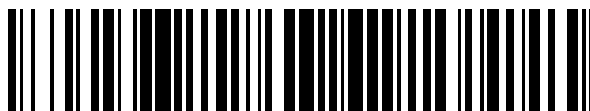


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 918**

51 Int. Cl.:

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2013 PCT/KR2013/006676**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14017849**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2013 E 13822545 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2877201**

54 Título: **Una formulación líquida de insulina y péptido insulínico de acción prolongada**

30 Prioridad:

25.07.2012 KR 20120081478

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

21.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LIM, HYUNG KYU;
KIM, HYUN UK;
LEE, MI KYOUNG;
LEE, JONG SOO;
BAE, SUNG MIN y
KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 743 918 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

Una formulación líquida de insulina y péptido insulínico de acción prolongada

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a una formulación líquida de una combinación de insulina y péptido insulínico de acción prolongada, que comprende insulina y péptido insulínico, que son péptidos fisiológicamente activos, y un estabilizador libre de albúmina, en el que el estabilizador comprende un tampón, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y un agente isotónico; y un procedimiento de preparación de la formulación líquida.

Técnica antecedente

10 La insulina es un péptido segregado por las células beta pancreáticas, y desempeña un papel central en el control de la glucosa en sangre en el cuerpo. Si carece la cantidad de insulina secretada o la insulina secretada no funciona de manera correcta en el cuerpo, el nivel de glucosa en la sangre será elevado, lo que provoca una enfermedad metabólica llamada diabetes. Cuando la insulina no es secretada de manera correcta o no funciona de manera correcta en el cuerpo, el nivel de glucosa en la sangre se incrementa sin regulación, y este tipo de diabetes se llama diabetes tipo II. La diabetes tipo I se produce cuando el páncreas no produce suficiente insulina para regular el incremento de glucosa en la sangre. La diabetes tipo II se trata por lo general por medio de la administración de agentes hipoglucemiantes orales que consisten principalmente en compuestos químicos, y algunas veces se puede administrar insulina a algunos de los pacientes. Por otra parte, para el tratamiento de la diabetes tipo I, la administración de insulina es esencial.

20 El tratamiento con insulina ampliamente utilizado es una inyección de insulina antes y después de las comidas. La insulina está disponible en una formulación para inyección parenteral y administrada por vía subcutánea en principio, y en función de la duración del tratamiento, un procedimiento de administración es diferente. La administración de insulina por inyección es más eficaz en la reducción del nivel de glucosa en la sangre en comparación con la medicina oral, y se puede aplicar de forma segura en las circunstancias en las que un fármaco oral no se puede utilizar. Además, la inyección parenteral de insulina no tiene una limitación de la dosis, sin embargo, dado que tiene que ser administrada de manera continua tres veces al día, tiene desventajas tales como que provoca una aversión a las agujas, un procedimiento de administración difícil, síntomas de hipoglucemia, y síntomas de ganancia de peso debido a la administración prolongada de insulina. En especial, el incremento de peso incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y puede perturbar la función reguladora del cuerpo para el nivel de glucosa en la sangre. Mientras tanto, ha habido muchos intentos para maximizar el efecto terapéutico de un fármaco de péptido de insulina por medio del mantenimiento de un alto nivel de fármaco en la sangre durante un largo período de tiempo, después de administrar el fármaco en el cuerpo. Como resultado, se ha desarrollado, fabricado y comercializado la insulina de acción prolongada. Los ejemplos de tales fármacos de acción prolongada incluyen Lantus (insulina glargina; Sanofi Aventis) y Levemir (insulina detemir; Novo Nordisk). A diferencia de la insulina protamina neutra de Hagedorn (NPH), los fármacos de acción prolongada tienen un menor riesgo de hipoglucemia durante el estado hipnoide. En particular, Levemir alivia el síntoma de incremento de peso. Sin embargo, el procedimiento de administración que implica una o dos inyecciones por día sigue siendo una desventaja.

40 Mientras tanto, un péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), que es un tipo de péptido insulínico, es una hormona incretina secretada a partir de L-célula del íleon y el intestino grueso. La función principal de GLP1 es incrementar la secreción de insulina para el establecimiento de una secreción de insulina dependiente de la glucosa en el cuerpo, para evitar de ese modo la hipoglucemia. Con este efecto, GLP1 se puede aplicar para tratar la diabetes tipo 2. Sin embargo, como la vida media en suero de GLP-1 es tan corta como 2 minutos, tiene alta limitación para ser convertido en un fármaco. En consecuencia, un nuevo agonista de GLP-1 llamado exendina-4 se ha desarrollado y fabricado. La exendina-4 es un agonista de GLP-1 producido en la glándula salival del lagarto monstruo de Gila. Además, exendina-4 es resistente a la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-IV) y tiene una actividad fisiológica mayor que GLP-1. De este modo, exendina-4 tiene una vida media de 2 a 4 horas en el cuerpo, que es mucho más larga que la de GLP-1 (Registro de Patente de los Estados Unidos Núm. US 5424286). Sin embargo, una duración suficiente de la actividad fisiológica del fármaco no se puede lograr simplemente por medio del incremento de la resistencia a la DPP-IV. Por ejemplo, la exendina-4 actualmente disponible (exenatida) tiene que ser administrada dos veces al día al paciente por inyección, y todavía tiene las desventajas de que provoca vómitos y náuseas.

50 Por lo tanto, como un procedimiento para mantener la actividad de fármaco de proteína y mejorar la estabilidad del mismo en el cuerpo de manera simultánea para la resolución de los problemas anteriores, los presentes inventores han sugerido previamente un desarrollo conjugado de proteína de acción prolongada por medio de la ligación de un polipéptido fisiológicamente activo conocido y la región Fc de inmunoglobulina a través de unión covalente por el uso de un polímero no peptídico como un enlazador (registro de Patente coreana Núm. 10-0725315). En particular, se confirmó previamente que cada uno de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de exendina-4 de acción prolongada ha incrementado notablemente la durabilidad *in vivo* (Registro de Patente Coreana Núm. 10-1058290 y la Publicación Núm. 10-2011-0134210). Sin embargo, si se administra una cantidad efectiva para uso terapéutico de insulina o de exendina-4 para mantener un nivel estable de glucosa en la sangre; esto puede provocar incremento de peso o síntomas de vómitos y náuseas. Por lo tanto, hay una gran demanda para el desarrollo de un procedimiento terapéutico que pueda reducir una dosis de fármaco y la frecuencia mientras que ofrece un excelente efecto terapéutico

para la diabetes.

La Patente WO 2011/144673 se refiere a "una formulación farmacéutica acuosa que comprende de 200 a 1000 U/ml [equimolar de 200 a 1000 UI de insulina humana] de la insulina glargina" y su uso.

Divulgación

5 Problema técnico

10 Teniendo en cuenta estos antecedentes, en un esfuerzo por proporcionar una formulación líquida estable de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada, que puede almacenar la combinación de los dos conjugados sin un riesgo de contaminación viral durante un largo período de tiempo, los presentes inventores han mejorado la estabilidad de la combinación de los dos conjugados por el uso de un estabilizador que comprende un tampón, un alcohol de azúcar, cloruro de sodio como un agente isotónico, y un tensioactivo no iónico, y desarrollaron una formulación líquida rentable y estable.

Solución al problema

15 Un objetivo de la presente divulgación es proporcionar una formulación líquida de una combinación de insulina y péptido insulínico de acción prolongada, que comprende insulina y péptido insulínico que son péptidos fisiológicamente activos, y un estabilizador libre de albúmina, en el que el estabilizador comprende un tampón, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y un agente isotónico.

Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un procedimiento de preparación de la formulación líquida.

Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la diabetes, que comprende insulina y péptido insulínico.

20 Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un procedimiento para el tratamiento de la diabetes, que comprende la administración de la composición a un sujeto que tiene diabetes.

Efectos ventajosos

25 La combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada de la presente divulgación muestra un excelente efecto terapéutico para el tratamiento de la diabetes. Además, una formulación líquida de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada de la presente divulgación comprende un estabilizador que comprende un tampón, un alcohol de azúcar, un agente isotónico y un tensioactivo no iónico, pero no contiene albúmina de suero humano y otros factores potencialmente tóxicos para el cuerpo, y por lo tanto no tiene un riesgo de contaminación viral. Además, la formulación líquida proporciona una estabilidad excelente de almacenamiento para el conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada que tiene mayor peso molecular y mayor durabilidad *in vivo* en comparación con una forma nativa, gracias a que está compuesto por insulina o péptido insulínico y la región Fc de inmunoglobulina. En particular, la presente divulgación proporciona una formulación líquida estable para una combinación del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada. Tal formulación líquida de la presente divulgación es una formulación simple que 35 proporciona una excelente estabilidad de almacenamiento, y por lo tanto es más rentable en comparación con otro estabilizador o formulación liofilizada. Además, la presente formulación líquida puede mantener la actividad de la proteína en el cuerpo durante un largo período de tiempo, en comparación con otras formulaciones convencionales de insulina y péptido insulínico, y por lo tanto se puede utilizar como una formulación de fármaco efectiva.

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 muestra los resultados del monitoreo de la generación de precipitación para las formulaciones de un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada preparado en las composiciones de la Tabla 3 a 40 °C durante 1 semana.

45 La Figura 2 muestra los resultados del análisis de IE-HPLC en el conjugado de insulina y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada que se prepararon en las composiciones de la Tabla 4 y se almacenaron a 40 °C durante 4 semanas.

La Figura 3 muestra los resultados del análisis de RP-HPLC en el conjugado de insulina y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada que se prepararon en las composiciones de la Tabla 4 y se almacenaron a 40 °C durante 4 semanas.

50 La Figura 4 muestra los resultados del monitoreo de la generación de precipitación de proteínas en cada una de las formulaciones combinadas que tienen composiciones diferentes, en comparación con una formulación separada.

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

Mejor modo

Como un aspecto de la presente divulgación, se proporciona una formulación líquida de una combinación de insulina y péptido insulínico de acción prolongada, que comprende insulina y péptido insulínico, que son péptidos fisiológicamente activos, y un estabilizador libre de albúmina, en el que el estabilizador comprende un tampón, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y un agente isotónico. La formulación líquida de la presente divulgación se caracteriza porque la insulina y el péptido insulínico se administran en conjunto.

La insulina puede estar comprendida en una formulación líquida en una forma de una cantidad efectiva para uso farmacéutico de conjugado de insulina de acción prolongada, en la que la insulina está enlazada a una región Fc de inmunoglobulina. El péptido insulínico puede estar comprendido en una formulación líquida en una forma de una cantidad efectiva para uso farmacéutico de un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada, en el que el péptido insulínico está enlazado a una región Fc de inmunoglobulina.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “conjugado de insulina de acción prolongada” se refiere a un conjugado en el que una insulina fisiológicamente activa, que incluye derivado, variante, precursor y fragmento, está enlazada con una región Fc de inmunoglobulina, y se puede referir a un conjugado que tiene duración *in vivo* incrementada de actividad fisiológica en comparación con una insulina nativa. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el conjugado de insulina de acción prolongada se refiere a la insulina conectada con una región Fc de inmunoglobulina a través de un enlazador no peptídico o un enlazador peptídico. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “conjugado de péptido insulínico de acción prolongada” se refiere a un conjugado, en el que un péptido insulínico fisiológicamente activo, que incluye un derivado, variante, precursor y fragmento, está enlazado con una región Fc de inmunoglobulina, y se puede referir a un conjugado que tiene mayor duración *in vivo* de actividad fisiológica en comparación con el péptido insulínico nativo.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada se refiere al péptido insulínico enlazado a una región Fc de inmunoglobulina a través de un enlazador no peptídico o un enlazador peptídico.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “de acción prolongada” se refiere a una mejora de la duración de la actividad fisiológica en comparación con la de un péptido nativo. El término “conjugado” se refiere a una forma de péptido, en el que la insulina o péptido insulínico se vincula con una región Fc de inmunoglobulina.

El conjugado de insulina de acción prolongada o conjugado de péptido insulínico de la presente divulgación tiene una durabilidad mejorada del efecto en comparación con la insulina nativa o el péptido insulínico. El tipo del conjugado de insulina de acción prolongada o el conjugado de péptido insulínico incluye una forma de insulina o péptido insulínico generada por medio de la modificación, sustitución, adición o supresión de aminoácidos a partir de una insulina o péptido insulínico natural; un conjugado en el que la insulina o el péptido insulínico está enlazado con un polímero biodegradable tal como PEG; un conjugado en el que la insulina o el péptido insulínico está enlazado con una proteína con alta durabilidad tal como albúmina o inmunoglobulina; un conjugado en el que la insulina o el péptido insulínico está enlazado con un ácido graso que tiene una afinidad de unión con la albúmina en el cuerpo; o una forma de insulina o péptido insulínico que está encerrada en una nanopartícula biodegradable, pero no se limita a las mismas.

El conjugado de insulina o péptido insulínico de acción prolongada utilizado en la presente divulgación se prepara por medio de la unión de la insulina o péptido insulínico sintetizado con una región Fc de inmunoglobulina. El procedimiento para el enlazamiento de los dos puede ser la reticulación de insulina o péptido insulínico con una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico, o por medio de la producción de una proteína de fusión en la que la insulina o el péptido insulínico y una región Fc de inmunoglobulina están unidos por recombinación genética.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “insulina” se refiere a un péptido que es secretado por el páncreas en respuesta a los niveles elevados de glucosa en sangre en el cuerpo para absorber la glucosa en el hígado, músculo o tejido adiposo y convertirlo en glucógeno, y para detener el uso de la grasa como fuente de energía, y por lo tanto funciona para controlar la glucosa en sangre. Este péptido incluye la insulina nativa, la insulina basal, y los agonistas, precursores, derivados, fragmentos y variantes del mismo.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “insulina nativa” es una hormona que es secretada por el páncreas para promover la absorción de glucosa, pero inhibir la descomposición de las grasas en las células y por lo tanto funciona para controlar el nivel de glucosa en la sangre. La insulina se genera por medio del procesamiento de su precursor, la proinsulina, que no tiene una función de regulación del 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 (SEC. ID Núm. 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 (SEC. ID Núm. 2)

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “insulina basal” se refiere a un péptido que regula los cambios normales de nivel de glucosa en la sangre durante cada día, y los ejemplos de tales péptidos incluyen Levemir, Lantus y Degludec. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “agonista de la insulina” se refiere a un compuesto que se une al receptor intrínseco de la insulina, que muestra la misma actividad biológica que la insulina, de manera independiente de la diferencia estructural a la insulina. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “variante de insulina” se refiere a un péptido que tiene una o más secuencias de aminoácidos diferentes de la insulina natural, que tiene una función de regular el nivel de glucosa en la sangre en el cuerpo. El derivado de insulina se puede preparar por medio de uno de sustitución, adición, eliminación y modificación de algunos aminoácidos de insulina nativa o una combinación de los mismos. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “derivado de insulina” se refiere a un péptido que tiene por lo menos 80% homología de secuencia de aminoácidos con la insulina natural, que puede tener algunos grupos en el residuo de aminoácido químicamente sustituido (por ej., alfa-metilación, alfa-hidroxilación), suprimido (por ej., desaminación), o modificado (por ej., N-metilación), y tiene una función de regular el nivel de glucosa en la sangre en el cuerpo. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “fragmento de insulina” se refiere a un fragmento que tiene uno o más aminoácidos añadidos o borrados en el extremo N-terminal o C-terminal de la insulina natural, en el que se pueden añadir aminoácidos de origen no natural (por ej., los aminoácido de tipo D). El fragmento de insulina tiene una función de regular el nivel de glucosa en sangre en el cuerpo.

Cada uno de los procedimientos utilizados para la preparación de los agonistas, derivados, fragmentos y variantes de insulina se pueden aplicar de manera individual o en combinación. Por ejemplo, el alcance de la presente divulgación comprende un péptido que tiene una o más secuencias de aminoácidos diferentes de las del péptido nativo y tiene el residuo de aminoácido N-terminal desaminado, mientras que posee una función de regular el nivel de glucosa en la sangre en el cuerpo.

La insulina utilizada en la presente divulgación se puede producir por medio de una tecnología de recombinación o se puede sintetizar por una síntesis en fase sólida. Además, la insulina puede estar enlazada con un polímero no peptídico. Tal polímero no peptídico se puede utilizar como un enlazador en la presente divulgación. Por medio del enlazamiento de la insulina con el polímero no peptídico como un enlazador, la estabilidad de la insulina se puede mejorar mientras que se mantiene la actividad de la misma. Un péptido se puede aplicar como un enlazador por el uso de una técnica de recombinación genética.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “polímero no peptídico” se refiere a un polímero biocompatible compuesto por una o más unidades de repetición, en el que las unidades de repetición están enlazadas entre sí a través de cualquier tipo de enlace covalente, pero no por un enlace peptídico. En la presente divulgación el “polímero no peptídico” se puede utilizar de manera intercambiable con “enlazador no peptídico”.

El polímero no peptídico que se puede utilizar en la presente divulgación se selecciona del grupo que consiste en polímeros biodegradables tales como polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil etil éter, ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico-glicólico (PLGA); polímeros de lípidos; quitinas; ácido hialurónico; y una combinación de los mismos. Con preferencia, el polietilenglicol se utiliza como el polímero no peptídico. El alcance de la presente divulgación también incluye los derivados de los mismos que son muy conocidos en la técnica y los derivados que se pueden preparar con facilidad por el uso de las técnicas disponibles en la técnica.

El enlazador de peptídico utilizado en una proteína de fusión, que se prepara por un procedimiento de fusión en un marco convencional, tiene una limitación, dado que puede ser escindido con facilidad por una proteasa en el cuerpo, y por lo tanto no puede incrementar la vida media en suero del fármaco activo suficientemente tanto como cuando se utiliza un vehículo. Sin embargo, en la presente divulgación la vida media en suero del péptido se puede mantener a un nivel similar al que cuando se utiliza un vehículo, por el uso de un polímero resistente a la proteasa. Por lo tanto, el polímero no peptídico incluye cualquier tipo de polímeros no peptídicos, con la condición de que tenga la función mencionada con anterioridad, es decir, ser resistente a la proteasa. El polímero no peptídico tiene un peso molecular de 1 a 100 kDa, y con preferencia de 1 a 20 kDa. Además, el polímero no peptídico de la presente divulgación, que está enlazado a una región Fc de inmunoglobulina, puede ser un solo tipo de polímeros o una combinación de diferentes tipos de polímeros.

El polímero no peptídico puede tener un grupo funcional que puede ser enlazado a una región Fc de inmunoglobulina y el fármaco de proteína. Los grupos funcionales del polímero no peptídico en ambos terminales con preferencia se seleccionan del grupo que consiste en un grupo reactivo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida. El derivado de succinimida puede ser propionato de succinimidilo, succinimidil hidroxilo, carboximetilo de succinimidilo, o carbonato de succinimidilo. En particular, cuando el polímero no peptídico tiene grupos aldehído reactivos en ambos terminales, esto puede minimizar los enlaces no específicos y puede hacer efectivo el enlazamiento del polímero no peptídico con un polipéptido fisiológicamente activo y una inmunoglobulina en cada extremo. Un producto final generado por alquilación reductora que forma el enlace aldehído es mucho más estable que los enlazados por un enlace amida. Un grupo funcional aldehído se une de manera selectiva al extremo N-terminal a un pH bajo, y forma un enlace covalente con un residuo de lisina a un pH alto, por ejemplo a un pH

de 9,0.

Los grupos funcionales en dos terminales del polímero no peptídico pueden ser los mismos o diferentes. Por ejemplo, el polímero no peptídico puede tener un grupo maleimida en un terminal, y un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o un grupo butiraldehído en el otro terminal. Cuando se utiliza un polietilenglicol que tiene un grupo hidroxilo en ambos terminales como un polímero no peptídico, el grupo hidroxilo puede ser activado en varios grupos funcionales por medio de reacciones químicas conocidas, o un polietilenglicol comercialmente disponible que tiene un grupo funcional modificado se puede utilizar con el fin de preparar el conjugado de insulina de acción prolongada de la presente divulgación.

Con preferencia, el polímero no peptídico puede estar enlazado al extremo N-terminal de la cadena beta de insulina.

La insulina de la presente divulgación puede ser modificada con un polímero no peptídico.

10 Durante el desarrollo de un conjugado de insulina de acción prolongada por el uso de un fragmento de inmunoglobulina, si un polipéptido fisiológicamente activo se modifica con PEG para incrementar la durabilidad del fármaco sin provocar hipoglucemia, esto puede reducir el título. Sin embargo, la reducción del título se convierte en una ventaja del conjugado de insulina de acción prolongada y por lo tanto la insulina modificada con PEG se puede combinar con la región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico. El tipo de polímero no peptídico que se puede utilizar en la modificación de la insulina es el mismo que el descrito con anterioridad, y con preferencia polietilenglicol (PEG). En la insulina modificada con PEG, el PEG está unido de manera selectiva al extremo N-terminal de la cadena alfa de insulina o a un residuo de lisina específico de la cadena beta. El PEG que modifica la insulina comprende con preferencia un grupo aldehído o un grupo succinilo en el terminal, y con mayor preferencia un grupo succinilo.

20 El procedimiento de preparación y efecto del conjugado de insulina de acción prolongada de la presente divulgación se describen en las publicaciones de patente coreana Núms. 10-2011-0134210, 10-2011-0134209 y 10-2011-0111267. Aquellos con experiencia en la técnica pueden preparar el conjugado de insulina de acción prolongada, con referencia a estas referencias. Además, los presentes inventores han hallado previamente un procedimiento de preparación del conjugado de insulina de acción prolongada por medio de la mono-PEGilación del extremo N-terminal de la región de Fc de inmunoglobulina, y la fijación del mismo a la primera fenilalanina de la cadena beta de insulina.

25 De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "péptido insulínico" se refiere a un péptido que tiene una función de secretar insulina, y puede estimular la síntesis o la expresión de la insulina en las células β pancreáticas. El péptido insulínico con preferencia es un péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), GLP-2, exendina-3, o exendina-4, o un derivado estructural de los mismos.

30 Un derivado del péptido insulínico se puede referir a un derivado generado por la supresión del grupo amino (o grupo amina) N-terminal del péptido insulínico (es decir, derivado de desamino-histidilo); un derivado generado por medio de la sustitución de un grupo amino del péptido insulínico por grupo hidroxilo (es decir, derivado de imidazopropionilo beta-hidroxilo); un derivado generado por medio de la modificación del grupo amino del péptido insulínico con dos grupos metilo (es decir, derivado de dimetilhistidilo); un derivado generado por medio de la sustitución del grupo amino del extremo N-terminal del péptido insulínico con un grupo carboxilo (es decir, derivado de betacarboxiimidazopropionilo); o un derivado generado por medio de la eliminación de la carga positiva del grupo amino del péptido insulínico por medio de la supresión del alfa-carbono del residuo de histidina N-terminal, dejando un grupo imidazoacetilo solamente (derivado de imidazoacetilo). Además, el alcance de la presente divulgación incluye otras formas de derivados modificados por grupos amino N-terminales.

40 En la presente divulgación, el derivado de péptido insulínico con preferencia es un derivado generado por medio de la modificación química del grupo amino N-terminal o residuo de aminoácido de exendina-4, y con mayor preferencia un derivado de exendina-4 donde el grupo alfa-amino o el grupo alfa-carbono presente en el alfa-carbono de los residuos de histidina, que es el primer aminoácido del extremo N-terminal de exendina-4, está sustituido o eliminado. Incluso con mayor preferencia, el derivado de péptido insulínico es una desamino-histidil-exendina-4 (DA-exendina-4) que se genera por medio de la supresión del grupo amino N-terminal de exendina-4; una beta-hidroxil-imidazopropionil-exendina-4 (HY-exendina-4) que se genera por medio de la sustitución de la exendina-4 por un grupo hidroxilo o grupo carboxilo; una beta-carboxiimidazopropionil-exendina-4 (CX-exendina-4); una dimetil-histidil-exendina-4 que se genera por medio de la modificación de la exendina-4 con dos grupos metilo (DM-exendina-4); o un imidazoacetil-exendina-4 (CA-exendina-4) que se genera por medio de la supresión del alfa-carbono del residuo de histidina N-terminal.

50 GLP-1 es una hormona secretada por el intestino delgado y normalmente funciona para estimular la biosíntesis y la secreción de la insulina, suprime la secreción de glucagón, y promueve la absorción de glucosa en la célula. Un precursor de glucagón en el intestino delgado se degrada en tres péptidos, que son glucagón, GLP-1 y GLP-2. En este caso, el GLP-1 se refiere a GLP-1 (1-37), que no tiene una función para la insulina secretada, pero cuando se procesa a la forma de GLP-1 (7-37), se vuelve activo. La secuencia de aminoácidos de GLP-1 (7-37) es la siguiente:

GLP-1 (7-37):

55 HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFI AW LVKGR G (SEC. ID Núm. 3)

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "derivado de GLP-1" se refiere a un péptido que tiene por

- lo menos 80% de homología de secuencia con el GLP-1 nativo y puede estar en una forma modificada químicamente, al tiempo que demuestra por lo menos la misma o mejorada actividad de secreción de insulina. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “fragmento de GLP-1” se refiere a una forma de péptido donde se añaden o se eliminan uno o más aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal del GLP-1 nativo, en el que el aminoácido
- 5 añadido puede ser aminoácidos de origen no natural (por ej., aminoácido de tipo D). De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “conjugado de péptido insulínico de acción prolongada”, se refiere al péptido que tiene una mayor durabilidad de los efectos en comparación con el péptido insulínico nativo. El conjugado de péptido insulínico de acción prolongada puede estar en forma donde se modifica, sustituye, añade o elimina un
- 10 aminoácido del péptido insulínico nativo; una forma de conjugado donde la insulina está enlazada a un polímero biodegradable tal como PEG; una forma de conjugado donde la insulina está enlazada a una proteína que tiene una alta durabilidad tal como una albúmina, inmunoglobulina y un fragmento de la misma; una forma de conjugado, donde el péptido insulínico está enlazado a un ácido graso que tiene una afinidad de unión con la albúmina en el cuerpo; o una forma de péptido insulínico que está encerrado en una nanopartícula biodegradable, pero el tipo de conjugado de péptido insulínico de acción prolongada no está limitado.
- 15 De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “variante de GLP-1” se refiere a un péptido que tiene una o más secuencias de aminoácidos diferentes de GLP-1 nativo y que posee la función de secretar insulina.
- La exendina-3 y la exendina-4 son el péptido insulínico que consiste en 39 aminoácidos, que tiene 53% de homología de secuencia de aminoácidos con GLP-1. Las secuencias de aminoácidos de la exendina-3 y la exendina-4 son las siguientes:
- 20 Exendina-3:
HSDGT FTSDL SKQME EEA VR LFIEW LKNGG PSSGA PPPS (SEC. ID Núm. 4)
- Exendina-4:
HGE GT FTSDL SKQME EEA VR LFIEW LKNGG PSSGA PPPS (SEC. ID Núm. 5)
- 25 Un agonista de exendina se refiere a una sustancia que tiene la misma bioactividad que la exendina por la unión al receptor *in vivo* de la exendina, de manera independiente de su similitud estructural con la exendina. Un derivado de exendina se refiere a un péptido que muestra por lo menos 80% de homología de secuencia con la exendina nativa y puede tener algunos grupos de residuos de aminoácidos químicamente sustituidos (por ej., alfa-metilación y alfa-hidroxilación), eliminados (por ej., desaminación), o modificados (por ej., N-metilación), y tal derivado de exendina tiene una función de secretar insulina.
- 30 Un fragmento de exendina se refiere a una forma de péptido donde se añaden o se eliminan uno o más aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal de exendina nativa, en el que se pueden añadir aminoácidos de origen no natural (por ej., aminoácido de tipo D) y tal fragmento de exendina tiene una función de secretar insulina.
- Una variante de exendina es un péptido que tiene una o más secuencias de aminoácidos diferentes de la exendina nativa y tiene una función de secretar insulina. La variante de exendina comprende un péptido generado por sustitución
- 35 del aminoácido 12 de la exendina-4, lisina, por serina o arginina. Un procedimiento de preparación de cada uno de agonista de exendina, derivado, fragmento y variante se puede utilizar de manera individual o en combinación. Por ejemplo, el alcance de péptido insulínico comprende el péptido insulínico que tiene una o más secuencias de aminoácidos diferentes de péptido nativo y el residuo de aminoácido N-terminal desaminado. El péptido insulínico nativo y el péptido insulínico modificado se utiliza en la presente divulgación se puede sintetizar por medio de una
- 40 síntesis en fase sólida. También, la mayor parte del péptido nativo, incluido el péptido insulínico nativo, se puede producir por medio de un procedimiento de recombinación.
- El conjugado de péptido insulínico de acción prolongada utilizado en la presente divulgación tiene una forma de péptido insulínico enlazado a fragmento de inmunoglobulina tal como Fc de inmunoglobulina a través de un
- 45 enlazador no peptídico o un enlazador peptídico por el uso de una técnica de recombinación genética. El enlazador no peptídico es el mismo que el descrito con anterioridad. El conjugado de péptido insulínico de acción prolongada se prepara por el uso de un fragmento de inmunoglobulina tal como en el conjugado de insulina de acción prolongada. El conjugado de péptido insulínico de acción prolongada mantiene la actividad fisiológica del péptido insulínico existente, tales como la promoción de la síntesis y la secreción de insulina, la supresión del apetito, la inducción de la pérdida de peso, el incremento de la sensibilidad de las células beta hacia la glucosa en el suero, la promoción de la proliferación de células beta, lo que retrasa el vaciado gástrico, y la supresión de glucagón, y también tiene durabilidad
- 50 mejorada *in vivo* en cuanto a los efectos debido a la mayor vida media en suero de péptido insulínico. Por lo tanto, el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada es eficaz en el tratamiento de la diabetes y la obesidad.
- Para la preparación del conjugado de péptido insulínico de acción prolongada utilizado en la presente divulgación se puede hacer referencia a las siguientes referencias: La inscripción de patente coreana Núm. 10-0725315, la publicación de patente coreana Núm. 10-2009-0008151, y el Registro de Patente Coreana Núm. 10-1058290. Aquellos con experiencia en la técnica pueden preparar el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada de acuerdo con las referencias anteriores.
- 55

Además, los presentes inventores han desarrollado previamente un procedimiento de preparación de un conjugado de exendina-4 de acción prolongada primero por medio de la fijación de PEG a un residuo de lisina (Lys) de imidazo-acetil exendina-4 (CA exendina-4), y el enlazamiento de la exendina-4 modificada por PEG a una región Fc de inmunoglobulina.

- 5 La insulina y el péptido insulínico están enlazados con un vehículo a través de un polímero no peptídico como un enlazador. El vehículo se puede seleccionar del grupo que consiste en región Fc de inmunoglobulina, albúmina, transferrina y PEG, y con preferencia es una región Fc de inmunoglobulina.

- 10 Cada uno del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada de la presente divulgación tiene insulina o péptido insulínico enlazado a la región Fc de inmunoglobulina a través de un enlazador no peptídico, que tiene durabilidad y estabilidad. En la presente divulgación el Fc de inmunoglobulina se puede utilizar de manera intercambiable con fragmento de inmunoglobulina.

- 15 Además, dado que la región Fc de inmunoglobulina tiene un peso molecular relativamente bajo en comparación con toda la molécula de inmunoglobulina, un uso de la misma puede ser beneficioso para la preparación y la purificación del conjugado, así como también para conseguir un alto rendimiento. Además, la región Fc de inmunoglobulina no contiene un fragmento Fab, que es altamente heterogéneo 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 tenga una mayor homogeneidad y sea menos antigénica.

- 20 De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "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, con exclusión de las regiones variables de cadena 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 de 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 que incluye la región constante de cadena pesada 1 (CH1) y/o la región constante de cadena ligera 1 (CL1), excepto para las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera, con la condición de que 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 CH2 y/o CH3. Es decir, la región Fc de inmunoglobulina puede comprender (1) un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4, (2) un dominio CH1 y un dominio CH2, (3) un dominio CH1 y un dominio CH3, (4) un dominio CH2 y un dominio CH3, (5) una combinación de uno o más dominios y una región de bisagra de inmunoglobulina (o una parte de la región de bisagra), y (6) un dímero de cada dominio de las regiones constantes de cadena pesada y la región constante de cadena ligera.

- 30 Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente divulgación incluye una secuencia de aminoácidos nativa y un derivado de secuencia (mutante) del mismo. Un derivado de secuencia de aminoácidos tiene una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos nativa debido a una supresión, una inserción, una sustitución no conservadora o conservadora o combinaciones de los mismos de uno o más residuos de aminoácidos. Por ejemplo, en una IgG Fc, residuos de aminoácidos conocidos por ser importantes en la unión, en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322, o 327 a 331, se puede utilizar como un destino adecuado para la modificación.

- 40 Además, otros varios derivados son posibles, que incluyen los derivados que tienen una supresión de una región capaz de formar un enlace disulfuro, la supresión de varios residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de una forma Fc nativa, o una adición de residuo de metionina al extremo N-terminal de una forma Fc nativa. Además, para eliminar las funciones efectoras, una supresión puede ocurrir en un sitio de unión del complemento, tal como un sitio de unión a C1q y un sitio de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por su sigla en inglés). Las técnicas de preparación de tales derivados de la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se describen en las Patentes WO 97/34631 y WO 96/32478.

- 45 Los intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos, que por lo general 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 ocurren con más frecuencia 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 y Asp/Gly, en ambas direcciones. La región Fc, si se desea, se puede modificar por medio de fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación y similares.

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

- 55 Además, estas regiones Fc se pueden obtener de formas nativas aisladas de seres humanos y otros animales que incluyen vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsters, ratas y conejillos de indias, o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos a partir de células animales transformadas o microorganismos. En la presente memoria, se pueden obtener a partir de una inmunoglobulina nativa por medio del aislamiento de las inmunoglobulinas enteras de organismos humanos o animales y tratarlos con una enzima proteolítica. La papaína digiere la

inmunoglobulina nativa en regiones Fab y Fc, y los resultados del tratamiento con pepsina en la producción de pF'c y F(ab)2. Estos fragmentos pueden ser sometidos, por ejemplo, a cromatografía de exclusión por tamaño para aislar Fc o pF'c. Con preferencia, una región Fc derivada de humanos es una región Fc de inmunoglobulina recombinante que se obtiene de un microorganismo.

- 5 Además, la región Fc de inmunoglobulina puede estar en la forma de tener cadenas de azúcar nativas, cadenas de azúcar incrementadas en comparación con una forma nativa o cadenas de azúcar disminuidas en comparación con la forma nativa, o pueden estar en una forma desglicosilada. El incremento, la disminución o la eliminación de las cadenas de azúcar de inmunoglobulina Fc se pueden lograr por procedimientos comunes en la técnica, tales como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático y un procedimiento de manipulación genética por el uso de un
- 10 microorganismo. La eliminación de las cadenas de azúcar de una región Fc da como resultado una fuerte disminución de la afinidad de unión al complemento (clq) y una disminución o pérdida en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo o la citotoxicidad dependiente del complemento, con lo que no induce respuestas inmunes innecesarios *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.
- 15 El término “desglicosilación”, de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, significa eliminar enzimáticamente fracciones de azúcar a partir de una región Fc, y el término “aglicosilación” significa que una región Fc se produce en una forma no glicosilada por una procariota, con preferencia *E. coli*.

Mientras tanto, la región Fc de inmunoglobulina se puede derivar de humanos o animales tales como vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsters, ratas, cobayos, y con preferencia humanos.

- 20 Además, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una región Fc que se deriva de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, o que se hace por medio de la combinación o híbrido de los mismos. Con preferencia, se deriva de IgG o IgM, que se encuentra entre las proteínas más abundantes en la sangre humana, y con mayor preferencia de IgG, que es conocida para mejorar la vida media de las proteínas de unión a ligando.

- 25 El término “combinación”, de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, significa que los polipéptidos que codifican regiones Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla del mismo origen se enlazan a un polipéptido de cadena sencilla de un origen diferente para formar un dímero o multímero. Es decir, un dímero o multímero se pueden formar a partir de dos o más fragmentos seleccionados del grupo que consiste en los fragmentos Fc de IgG, Fc de IgA, Fc de IgM, Fc de IgD y Fc de IgE.

- 30 El término “híbrido”, de acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, significa que las secuencias que codifican dos o más regiones Fc de inmunoglobulina de diferente origen están presentes en una región Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla. En la presente divulgación, son posibles varios tipos de híbridos. Es decir, los híbridos de dominio pueden estar compuestos por uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 y CH4 de Fc de IgG, Fc de IgM, Fc de IgA, Fc de IgE y Fc de IgD, y puede incluir la región de bisagra.

- 35 Por otro lado, la IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la presente divulgación incluye combinaciones o híbridos de los mismos. Los preferidos son las subclases IgG2 e IgG4, y la más preferida es la región Fc de IgG4 que rara vez tiene funciones efectoras tales como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por su sigla en inglés).

- 40 Como el vehículo de fármacos, la región Fc de inmunoglobulina más preferible es una región Fc no glicosilada derivada de IgG4 humana. La región Fc derivada de humanos es más preferible que una región Fc no derivada de humanos, que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y provocar respuestas inmunes indeseables tales como la producción de un nuevo anticuerpo contra el antígeno.

- 45 La formulación líquida de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada de la presente divulgación comprende una cantidad efectiva para uso terapéutico de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada. La concentración del conjugado de insulina de acción prolongada utilizado en la presente divulgación es de 0,1 mg/ml a 200 mg/ml, y con preferencia de 10 mg/ml a 200 mg/ml. La concentración de un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada utilizado en la presente divulgación es de 0,1 mg/ml a 200 mg/ml, y con preferencia de 0,5 mg/ml a 150 mg/ml. La formulación líquida del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada de la presente divulgación en una concentración elevada comprende
- 50 conjugado de insulina y conjugado de péptido insulínico a alta concentración por dosis, en comparación con la formulación líquida existente a baja concentración. De este modo, se puede proporcionar insulina de forma estable en el cuerpo, lo que permite la administración conjunta del conjugado de insulina y el conjugado de péptido insulínico a alta concentración y almacenarlos de forma estable sin precipitaciones, a diferencia de la formulación líquida existente.

- 55 De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “estabilizador” se refiere a una sustancia que permite el almacenamiento estable del conjugado de insulina de acción prolongada y péptido insulínico de acción prolongada. El término “estabilización” se refiere a que la pérdida de un componente activo es menor que una cierta cantidad, de manera típica menos de 10% durante cierto período y bajo una condición de almacenamiento específico. Una formulación se considera como formulación estable cuando la pureza residual de un conjugado de insulina de acción

- prolongada y péptido insulínico de acción prolongada en el mismo es de 90% o más, y con mayor preferencia de 92 a 95% después de haber sido almacenado 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 el conjugado de insulina de acción prolongada o el péptido insulínico de acción prolongada, la estabilidad de almacenamiento es importante para proporcionar una dosis precisa, así como también para suprimir la formación potencial de sustancias antigénicas contra el conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada. Durante el almacenamiento, 10% de pérdida de conjugado de insulina de acción prolongada o conjugado de péptido insulínico de acción prolongada es aceptable para una administración sustancial a menos que provoque la formación de agregados o fragmentos en la composición que conducen a la formación de compuestos antigénicos.
- El estabilizador de la presente divulgación con preferencia comprende un tampón, un alcohol de azúcar, un cloruro de sodio como agente isotónico, y un tensioactivo no iónico para estabilizar una combinación del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada, y además puede comprender metionina.
- El tampón funciona para mantener el pH de la solución para prevenir un cambio de pH agudo en la formulación líquida para la estabilización de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada. El tampón puede incluir una sal alcalina (fosfato de sodio o de potasio o hidrógeno o sales de dihidrógeno de los mismos), citrato de sodio/ácido cítrico, acetato de sodio/ácido acético, y cualquier tampón de pH aceptable para uso farmacéutico otro conocido en la técnica, y una combinación de los mismos. El ejemplo preferido de tal tampón incluye un tampón de citrato, tampón de acetato y tampón de fosfato. Entre ellos, se prefiere un tampón de acetato de sodio o citrato de sodio. La concentración de ácido acético que constituye un tampón de acetato de sodio con preferencia es de 5 mM a 100 mM, y con mayor preferencia de 5 mM a 50 mM de un volumen total de la solución. El pH del tampón con preferencia es de 4,0 a 8,0, con mayor preferencia de 5,0 a 7,0, e incluso con mayor preferencia de 5,0 a 6,5.
- El alcohol de azúcar actúa para incrementar la estabilidad de una combinación del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada. En la presente divulgación la concentración de alcohol de azúcar con preferencia es de 1 a 20% (p/v) de un volumen total de la formulación, y con mayor preferencia de 1 a 15% (p/v) de un volumen total de formulación. Los ejemplos del alcohol de azúcar incluyen manitol y sorbitol, y el ejemplo preferido es manitol.
- El agente isotónico tiene el efecto de mantener la presión osmótica adecuada cuando se está inyectando una combinación del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada en solución en el cuerpo. También, el agente isotónico tiene un efecto de estabilizar aún más la combinación en solución. El agente isotónico de manera típica es una sal inorgánica soluble en agua, que incluye cloruro de sodio, sulfato de sodio, citrato de sodio y con preferencia cloruro de sodio. El contenido de agente isotónico se puede ajustar de manera apropiada de acuerdo con el tipo y la cantidad de los componentes incluidos en la formulación de manera tal que una formulación líquida que comprende toda la mezcla puede ser una solución isotónica. La concentración de tal agente isotónico puede ser de 0,5 mg/ml a 30 mg/ml de un volumen total de la solución, pero no se limita a los mismos.
- El tensioactivo no iónico reduce la tensión superficial de la solución de proteína para prevenir la absorción o la agregación de las proteínas sobre una superficie hidrófoba. Los ejemplos del tensioactivo no iónico incluyen polisorbatos, poloxámeros y combinaciones de los mismos, con preferencia para polisorbatos. Entre los tensioactivos no iónicos de polisorbatos están polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y polisorbato 80. El tensioactivo no iónico más preferido es polisorbato 20.
- Es inapropiado utilizar un tensioactivo no iónico a alta concentración en la formulación líquida, y esto es debido al hecho de que un tensioactivo no iónico a alta concentración induce efectos de interferencia en la medición de la concentración de proteína y la determinación de la estabilidad de proteínas a través de procedimientos analíticos tales como los espectroscopia UV o enfoque isoelectrico, lo que provoca dificultades en el examen de la estabilidad de proteínas con precisión. Por lo tanto, la formulación líquida de la presente divulgación comprende el tensioactivo no iónico con preferencia a una baja concentración de menos de 0,2% (p/v), con mayor preferencia de 0,001% a 0,05% (p/v).
- Una metionina comprendida en el estabilizador de la presente divulgación tiene un efecto de estabilizar de manera adicional una proteína de destino por medio de la supresión de la formación de impurezas, que puede ocurrir debido a la oxidación de la proteína en solución. La concentración de metionina es de 0,005% a 0,1% (p/v) de un volumen total de la solución, y con preferencia de 0,01% a 0,1% (p/v) de un volumen total de la solución.
- De acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación, se demostró que cuando se añadió cloruro de sodio como agente isotónico en presencia de un tampón, alcohol de azúcar y el tensioactivo no iónico, la estabilidad de almacenamiento de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada se incrementó de manera significativa. Esto indica que el uso de cloruro de sodio como agente isotónico de manera simultánea con tampón, alcohol de azúcar y el tensioactivo no iónico induce efectos sinérgicos, lo cual de este modo proporciona una alta estabilidad a una combinación del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada.

- Se prefiere que el estabilizador de la presente divulgación no contenga albúmina. Dado que la albúmina de suero humano disponible como un estabilizador de la proteína se produce a partir de suero humano, siempre existe la posibilidad de que pueda estar contaminada con virus patógenos de origen humano. La gelatina o albúmina de suero bovino pueden provocar enfermedades o pueden ser aptos para inducir una respuesta alérgica en algunos pacientes. Al estar libre de proteínas heterólogas tales como albúminas de suero de origen humano o animal o gelatina purificada, el estabilizador no tiene ninguna posibilidad de provocar contaminación viral.
- Además, el estabilizador puede comprender además azúcares, polialcohol, o aminoácidos neutros. Los ejemplos preferibles de azúcares, que se pueden añadir de manera adicional para incrementar la estabilidad de almacenamiento de una combinación del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada, incluyen monosacáridos tales como manosa, glucosa, fucosa y xilosa, y polisacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa y dextrano. Los ejemplos preferidos de polialcohol incluyen propilenglicol, polietilenglicol de bajo peso molecular, glicerol, polipropilenglicol de bajo peso molecular, y una combinación de los mismos.
- La formulación líquida puede comprender, además, otras sustancias y materiales conocidos en la técnica de manera selectiva además del tampón descrito con anterioridad, agente isotónico, alcohol de azúcar, y tensioactivo no iónico, con la condición de que el efecto de la presente divulgación no se vea afectado.
- La formulación líquida libre de albúmina de la combinación a alta concentración de la presente divulgación que proporciona estabilidad a una combinación del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada no tiene un riesgo de contaminación viral, mientras que proporciona una excelente estabilidad de almacenamiento con una formulación simple, y por lo tanto la presente formulación se puede proporcionar de forma más rentable en comparación con otro estabilizador o formulación liofilizada.
- Además, dado que la formulación líquida comprende el conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada que tiene una duración mejorada de la actividad fisiológica en comparación con un péptido nativo, se puede utilizar como una formulación efectiva de fármacos por medio de la retención de la actividad de la proteína en el cuerpo durante un período más largo en comparación con una formulación de insulina y péptido insulínico convencional. Además, la presente formulación líquida proporciona una excelente estabilidad para el almacenamiento de una combinación de conjugado de insulina de acción prolongada y conjugado de péptido insulínico en una concentración elevada.
- Con preferencia, la formulación líquida puede comprender un conjugado de insulina de acción prolongada, en el que la insulina y el péptido insulínico están enlazados a un fragmento de inmunoglobulina a través de polietilenglicol; péptido insulínico de acción prolongada; y un estabilizador libre de albúmina, en el que el estabilizador comprende un tampón de acetato, manitol, polisorbato 20 y cloruro de sodio. Además, la formulación líquida puede comprender además metionina.
- Como otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de preparación de la formulación líquida de la presente divulgación.
- Una formulación líquida estable de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico se puede preparar a través de la generación de un conjugado de insulina y péptido insulínico de acción prolongada, y la mezcla del conjugado de insulina y péptido insulínico de acción prolongada generado con un estabilizador que comprende un tampón, alcohol de azúcar, tensioactivo no iónico y agente isotónico.
- Como otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición para la prevención o el tratamiento de la diabetes, que comprende el conjugado de insulina y el conjugado de péptido insulínico.
- La composición de la presente divulgación se caracteriza porque permite la administración conjunta del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada.
- Cuando el conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada se administran conjuntamente, el conjugado de insulina de acción prolongada actúa en un receptor de insulina y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada actúa en un receptor del péptido similar al glucagón-1 de manera simultánea. Por lo tanto, la administración conjunta de los dos conjugados puede reducir el nivel de glucosa en la sangre con más eficacia que demuestra cambios estables, en comparación con las administraciones separadas de los dos conjugados. Además, cuando los conjugados se administran conjuntamente, se reduce el riesgo de hipoglucemia, lo cual se puede demostrar en la administración de insulina sola, reduce el peso corporal, y también reduce la dosis total de insulina al comprender péptido insulínico. Además, una dosis de péptido insulínico tales como la exendina-4 se puede reducir, y por lo tanto la administración conjunta tiene las ventajas de reducir los efectos secundarios tales como náuseas y vómitos que se pueden ver cuando la exendina-4 se administra sola. El uso de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada puede incrementar la vida media y la durabilidad *in vivo* del fármaco de manera significativa, y por lo tanto es altamente beneficiosa para el tratamiento de la diabetes por medio de la reducción de la frecuencia de administración para un paciente crónico que necesita la administración cotidiana, lo cual de ese modo mejora la calidad de vida del paciente. Además, la composición farmacéutica tiene una excelente durabilidad *in vivo* y título, y el uso de los mismos puede reducir de

manera significativa la dosis por medio del empleo de un procedimiento de administración conjunta.

El conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada se puede administrar de manera simultánea, sucesiva, o en orden inverso. Además, se pueden administrar de manera simultánea como una combinación de los dos en una cantidad eficaz. Con preferencia, el conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada se pueden poner en un único recipiente y luego administrarse conjuntamente.

Además, la composición para la administración conjunta de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada de la presente divulgación puede estar en una forma de kit para el tratamiento de diabetes preparado en un único recipiente. Tal kit puede incluir un vehículo aceptable para uso farmacéutico y un manual de instrucciones para utilizar el kit.

Un ratón hiperglucémico inducido con estreptozotocina (STZ) se administró conjuntamente con el conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada, y se monitorearon los cambios en el nivel de glucosa en la sangre. Como resultado, cuando los conjugados se administran conjuntamente, los cambios en el nivel de glucosa en la sangre fueron más estables que cuando los conjugados se administraron por separado. En otro experimento, el ratón de modelo de diabetes tipo 2 se administró conjuntamente con el conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada una vez a la semana, y entonces se comparó la diferencia en el nivel de glucosa en la sangre en ayunas antes y después de la administración. Como resultado, la administración conjunta mostró mayor efecto en la regulación del nivel de glucosa en la sangre, en comparación con las administraciones separadas de los dos conjugados, y no se observó el incremento de peso después de la administración de insulina, lo que confirma que la administración conjunta puede reducir los efectos secundarios del incremento de peso debido a la insulina.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “diabetes” se refiere a una enfermedad metabólica, donde la secreción de insulina es deficiente o la insulina no puede funcionar de manera correcta. Por medio de la administración conjunta de la composición a un sujeto, la diabetes se puede tratar por medio de la regulación del nivel de glucosa en la sangre.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “prevención” se refiere a todas las acciones que impiden o retrasan la aparición de la diabetes por medio de la administración conjunta de la composición de la presente divulgación. El término “tratamiento” se refiere a todas las acciones que pueden aliviar o cambiar de manera beneficiosa los síntomas de la diabetes por medio de la administración conjunta de la composición de la presente divulgación. El tratamiento de la diabetes se puede aplicar a cualquier mamífero que puede desarrollar diabetes, y los ejemplos de tales mamíferos incluyen humanos y primates, así como también el ganado, tales como vacas, cerdos, ovejas, caballos, perros y gatos sin limitación, y con preferencia humanos.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “administración” se refiere a la introducción de la cantidad predeterminada de una sustancia en el paciente por un cierto procedimiento adecuado. Las composiciones se pueden administrar a través de cualquiera de las vías convencionales, con la condición de que sea capaz de llegar a un tejido de destino. Las vías de administración incluyen la administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero no se limitan a las mismas. Sin embargo, dado que los péptidos se digieren después de la administración oral, los componentes activos de una composición para la administración oral deben ser recubiertos o formulado para la protección contra la degradación en el estómago. Con preferencia, el conjugado se puede administrar en una forma inyectable. De manera adicional, las composiciones se pueden administrar por el uso de un cierto aparato capaz de transportar los componentes activos a una célula de destino.

Además, la composición farmacéutica se puede determinar por varios factores, que incluyen los tipos de enfermedades a tratar, las vías de administración, la edad, el género y el peso del paciente, y la gravedad de la enfermedad, así como también los tipos de componente activo en el fármaco.

Además, la composición farmacéutica puede comprender vehículos aceptables para uso farmacéutico. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término “vehículo aceptable para uso farmacéutico” se refiere a un vehículo o diluyente que no interrumpe la actividad fisiológica y las propiedades del compuesto administrado sin estimular un sujeto. Para la administración oral, el vehículo aceptable para uso farmacéutico 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 la formulación inyectable, el vehículo aceptable para uso farmacéutico puede incluir un agente de tamponamiento, un agente conservante, un analgésico, un solubilizante, un agente isotónico y un estabilizador. Para las formulaciones de administración tópica, el vehículo aceptable para uso farmacéutico puede incluir una base, un excipiente, un lubricante y un conservante. La composición farmacéutica se puede formular en diversas formas por medio de la adición de los vehículos aceptables para uso farmacéutico. Por ejemplo, para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular en comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para preparaciones inyectables, la composición farmacéutica se puede formular en ampollas de dosis única o un recipiente de múltiples dosis. La composición farmacéutica también se puede formular en soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas y formulación de liberación sostenida.

Como otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de prevención o el tratamiento de la diabetes, que comprende la administración de la composición que comprende el conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada a un sujeto que puede desarrollar diabetes o que ya tiene diabetes.

- 5 En el paso de administración, el conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada se puede administrar conjuntamente, en el que una cantidad eficaz adecuada de los conjugados se combinan y se administran de manera simultánea.

- 10 La composición de la presente divulgación que comprende tanto el conjugado de insulina de acción prolongada como el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada puede reducir efectivamente el nivel de glucosa en la sangre, incluso con la reducción de la frecuencia de administración, y no provoca efectos secundarios tales como incremento de peso, y por lo tanto se puede utilizar con eficacia para la prevención o el tratamiento de la diabetes.

Modo de invención

De aquí en adelante, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos, y la invención no pretende estar limitada por estos Ejemplos.

15 **Ejemplo 1: Evaluación de la estabilidad del conjugado de insulina de acción prolongada**

- 20 El conjugado de insulina de acción prolongada se desarrolló como una estrategia para el incremento de la vida media en suero del fármaco y la prevención de la hipoglucemia en el cuerpo. Por lo tanto, el conjugado de insulina, que es generado por la conjugación específica del sitio de una región Fc de inmunoglobulina, polímero no peptídico e insulina a través de un enlace covalente, ha incrementado notablemente la vida media en suero y reducido el riesgo de hipoglucemia.

Con el fin de evaluar la estabilidad de tal conjugado de insulina de acción prolongada, las formulaciones se prepararon en las composiciones de la Tabla 1 y se almacenaron a 40 °C durante 2 semanas, y la estabilidad del péptido en el mismo se analizó por medio de cromatografía de intercambio iónico (IE-HPLC, por su sigla en inglés).

- 25 En este momento, los principales factores que contribuyen a la estabilidad del péptido fueron puestos para ser un pH, tipo y concentración de tampón, 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 o ausencia de otros aditivos, y la adición conjunta de metionina y cloruro de sodio. La concentración de conjugado de insulina de acción prolongada en cada composición fue de 61,1 mg/ml, y estas formulaciones se utilizaron para el experimento.

- 30 IE-HPLC (%) de la Tabla 1 representa un valor de % de Área/% de Área de Inicio, lo que demuestra la pureza residual del conjugado de insulina de acción prolongada, en comparación con la pureza inicial.

Tabla 1

[Tabla 1]

Factores Principales		IE-HPLC (%)
pH	5,0 ~ 5,4	Precipitación de proteínas
	5,6	87,9
	6,0	88,1
	6,5	81,9
	7,0	70,4
Tipo de tampón	Acetato de sodio	91,5
	Citrato de sodio	90,5
	Fosfato de sodio	89,4
	Histidina	Precipitación de proteínas
Concentración de tampón	5 mM de Acetato de sodio	83,2
	10 mM de Acetato de sodio	83,6
	20 mM de Acetato de sodio	83,5
	40 mM de Acetato de sodio	83,4

(continuación)

Factores Principales		IE-HPLC (%)
Tipo de agente isotónico	Cloruro de sodio	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
	Poloxámero 188	83,0
Concentración de polisorbato 20	0,005%	88,4
	0,01%	88,5
	0,02%	88,9
Presencia de aditivo	Sin cloruro de zinc	77,9
	Con 20 µg/ml de cloruro de zinc	70,9
	Sin fenol	74,4
	Con 1,5 mg/ml de fenol	73,5
	Sin metionina	74,4
	Con 0,1 mg/ml de metionina	77,0

Tabla 2

[Tabla 2]

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

5

De acuerdo con lo mostrado en la Tabla 2, el conjugado de insulina de acción prolongada era más estable en la formulación líquida que comprende un tampón que consiste en acetato de sodio, un agente isotónico que consiste en cloruro de sodio, un alcohol de azúcar que consiste en manitol, y un agente tensioactivo que consiste en polisorbato 20, a un pH de 5,6 o 6,0.

10 **Ejemplo 2: Evaluación de la estabilidad del conjugado de péptido insulínico de acción prolongada**

Con el fin de confirmar la solubilidad un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada a varios pH y en función de la presencia de estabilizador, se prepararon diferentes formulaciones líquidas de conjugado de péptido insulínico de acción prolongada en las siguientes composiciones mostradas en la Tabla 3 y se almacenaron a 40 °C durante 1 semana. Entonces la estabilidad del conjugado se comparó por medio del control de la precipitación de proteínas a simple vista. En cada composición, la concentración del conjugado de péptido insulínico de acción prolongada fue de 10 mg/ml, y el experimento se llevó a cabo por el uso de estas formulaciones.

15

Tabla 3

[Tabla 3]

	pH	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
# 1	5,0	10 mM de Acetato de sodio	10 mg/ml de NaCl	10% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20

(continuación)

	pH	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
# 2	5,2	10 mM de Acetato de sodio	10 mg/ml de NaCl	10% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20
# 3	5,4	10 mM de Acetato de sodio	10 mg/ml de NaCl	10% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20
# 4	5,6	10 mM de Acetato de sodio	10 mg/ml de NaCl	10% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20
# 5	5,6	10 mM de Acetato de sodio	10 mg/ml de NaCl	5% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20
# 6	5,6	10 mM de Acetato de sodio	-	10% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20

La duración (en días) de la ausencia de precipitación de proteínas en la Figura 1 representa el tiempo durante el cual una precipitación de proteínas no se produjo después de almacenar la formulación a 40 °C. De acuerdo con lo mostrado con anterioridad, con acetato de sodio, pH de 5,0 a 5,4 (# 1, # 2 y # 3), o con 5% (p/v) de manitol (# 5), la precipitación de proteínas se produjo a 40 °C dentro de 4 días de almacenamiento. Sin embargo, cuando el pH fue de 5,6 y se añadió 10% (p/v) de manitol en la formulación, se incrementó la solubilidad, y la precipitación no se produjo durante 7 días (Figura 1).

Ejemplo 3: Evaluación de la estabilidad de una combinación de conjugado de insulina de acción prolongada y conjugado de péptido insulínico de acción prolongada

En base a formulación líquida individual, se comparó la estabilidad de una combinación de conjugado de insulina de acción prolongada y conjugado de péptido insulínico de acción prolongada. Además, se determinó cómo afecta la adición de cloruro de sodio y metionina, que son importantes para la estabilización del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada, respectivamente, a la estabilidad de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada.

Las formulaciones líquidas de conjugado de insulina de acción prolongada, conjugado de péptido insulínico de acción prolongada, o una combinación de los dos se han preparado en las siguientes composiciones mostradas en la Tabla 4 y se almacenaron a 40 °C durante 4 semanas. Entonces se llevó a cabo la prueba de estabilidad en la formulación de la combinación de dos conjugados en comparación con la de conjugado individual a través del monitoreo de la precipitación de proteínas y por el uso de cromatografía de intercambio iónico (IE-HPLC), cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC, por su sigla en inglés) y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC, por su sigla en inglés).

La concentración de un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada (control-1, # 1 a # 4) y un conjugado de insulina de acción prolongada (control-2, # 1 a # 4) en cada formulación líquida fue de 10 mg/ml y 61,1 mg/ml respectivamente.

Tabla 4

[Tabla 4]

	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo	Otros
Control-1 (conjugado de péptido insulínico de acción prolongada en sí mismo)	20 mM de citrato de sodio (pH de 5,6)	-	10% de Manitol	0,005% de Polisorbato 20	0,01% de Metionina
Control-2 (conjugado de insulina de acción prolongada en sí mismo)	10 mM de acetato de sodio (pH de 6,0)	10 mg/ml de NaCl	10% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20	-
# 1	20 mM de citrato de sodio (pH de 5,6)	-	10% de Manitol	0,005% de Polisorbato 20	0,01% de Metionina
# 2	20 mM de citrato de sodio (pH de 5,6)	10 mg/ml de NaCl	10% de Manitol	0,005% de Polisorbato 20	0,01% de Metionina
# 3	10 mM de acetato de sodio (pH de 6,0)	10 mg/ml de NaCl	10% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20	-
# 4	10 mM de acetato de sodio (pH de 6,0)	10 mg/ml de NaCl	10% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20	0,01% de Metionina

En la Figura 2 a 3, el análisis de IE-HPLC y RP-HPLC mostró el valor de % de área / % de área de inicio, por medio de la representación de la pureza residual del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada en comparación con la pureza inicial. Entre ellos, la Figura 2 muestra los resultados de los análisis de IE-HPLC y RP-HPLC para el conjugado de insulina de acción prolongada, mientras que la Figura 3 muestra los resultados de los análisis de IE-HPLC y RP-HPLC para el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada.

De acuerdo con lo mostrado con anterioridad, cuando se comparó la estabilidad de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada con la de un conjugado de insulina de acción prolongada o un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada, se encontró que el conjugado de insulina de acción prolongada tenía pureza y estabilidad similares en formulaciones combinadas (formulaciones # 3 y # 4) y en formulaciones separadas (Figura 2).

Sin embargo, cuando se incluyó 0,01% (p/v) de metionina en la formulación líquida que comprende 10 mM de acetato de sodio, pH de 6,0, 10 mg/ml de cloruro de sodio, 10% (p/v) de manitol y 0,02% (p/v) de polisorbato 20 (es decir, la formulación # 4), la estabilidad del conjugado de péptido insulínico de acción prolongada se mejoró en comparación con cuando se encontraba en la formulación que carecía de metionina (Figura 3). Esto podría ser debido al hecho de que la metionina actúa para prevenir la oxidación del conjugado de péptido insulínico de acción prolongada. La comparación con la formulación separada un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada no se pudo llevar a cabo debido a la cantidad excesiva de precipitación.

De acuerdo con lo mostrado en la Figura 4, la formulación separada un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada tenía precipitación de proteínas dentro de 2 semanas, mientras que la formulación de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada (formulaciones # 3 y # 4) tenía solubilidad incrementada y la precipitación en el mismo fue suprimida durante un período relativamente más largo de hasta 4 semanas.

Estos resultados apoyan que la composición de la formulación líquida puede mantener una alta estabilidad de una combinación de conjugado de péptido insulínico y el conjugado de insulina en una concentración elevada.

Ejemplo 4: Evaluación de la estabilidad de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada en función de las concentraciones de agente isotónico y alcohol de azúcar

La estabilidad de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada se comparó entre la combinación de los conjugados en una formulación líquida que comprende de 4,8 a 6,7 mg/ml de cloruro de sodio como agente isotónico, de 1 a 2% (p/v) de manitol como alcohol de azúcar y el manitol y la combinación en la formulación líquida confirmada en el Ejemplo 2 (10 mM de acetato de sodio, pH de 6,0, 10 mg/ml de cloruro de sodio, 10% (p/v) de manitol, 0,02% (p/v) de polisorbato 20, 0,01% (p/v) de metionina).

La formulación líquida de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada se preparó en las siguientes composiciones mostradas en la Tabla 5 y se almacenó a 25 °C durante 4 semanas. A continuación, la estabilidad de los conjugados se examinó por medio de IE-HPLC, SE-HPLC y RP-HPLC.

IE-HPLC (%) y RP-HPLC (%) de las Tablas 6 y 7 representan el valor de % de área / % de área de inicio, lo que demuestra la pureza residual de una combinación de un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada, en comparación con la pureza inicial. Entre ellos, la Tabla 6 demuestra los resultados de los análisis de IE-HPLC y RP-HPLC en el conjugado de insulina de acción prolongada, mientras que la Tabla 7 muestra los resultados de los análisis de IE-HPLC y RP-HPLC en el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada.

Tabla 5

[Tabla 5]

	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo	Otros
Control	10 mM de acetato de sodio (pH de 6,0)	10 mg/ml de NaCl	10% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20	0,01% de Metionina
# 1	10 mM de acetato de sodio (pH de 6,0)	4,8 mg/ml de NaCl	1% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20	0,01% de Metionina
# 2	10 mM de acetato de sodio (pH de 6,0)	4,8 mg/ml de NaCl	2% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20	0,01% de Metionina

(continuación)

	Tampón	Agente isotónico	Alcohol de azúcar	Tensioactivo	Otros
# 3	10 mM de acetato de sodio (pH de 6,0)	6,7 mg/ml de NaCl	1% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20	0,01% de Metionina
# 4	10 mM de acetato de sodio (pH de 6,0)	6,7 mg/ml de NaCl	2% de Manitol	0,02% de Polisorbato 20	0,01% de Metionina

Tabla 6

[Tabla 6]

	IE-HPLC (%)					RP-HPLC (%)				
	inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas	inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Control	100	98,20	95,50	94,78	94,05	100	100	99,63	99,40	99,17
# 1	100	98,21	96,84	95,26	94,68	100	99,92	99,32	99,20	99,07
# 2	100	98,18	96,80	95,18	93,56	100	99,99	98,86	98,81	98,75
# 3	100	96,85	94,70	93,62	93,53	100	99,93	99,44	99,30	99,15
# 4	100	97,74	95,78	95,28	94,8	100	99,88	99,33	99,19	99,06

5

Tabla 7

[Tabla 7]

	IE-HPLC (%)					RP-HPLC (%)				
	inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas	inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Control	100	96,32	92,53	88,61	84,69	100	94,93	94,16	89,68	85,19
# 1	100	96,48	92,61	89,83	85,78	100	94,95	92,37	88,71	85,05
# 2	100	97,20	93,40	90,34	87,78	100	95,29	94,19	90,01	87,43
# 3	100	96,86	93,61	91,15	87,61	100	95,82	95,17	90,12	88,06
# 4	100	97,02	93,95	91,41	87,94	100	94,93	93,85	90,02	87,70

10 De acuerdo con lo mostrado con anterioridad, cuando la concentración de cloruro de sodio se redujo a 4,8 mg/ml y la concentración de manitol se redujo a 1 a 2% (p/v) (formulaciones # 1 y # 2) y cuando la concentración de cloruro de sodio se redujo a 6,7 mg/ml y la concentración de manitol se redujo a 1 a 2% (p/v) (formulaciones # 3 y # 4) en comparación con la formulación líquida confirmada en el Ejemplo 3 (10 mM de acetato de sodio, pH de 6,0, 10 mg/ml de cloruro de sodio, 10% (p/v) de manitol, 0,02% (p/v) de polisorbato 20, 0,01% (p/v) de metionina), las cuatro formulaciones ensayadas mostraron una alta estabilidad similar a la formulación líquida confirmada en el Ejemplo 3.

15 Estos resultados apoyan que si la composición de la formulación líquida comprende cloruro de sodio como agente isotónico y manitol como alcohol de azúcar, incluso cuando la concentración de cloruro de sodio como agente isotónico y la de manitol como alcohol de azúcar se baja, puede proporcionar el mismo grado de estabilidad a una combinación del conjugado de insulina y el conjugado de péptido insulínico.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Una formulación líquida de insulina y péptido insulínico de acción prolongada

<130> OPA13096/PCT

<150> KR10-2012-0081478

<151> 2012-07-25

ES 2 743 918 T3

<160> 5
 <170> KopatentIn 2,0
 <210> 1
 <211> 21
 5 <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
 <210> 2
 10 <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
 15 <210> 3
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> GLP-1 (7-37)
 <400> 3
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30
 <210> 4
 <211> 39
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> exendina-3
 <400> 4

ES 2 743 918 T3

His	Ser	Asp	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Met	Glu	Glu
1				5					10					15	
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		
Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser									
			35												

<210> 5

<211> 39

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> exendina-4

<400> 5

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Met	Glu	Glu
1				5					10					15	
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		
Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser									
			35												

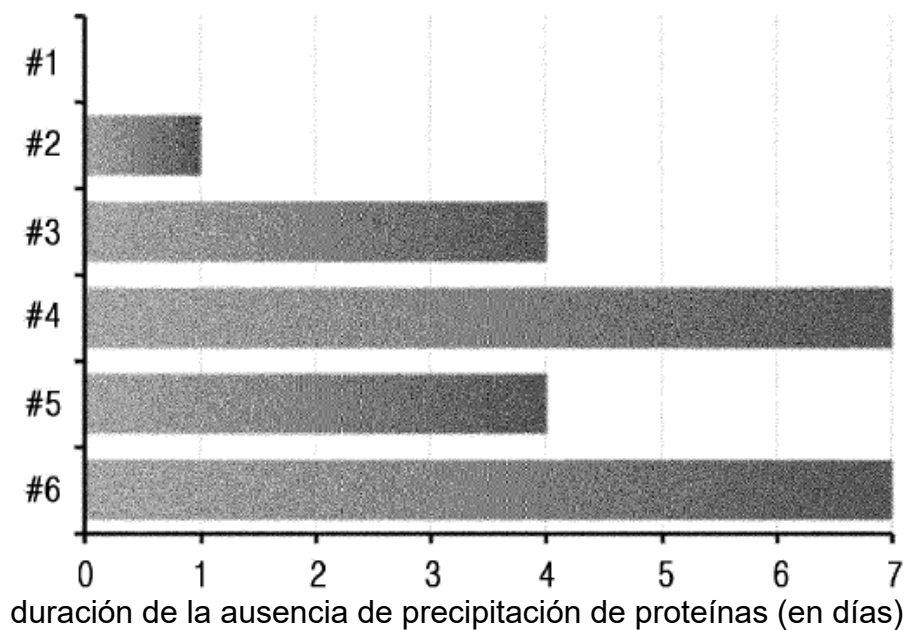
10

REIVINDICACIONES

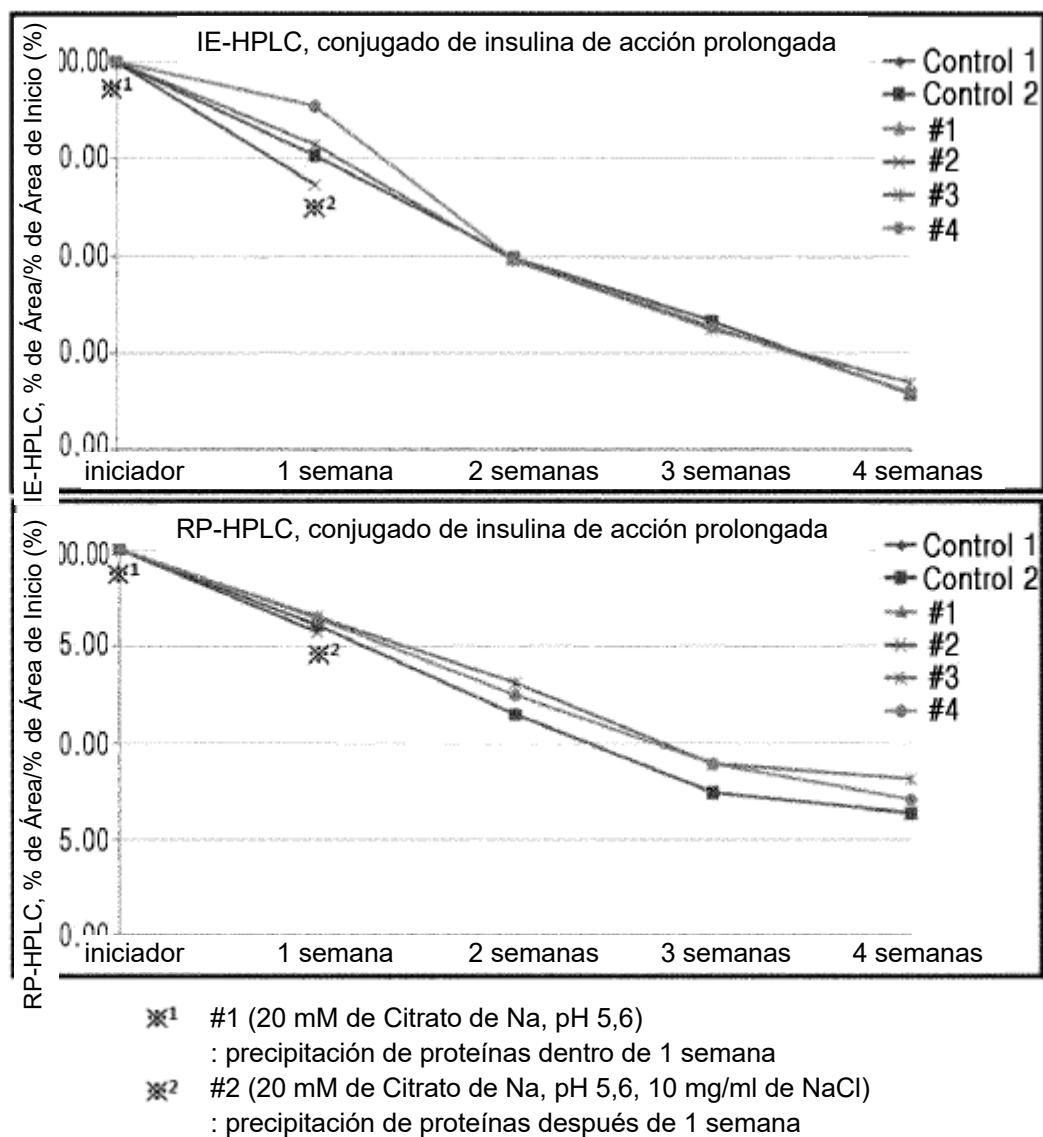
1. Una formulación líquida de una combinación de conjugado de insulina de acción prolongada y conjugado de péptido insulínico de acción prolongada, que comprende:
 - 5 un conjugado de insulina de acción prolongada en el que la insulina está enlazada a la región Fc de inmunoglobulina,
 - un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada en el que el péptido insulínico está enlazado a la región Fc de inmunoglobulina, y
 - un estabilizador libre de albúmina, en el que el estabilizador comprende un tampón de intervalo de pH de 5,0 a 7,0, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y un agente isotónico;
- 10 en la que el péptido insulínico es un péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), péptido similar al glucagón 2 (GLP-2), exendina-3, o exendina-4, o un derivado estructural de los mismos.
2. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la insulina tiene la misma secuencia de aminoácidos que la insulina nativa.
3. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la insulina es un derivado de insulina generado por medio de sustitución, supresión o inserción de aminoácidos de la insulina nativa, o un agonista de péptido que tiene una actividad similar a la insulina nativa.
- 15 4. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el derivado de péptido insulínico es GLP-1, GLP-2, exendina-3, o exendina-4 con:
 - supresión del grupo amina N-terminal;
 - 20 sustitución del grupo amina con un grupo hidroxilo;
 - modificación del grupo amina con dos grupos metilo;
 - sustitución del grupo amina N-terminal con un grupo carboxilo; o
 - supresión de alfa-carbono del residuo de histidina N-terminal.
5. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el péptido insulínico es una exendina-4 de imidazoacetilo.
6. La formulación líquida 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.
7. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la región Fc de inmunoglobulina es un híbrido de dominios que tienen diferentes orígenes derivados de inmunoglobulinas seleccionados del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.
- 30 8. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la región Fc de inmunoglobulina es un dímero o multímero compuesto por inmunoglobulinas de cadena sencilla que consiste en dominios que tienen un mismo origen.
9. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la región Fc de inmunoglobulina es la región Fc de IgG4.
- 35 10. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4 humana aglicosilada.
11. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el conjugado está enlazado por el uso de un polímero no peptídico o una técnica de recombinación.
12. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el polímero no peptídico es un polietilenglicol.
- 40 13. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el polímero no peptídico se selecciona del grupo que consiste en un polímero biodegradable tal como un polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol y propilenglicol, un poliol polioxi-etilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico-glicólico (PLGA); un polímero de lípidos; quitinas; un ácido hialurónico; y una combinación de los mismos.
- 45 14. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración del conjugado de insulina de acción prolongada en una cantidad efectiva para uso farmacéutico es de 10 mg/ml a 200 mg/ml, y la concentración de conjugado de péptido insulínico de acción prolongada es de 0,5 mg/ml a 150 mg/ml.

15. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el alcohol de azúcar es uno o más seleccionado del grupo que consiste en manitol y sorbitol.
16. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la concentración del alcohol de azúcar es de 1% (p/v) a 15% (p/v) en base a un volumen total de formulación.
- 5 17. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tampón es tampón de citrato, tampón de acetato, o tampón de fosfato.
18. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración del tampón es de 5 a 50 mM en base a un volumen total de formulación.
19. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el intervalo de pH del tampón es de 5 a 6,5.
- 10 20. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente isotónico se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio, sulfato de sodio y citrato de sodio.
21. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración del agente isotónico es de 0,5 mg/ml a 30 mg/ml.
- 15 22. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tensioactivo no iónico es polisorbato o poloxámero.
23. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 22, en la que la concentración del tensioactivo no iónico es de 0,001% (p/v) a 0,05% (p/v).
24. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizador además comprende metionina.
- 20 25. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 24, en la que la concentración de la metionina es de 0,005% (p/v) a 0,1% (p/v) en base a un volumen total de formulación.
26. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizador además comprende una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en azúcares, polialcohol y aminoácidos.
- 25 27. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un conjugado de insulina de acción prolongada y un conjugado de péptido insulínico de acción prolongada, en la que cada uno de la insulina y el péptido insulínico está unido a una región Fc de inmunoglobulina a través de polietilenglicol, y un estabilizador libre de albúmina, en la que el estabilizador comprende un tampón de acetato, manitol, polisorbato 20 y cloruro de sodio.
28. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 27, que además comprende metionina.
- 30 29. Un procedimiento de preparación de la formulación líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, que comprende la mezcla del conjugado de insulina de acción prolongada y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada con un estabilizador libre de albúmina que comprende un tampón de intervalo de pH de 5,0 a 7,0, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y un agente isotónico,
- en el que el conjugado de insulina de acción prolongada es un conjugado en el que la insulina está enlazada a la región Fc de inmunoglobulina, y el conjugado de péptido insulínico de acción prolongada es un conjugado en el que el péptido insulínico está enlazado a la región Fc de inmunoglobulina.

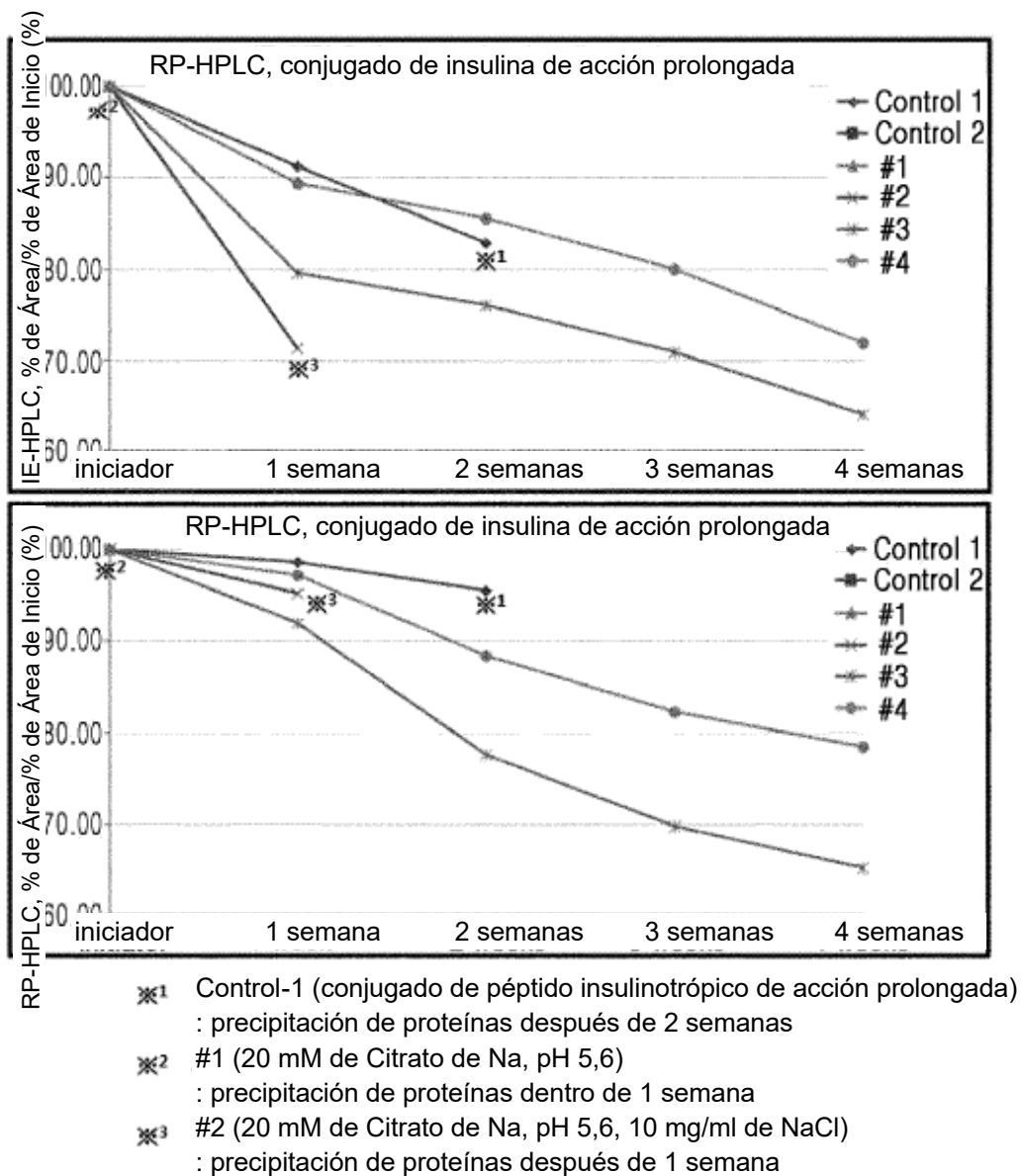
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

