediante cualquier procedimiento de sustitución, adición, deleción y modificación de algunos aminoácidos de la insulina nativa o por una combinación de los mismos, un derivado de insulina, un agonista de insulina, o un fragmento del mismo; y opcionalmente, la insulina es una insulina nativa o una variante que se prepara por sustitución, adición, modificación de algunos aminoácidos de la insulina nativa o por una combinación de los mismos; y

en el que la variante, derivado, agonista y fragmento de insulina tienen una función de regulación de los niveles de glucosa en sangre.

6. El conjugado de insulina según la reivindicación 1, en el que la insulina es una insulina nativa o una variante que se prepara mediante la sustitución de un aminoácido de insulina nativa.

7. El conjugado de insulina según la reivindicación 1, en el que ambos extremos del polímero no peptídico están ligados a un grupo amino o un grupo tiol de la cadena lateral del residuo de aminoácido de una región Fc de inmunoglobulina y la cadena beta de insulina, respectivamente.

8. El conjugado de insulina según la reivindicación 7, en el que el aminoácido es un aminoácido de origen natural o de origen no natural.

9. El conjugado de insulina según la reivindicación 1, en el que la región Fc de inmunoglobulina está aglicosilada.

10. El conjugado de insulina según la reivindicación 1, en el que la región Fc de inmunoglobulina está compuesta de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en los dominios CH1, CH2, CH3 y CH4.

11. El conjugado de insulina según la reivindicación 10, en el que la región Fc de inmunoglobulina incluye además una región bisagra.

12. El conjugado de insulina según la reivindicación 1, en el que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc derivada de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.

13. El conjugado de insulina según la reivindicación 12, en el que cada dominio de la región Fc de inmunoglobulina es un híbrido de dominios de un origen diferente derivado de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.

14. El conjugado de insulina según la reivindicación 12, en el que la región Fc de inmunoglobulina es un dímero o un multímero compuesto por inmunoglobulinas monocatenarias compuestas de dominios del mismo origen.

15. El conjugado de insulina según la reivindicación 12, en el que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4.

16. El conjugado de insulina según la reivindicación 12, en el que la región Fc de inmunoglobulina es una

región Fc de IgG4 aglicosilada humana.

17. El conjugado de insulina según la reivindicación 1, en el que el polímero no peptídico se une al grupo amino o al grupo tiol de la cadena lateral del residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina para formar un enlace peptídico, hemitioacetal, imina o tiodioxopirrolidinilo.

18. El conjugado de insulina según la reivindicación 1, en el que ambos extremos del polímero no peptídico se unen cada uno independientemente a través de un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida.

19. El conjugado de insulina según la reivindicación 18, en el que el derivado de succinimida es succinimidil carboximetilo, succinimidil valerato, succinimidil metil butanoato, succinimidil metil propionato, succinimidil butanoato, succinimidil propionato, N-hidroxisuccinimida o succinimidil carbonato.

20. El conjugado de insulina según la reivindicación 18, en el que ambos extremos del polímero no peptídico se unen a través de un grupo reactivo de butiraldehído o un grupo reactivo de succinimidil valerato, respectivamente.

21. Una formulación de insulina de acción prolongada que tiene una duración y estabilidad *in vivo* mejoradas, que comprende el conjugado de insulina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

22. La formulación de insulina de acción prolongada según la reivindicación 21, en la que la formulación se usa para el tratamiento de la diabetes.

23. Un procedimiento de preparación del conjugado de insulina según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

(1) enlazar covalentemente un polímero no peptídico a uno cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 29 de la cadena beta de insulina;
(2) aislar un complejo de insulina, en el que el polímero no peptídico está ligado covalentemente a uno cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 29 de la cadena beta de insulina excluyendo el extremo N-terminal del mismo, de la mezcla de reacción de (1); y
(3) enlazar covalentemente una región Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico del complejo aislado para producir un conjugado de insulina, en el que la región Fc de inmunoglobulina y la insulina están ligadas a cada extremo del polímero no peptídico; en el que la insulina es una insulina nativa o tiene al menos un 80% de homología con la insulina nativa.

24. El procedimiento según la reivindicación 23, en el que el polímero no peptídico se une al grupo amino o al grupo tiol de la cadena lateral del residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina para formar un enlace peptídico, hemitioacetal, imina o tiodioxopirrolidinilo.

25. El procedimiento según la reivindicación 23, en el que ambos extremos del polímero no peptídico tienen cada uno independientemente un derivado de aldehído, un derivado de maleimida, o un derivado de succinimida como un grupo reactivo.

26. El procedimiento según la reivindicación 23, en el que ambos extremos del polímero no peptídico están ligados a un grupo amino o un grupo tiol de la cadena lateral del residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina y una región Fc de inmunoglobulina, respectivamente.

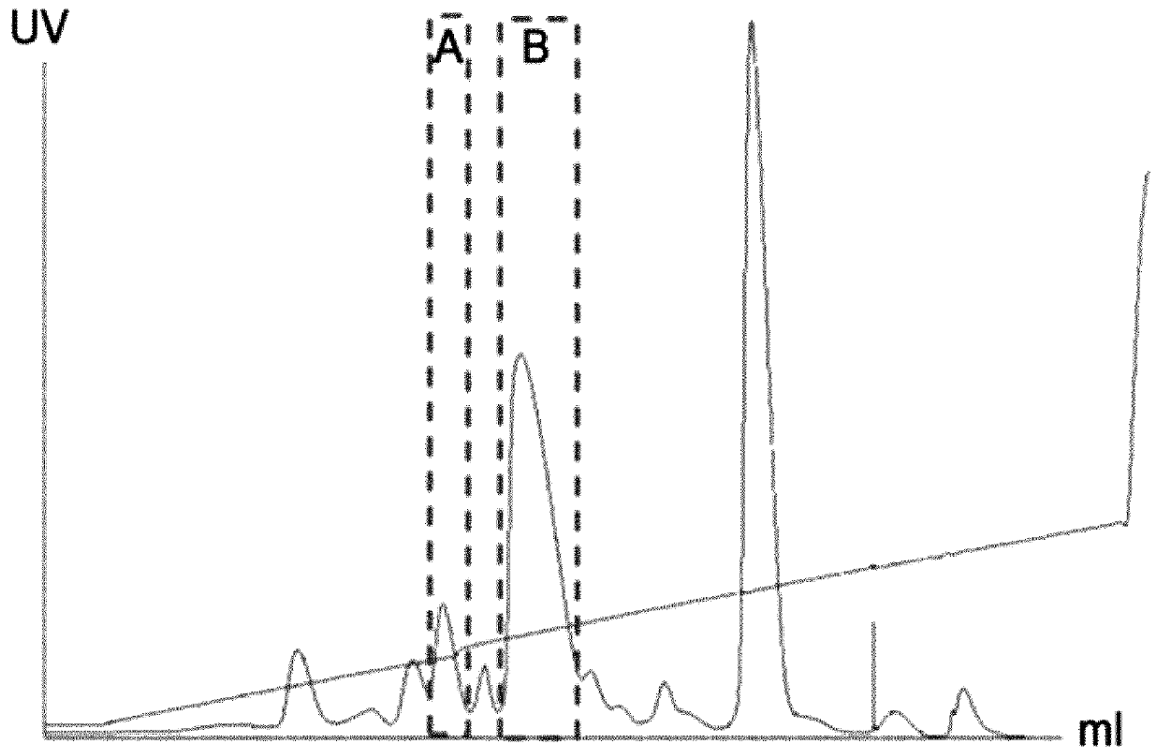
27. El procedimiento según la reivindicación 23, en el que ambos extremos del polímero no peptídico tienen cada uno independientemente un grupo butiraldehído o un grupo reactivo de succinimidil valerato.

28. El procedimiento según la reivindicación 23, en el que la Etapa (1) se realiza en un entorno alcalino de pH 9,0±2.

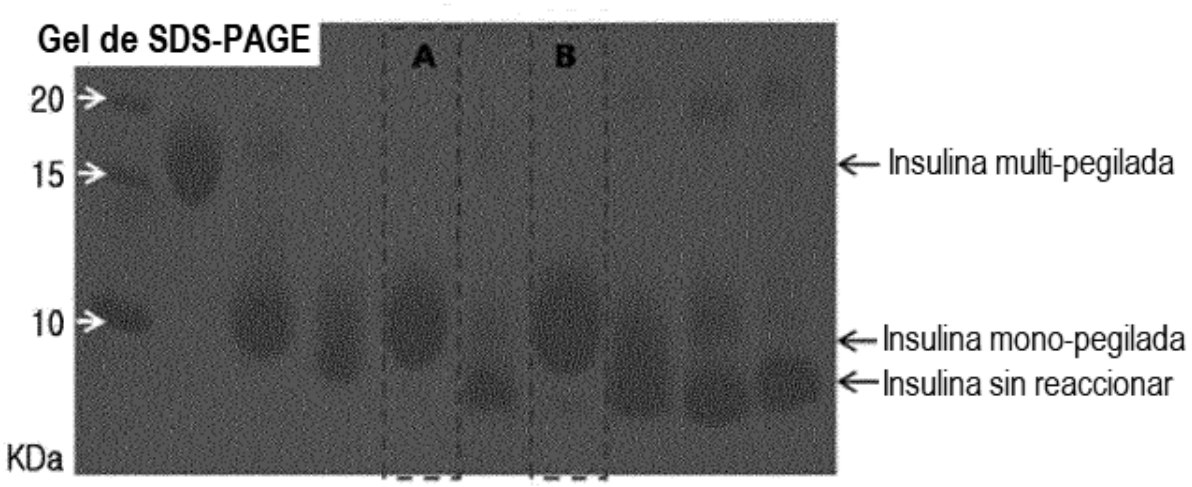
29. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en el que la proporción molar de la insulina y el polímero no peptídico en la Etapa (1) es de 1:1,5 a 1:10.

30. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en el que una proporción molar del complejo de insulina y la región Fc de inmunoglobulina en la Etapa (3) es de 1:1 a 1:10.

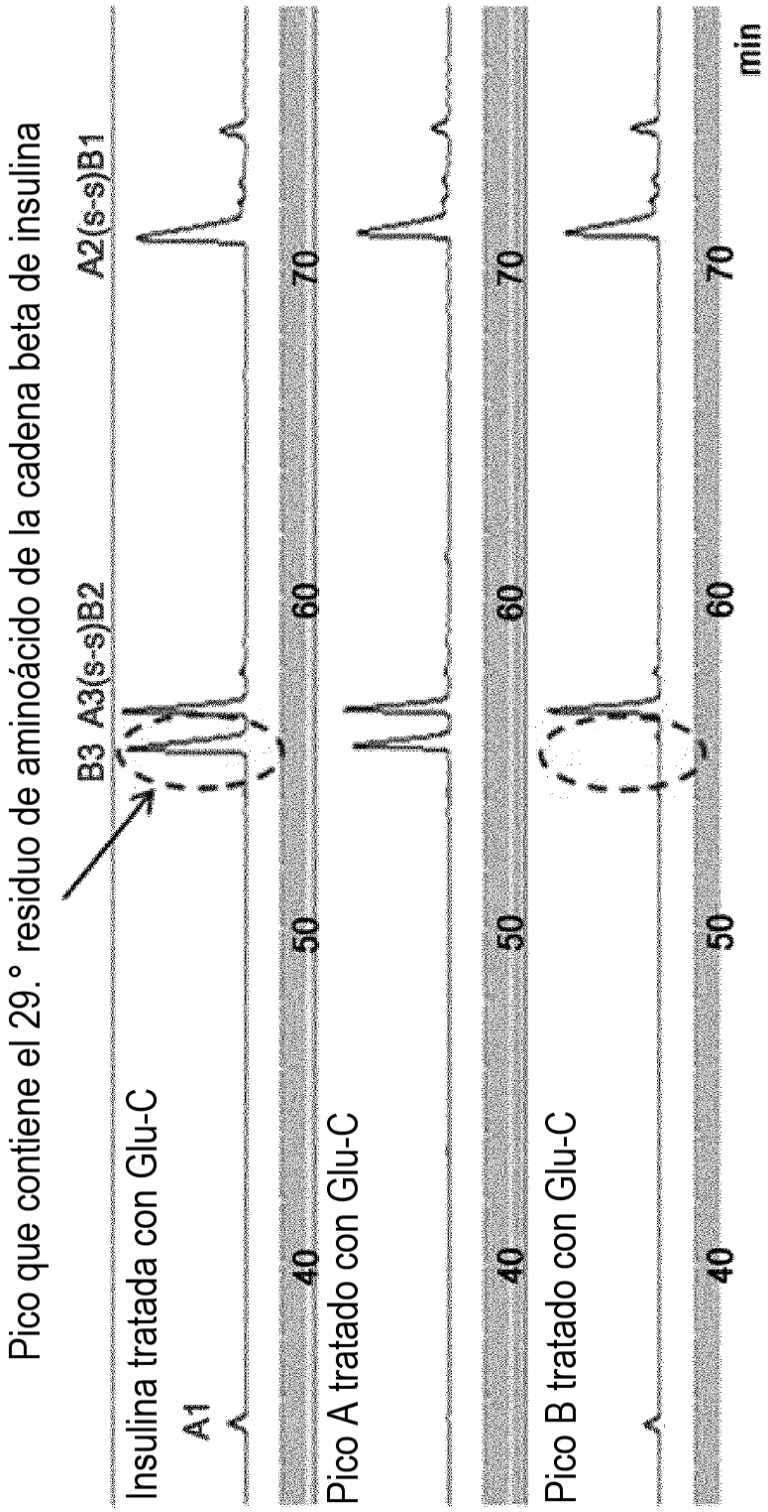
[FIG. 1a]



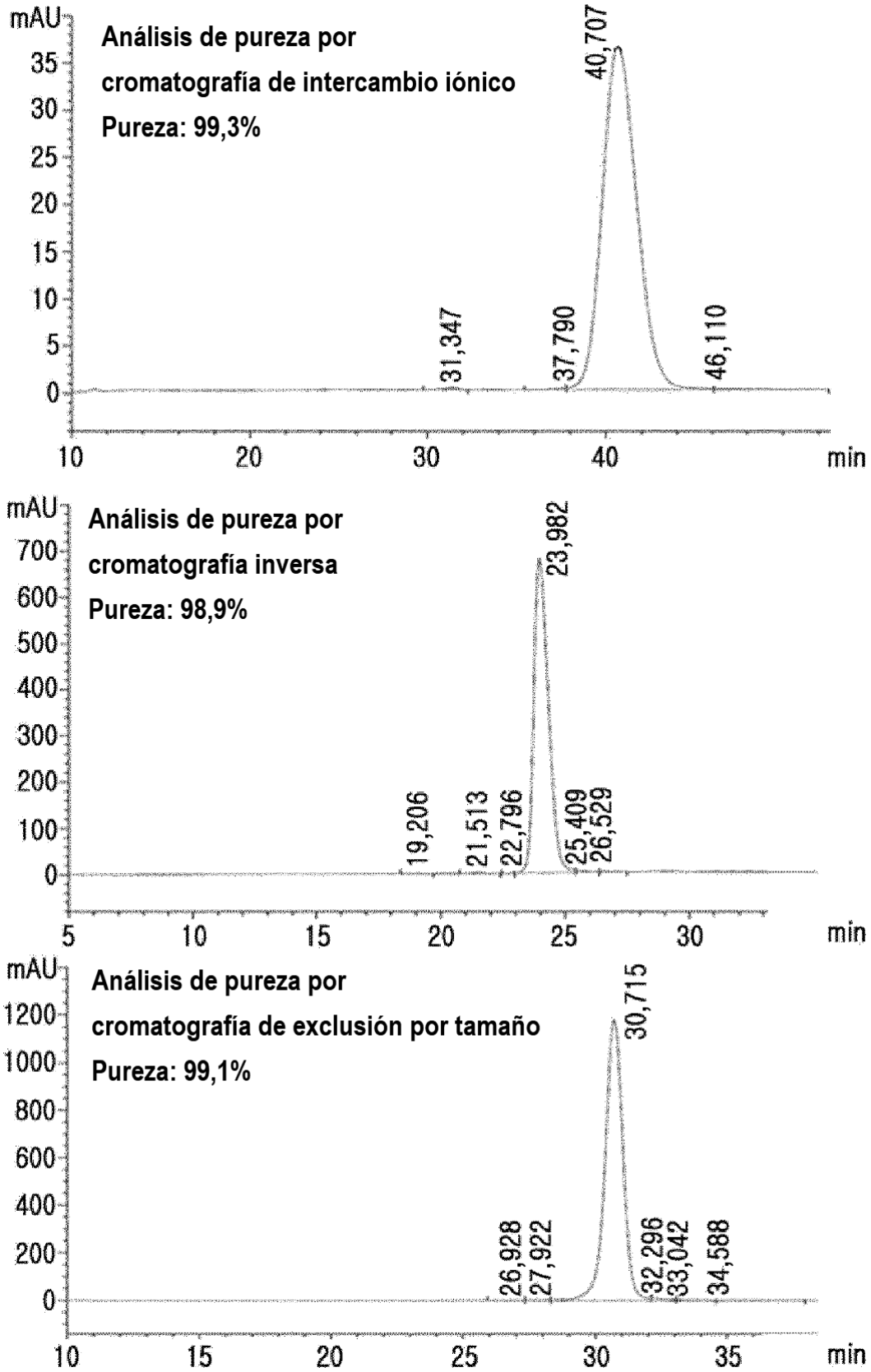
[FIG. 1b]


Gel de SDS-PAGE
A
B
20
15
10
KDa
Insulina multi-pegilada
Insulina mono-pegilada
Insulina sin reaccionar

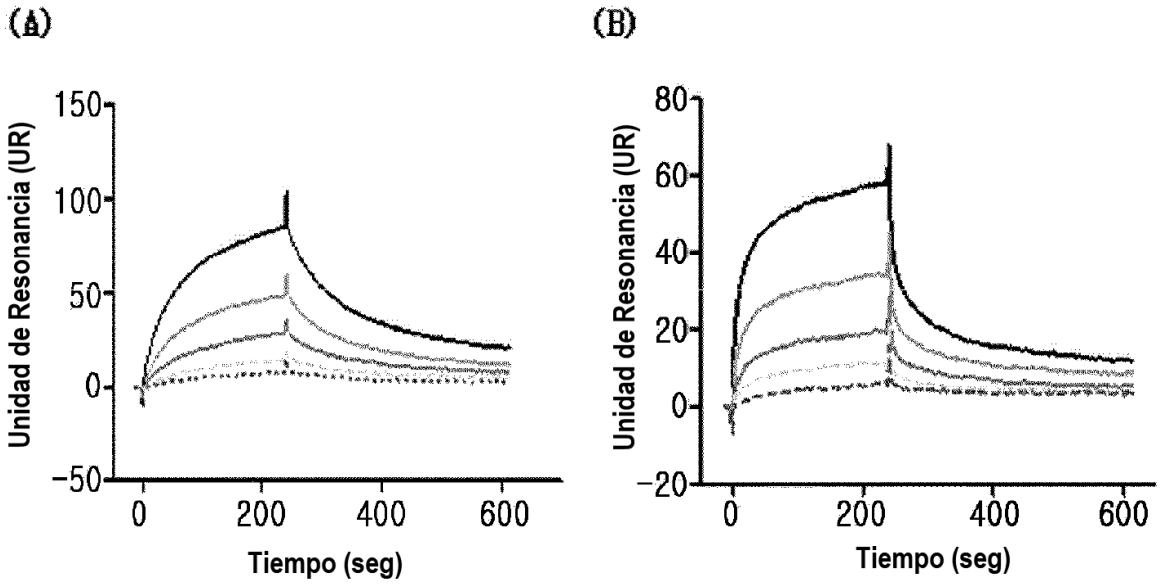
[FIG. 2]


Pico que contiene el 29.° residuo de aminoácido de la cadena beta de insulina
Insulina tratada con Glu-C
A1
B3
A3(s-s)B2
A2(s-s)B1
Pico A tratado con Glu-C
Pico B tratado con Glu-C
40
50
60
70
min

[FIG. 3]


mAU
Análisis de pureza por
cromatografía de intercambio iónico
Pureza: 99,3%
40,707
31,347
37,790
46,110
min
mAU
Análisis de pureza por
cromatografía inversa
Pureza: 98,9%
23,982
19,206
21,513
22,796
25,409
26,529
min
mAU
Análisis de pureza por
cromatografía de exclusión por tamaño
Pureza: 99,1%
30,715
26,928
27,922
32,296
33,042
34,588
min

[FIG. 4]


(A)
150
100
50
0
−50
Unidad de Resonancia (UR)
0
200
400
600
Tiempo (seg)
(B)
80
60
40
20
0
−20
Unidad de Resonancia (UR)
0
200
400
600
Tiempo (seg)