

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 718**

51 Int. Cl.:

C07K 17/10 (2006.01)

C07K 17/08 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2012 PCT/KR2012/009186**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13066106**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012 E 12845690 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.09.2021 EP 2773672**

54 Título: **Método para preparar un complejo polipeptídico fisiológicamente activo**

30 Prioridad:

04.11.2011 KR 20110114828

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

08.03.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIM, DAE JIN;
JANG, MYUNG HYUN;
KIM, SEUNG SU;
LEE, JONG SOO;
CHOI, JAE HYUK y
KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

Observaciones:

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

ES 2 898 718 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

Método para preparar un complejo polipeptídico fisiológicamente activo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para preparar un conjugado de insulina y un polímero no peptídico mediante la unión de la insulina con el polímero no peptídico a través de un enlace covalente mediante el uso de un solvente orgánico, y para preparar un complejo polipeptídico fisiológicamente activo mediante la unión del conjugado con un portador para mejorar la duración y la estabilidad de la insulina *in vivo*.

Antecedentes de la técnica

En general, los polipéptidos fisiológicamente activos son fáciles de desnaturar debido a su baja estabilidad y se descomponen por una proteína hidrolasa para eliminarlos fácilmente a través del riñón o el hígado. Por lo tanto, para mantener la concentración en sangre y la potencia de los medicamentos proteicos que comprenden un polipéptido fisiológicamente activo como ingrediente farmacológico activo, es necesario administrar frecuentemente el medicamento proteico a los pacientes. Sin embargo, en el caso de medicamentos proteicos administrados a pacientes principalmente en forma de una formulación inyectable, las inyecciones frecuentes para mantener la concentración sanguínea de los polipéptidos activos pueden causar un sufrimiento excesivo en los pacientes. Para resolver tales problemas, se realiza un esfuerzo constante para maximizar la eficacia farmacológica y aumentar la estabilidad sanguínea de los fármacos proteicos y de esta manera mantener la concentración en sangre del fármaco durante más tiempo. Este desarrollo sostenido de formulaciones es necesario para aumentar la estabilidad de los fármacos proteicos y, al mismo tiempo, mantener la potencia de los fármacos en sí mismos a un nivel suficientemente alto, y también para no provocar una reacción inmunitaria en los pacientes,

En el estado de la técnica, para estabilizar proteínas e inhibir el contacto con la proteína hidrolasa y la pérdida a través del riñón, se utiliza un método para añadir químicamente polímeros que tienen una alta solubilidad, como el polietilenglicol (en lo sucesivo referido como PEG), a la superficie de fármacos proteicos. Se sabe que los PEG son efectivos para estabilizar proteínas y prevenir la hidrólisis de proteínas al unirse de manera no específica a un sitio específico o a varios sitios de la proteína diana para aumentar la solubilidad de la proteína y no causar ningún efecto secundario adverso. (Sada y col., J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139, 1991). Sin embargo, aunque tal unión del PEG puede aumentar la estabilidad de la proteína, tiene como consecuencia que la potencia del polipéptido fisiológicamente activo se reduce significativamente y que la reactividad del PEG con proteínas se reduce simultáneamente con el aumento del peso molecular del PEG y reduce el rendimiento de la unión. Por tanto, los presentes inventores proporcionan el conjugado formado mediante la unión de un polipéptido fisiológicamente activo y un portador con un polímero no peptídico. Sin embargo, ha aumentado la demanda de un método para preparar el conjugado con alto rendimiento y pureza, y el método anterior para conjugar por primera vez un portador con un polímero no peptídico tiene la desventaja de que incurre en un gran gasto.

Mientras tanto, la insulina es un polipéptido secretado por las células beta del páncreas humano y juega un papel muy importante en el control del nivel de glucosa en sangre en el cuerpo. En los casos en los que la insulina no se secreta correctamente o la insulina secretada no actúa correctamente en el cuerpo, la glucosa en sangre en el cuerpo no se puede controlar y aumenta, lo cual provoca el estado conocido como diabetes. El caso mencionado anteriormente se denomina diabetes mellitus tipo 2, y el caso en donde el páncreas no secreta insulina para aumentar la glucosa en sangre se denomina diabetes mellitus tipo 1.

La diabetes mellitus tipo 2 se trata con un agente hipoglucemiante oral que comprende un material químico como componente principal, y en ciertos pacientes también se trata con insulina. Por otro lado, el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 requiere necesariamente la administración de insulina.

La terapia con insulina, tan ampliamente utilizada en la actualidad, es un método para administrar insulina mediante inyección antes y después de las comidas. Sin embargo, tal terapia con insulina requiere que se administre constantemente tres veces al día y, por lo tanto, causa mucho sufrimiento e inconvenientes. Para superar estos problemas, se realizan varios intentos. Uno de estos intentos es el de administrar fármacos peptídicos al cuerpo mediante inhalación a través de las cavidades orales o nasales, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana biológica hacia los fármacos peptídicos. Sin embargo, tal método tiene una eficiencia de administración en el cuerpo significativamente menor en comparación con la inyección y, por lo tanto, todavía existen muchas dificultades para mantener la actividad *in vivo* de los fármacos peptídicos en las condiciones requeridas.

Además, se ensayó un método para retrasar la absorción después de la administración subcutánea de fármacos en exceso. De acuerdo con esto, se presentó un método para mantener la concentración de fármaco en sangre mediante una sola administración diaria. Algunos se aprobaron como medicamentos (por ejemplo, Lantus, Sanofi-aventis) y se administran a pacientes en la actualidad. El estudio para modificar la insulina con ácidos grasos, para de este modo fortalecer la unión del polímero de insulina y prolongar la duración mediante la unión a la albúmina presente en el lugar de administración y en la sangre, ha progresado, y los medicamentos producidos con dicho

método están aprobados como medicamentos (Levemir, NovoNordisk). Sin embargo, tales métodos tienen el efecto secundario de causar dolor en el lugar de la administración y, además, el intervalo de administración de una única inyección diaria todavía supone una carga significativa para los pacientes.

5 Además, se realiza un esfuerzo continuo para maximizar el efecto de los fármacos peptídicos al aumentar la estabilidad en la sangre y mantener la concentración de fármaco en sangre a un nivel alto durante períodos prolongados después de la absorción de los fármacos peptídicos en el cuerpo. Se requiere tal desarrollo sostenido de formulaciones de péptidos para aumentar la estabilidad de los fármacos peptídicos y al mismo tiempo mantener la potencia de los fármacos en sí mismos a un nivel suficientemente alto, y también para no inducir una reacción inmunitaria en los pacientes. Tales formulaciones de fármacos peptídicos se producen mediante un método para
10 añadir químicamente material polimérico que tiene una alta solubilidad, tal como el polietilenglicol (PEG), a la superficie de los péptidos.

Los PEG son eficaces para inhibir la pérdida del péptido a través de los riñones y prevenir la hidrólisis, mediante la
15 unión no específica a un sitio específico o a varios sitios del péptido diana para aumentar el peso molecular del péptido y, además, no causan ningún efecto secundario adverso. Por ejemplo, la patente WO 2006/076471 describe que los péptidos natriuréticos de tipo B (BNP), que reducen la presión arterial al activar la producción de GMPc al unirse a NPR-A y, por lo tanto, se utilizan como agente para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva, se conjugan con PEG para mantener la actividad biológica de tales péptidos. La patente US 6,924,264 describe un método para
20 aumentar la duración *in vivo* mediante la conjugación del residuo de lisina de la Exendina-4 con PEG. Tales métodos pueden extender la duración *in vivo* de los fármacos peptídicos al aumentar el peso molecular del PEG, sin embargo, tienen el problema de que la potencia de los péptidos se reduce significativamente y la reactividad del PEG con los péptidos se reduce, lo que provoca una disminución del rendimiento a medida que aumenta el peso molecular.

25 La patente WO 02/46227 describe la fusión de proteína de GLP-1 y Exendina-4 o análogos de los mismos con albúmina de suero humano o un fragmento de inmunoglobulina (Fc) mediante tecnología genética recombinante, y la patente US 6,756,480 describe la fusión de proteína de la hormona paratiroidea (PTH) o sus análogos con Fc. Los métodos allí descritos pueden superar los problemas del bajo rendimiento de la pegilación y la no especificidad, pero
30 tienen problemas porque el aumento de la vida media en sangre no es notablemente alto, contrariamente a lo esperado y, en algunos casos, poseen títulos bajos. Para maximizar el efecto de aumentar la vida media en sangre, también se pueden usar varios tipos de enlazadores peptídicos, pero estos pueden inducir una reacción inmunológica. Además, existen problemas porque, en los casos en que se utilizan péptidos que tienen enlaces disulfuro, tales como el BNP, la aplicación es difícil debido a la alta probabilidad del plegado incorrecto, y en los
35 casos en que están presentes residuos de aminoácidos no nativos, la producción es imposible en la forma de un recombinante genético.

La patente WO2010/107256 describe un método para preparar un conjugado polipeptídico fisiológicamente activo específico de sitio mediante el tratamiento de un polipéptido fisiológicamente activo con un polímero no peptídico en
40 presencia de un alcohol a un pH específico, que se puede emplear en el desarrollo de formulaciones de acción prolongada de varios fármacos peptídicos, con actividad *in vivo* y una vida media en sangre prolongada.

Descripción de la invención

45 La invención proporciona un método para preparar un conjugado de insulina y un polímero no peptídico, que comprende:

- 50 (1) hacer reaccionar insulina, que tiene dos extremos N-terminal, con un polímero no peptídico en una solución de reacción que comprende un solvente orgánico para unir dicha insulina con dicho polímero no peptídico, en donde el polímero no peptídico tiene grupos aldehído reactivos en ambos extremos; y
(2) aislar y purificar el conjugado de insulina unida covalentemente a un polímero no peptídico de la mezcla de reacción de la etapa (1);

en donde

55 la solución de reacción comprende el solvente orgánico en una cantidad de 30 a 55 % en volumen basado en el volumen total de la solución de reacción;
la solución de reacción tiene un pH de 4,5 a 6,5;
el solvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en isopropanol, etanol y metanol;
60 el polímero no peptídico se une al N-terminal de la cadena beta de la insulina; y
la insulina es

- a) insulina nativa, o
65 b) un derivado que se prepara mediante cualquiera de sustitución, adición, delección, modificación o combinaciones de los mismos, en uno o más aminoácidos de la insulina nativa, que tiene (i) una homología de secuencia de aminoácidos de al menos 80 % en comparación con la insulina nativa que

tiene la secuencia de la cadena alfa de SEQ ID NO. 1 y la secuencia de la cadena beta de SEQ ID NO. 2, y (ii) la función de controlar el azúcar en sangre en el cuerpo, o
 c) un fragmento de insulina en donde (i) se añaden o eliminan uno o más aminoácidos de los terminales amino o carboxi de la insulina, y (ii) el fragmento de insulina retiene la función de controlar el azúcar en sangre en el cuerpo.

En algunas modalidades, el solvente orgánico es isopropanol.

En algunas modalidades, la solución de reacción comprende el solvente orgánico en una cantidad de 45 a 55 % en volumen, basado en el volumen total de la solución de reacción.

En algunas modalidades, el polímero no peptídico se une al grupo amina o al grupo tiol de la insulina o del derivado de insulina.

El polímero no peptídico puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímero de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, polivinililéter, polímero biodegradable, polímero lipídico, quitina, ácido hialurónico y la combinación de los mismos. En algunas modalidades, el grupo aldehído se selecciona del grupo que consiste en un grupo propionaldehído y un grupo butiraldehído.

En algunas modalidades, el aislamiento y la purificación se logran mediante cromatografía de intercambio iónico.

La invención proporciona además un método para preparar un complejo de insulina, que comprende:

- (1) preparar el conjugado de insulina y polímero no peptídico como se describió; y
- (2) unir covalentemente un portador seleccionado del grupo que consiste en: región Fc de inmunoglobulina, anticuerpo, albúmina o transferrina, con un polímero no peptídico del conjugado para producir un complejo de insulina en donde los extremos de dicho polímero no peptídico se unen a la insulina y al portador, respectivamente.

En algunas modalidades, la región Fc de inmunoglobulina está compuesta de 1 a 4 dominios seleccionados del grupo que consiste en dominios CH1, CH2, CH3 y CH4.

En algunas modalidades, la región Fc de inmunoglobulina comprende además una región de bisagra.

En algunas modalidades, la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc derivada de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.

En algunas modalidades, la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4.

En algunas modalidades, la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4 aglicosilada humana.

Efectos ventajosos de la invención

Con el método de la presente invención se puede preparar el conjugado de insulina y el polímero no peptídico con alta pureza y rendimiento, y gracias a esto, el complejo de insulina preparado puede proporcionar una reducción posterior en los costos de producción y una extensión de la actividad *in vivo* a un nivel relativamente alto y un aumento significativo de la vida media en sangre, y por lo tanto, puede usarse eficazmente para el desarrollo de formulaciones de insulina de liberación sostenida que pueden aumentar la capacidad de un paciente para la administración del fármaco.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el resultado del análisis para identificar la modificación del conjugado insulina-PEG en la cadena beta mediante SEC HPLC. A: condiciones de reducción de insulina, B: condiciones de reducción de PEG-insulina.

La Figura 2 muestra el resultado del análisis para identificar la modificación del conjugado insulina-PEG en la fenilalanina nº 1 (B1F) de la cadena beta en un 95 % o más, mediante mapeo de péptidos. A: resultado del mapeo de péptidos de insulina, B: resultado del mapeo de péptidos de insulina-PEG, C: secuencia de PEG-insulina y sitios de escisión estimados en el mapeo de péptidos (línea roja).

La Figura 3 muestra los resultados del análisis RP-HPLC, SE-HPLC para el conjugado de insulina-PEG en las condiciones respectivas de las soluciones tampón. La flecha de línea continua representa picos de insulina monopegilada y la flecha de línea punteada representa picos de impurezas pegiladas en forma de puente. Las condiciones respectivas de las soluciones tampón son las siguientes.

A: (a) solución tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 6,0); (b) solución tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 6,0), isopropanol al 30 %; (c) solución tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 6,0), isopropanol al 45 %; (d) solución tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 6,0), isopropanol al 55 %;

B: (a) solución tampón de citrato de sodio 50 mM (pH 6,0), isopropanol al 45 %; (b) solución tampón de citrato de sodio 50 mM (pH 6,0), isopropanol al 55 %;

C: (a) solución tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 4,0); (b) solución tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 4,0) isopropanol al 10 %; (c) solución tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 4,0), isopropanol al 20 %; (d) solución tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 4,0), isopropanol al 30 %; (e) solución tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 4,0), isopropanol al 40 %; (f) solución tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 4,0), isopropanol al 45 %; (g) solución tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 4,0), isopropanol al 50 %.

La Figura 4 muestra los resultados del análisis RP HPLC (A) y el análisis SE HPLC (B) para el complejo de insulina-PEG-inmunoglobulina Fc.

La Figura 5 muestra los resultados del análisis SDS PAGE para el complejo de insulina-PEG-inmunoglobulina Fc. M: marcador de tamaño, 1: condiciones de reducción del complejo insulina-PEG-inmunoglobulina Fc, 2: condiciones de no reducción del complejo insulina-PEG-inmunoglobulina Fc.

La Figura 6 muestra los resultados de una prueba farmacocinética para identificar la duración *in vivo* del complejo insulina-PEG-inmunoglobulina Fc. iv: administración intravenosa, sc: administración subcutánea.

La Figura 7 muestra los resultados de la prueba de potencia *in vivo* para el complejo de insulina-PEG-inmunoglobulina Fc.

Descripción detallada de la invención

El solvente orgánico utilizado en la presente invención es isopropanol, etanol o metanol.

Los solventes orgánicos están contenidos en la solución de reacción en una cantidad de 30 a 55 %, y con mayor preferencia en una cantidad de 45 a 55 % en volumen, sobre la base del volumen total de la solución de reacción. Además, el pH de la solución de reacción es de 4,5 a 6,5. En este caso, aunque los polipéptidos fisiológicamente activos generalmente muestran una tendencia a disminuir la solubilidad en la solución de reacción que tiene un pH ácido débil, el uso del solvente orgánico de acuerdo con la presente invención tiene la ventaja de que dicho problema de solubilidad puede resolverse para progresar suavemente la reacción.

En una modalidad de la presente invención, para conjugar PEG selectivamente al N-terminal de la cadena beta de insulina, se incluyó isopropanol como solvente orgánico en la solución de reacción para realizar la pegilación de insulina a varios niveles de pH. Posteriormente, se encontró que en los casos en que el solvente orgánico está incluido en la solución de reacción, se pueden reducir eficientemente varios tipos de impurezas para preparar el conjugado del polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico con alta pureza y rendimiento (Tabla 1), y al aprovechar tal descubrimiento, finalmente se puede preparar el complejo uniforme y altamente purificado. En la modalidad de la presente invención, el contenido de impurezas y la proporción de insulina monopegilada se puede variar con el contenido de isopropanol y el pH de la solución de reacción. En particular, se identificó que cuando el isopropanol está contenido en un nivel de 45 a 55 % sobre la base de la cantidad total de la solución de reacción a pH 6,0, el contenido [33] de insulina monopegilada logra el nivel máximo alcanzable (Tabla 1).

La insulina, como se usa en la presente invención, es un péptido que tiene la función de controlar el azúcar en la sangre de acuerdo con el mecanismo por el cual la insulina es secretada por el páncreas cuando el azúcar en la sangre del cuerpo es alto y absorbe el azúcar en el hígado, los músculos y los tejidos adiposos para almacenarse como glucógeno, e inhibe la descomposición de las grasas y su uso como fuente de energía. Dichos péptidos incluyen agonistas de insulina, precursores, derivados, fragmentos, etc., que son preferentemente insulina nativa, insulina de liberación inmediata, insulina de liberación sostenida.

La insulina nativa es una hormona secretada por el páncreas y generalmente juega un papel en el control del azúcar en sangre en el cuerpo al promover la absorción de glucosa en las células e inhibir la descomposición de la grasa. La insulina se produce a través de una serie de procesos que transforman precursores de proinsulina que no tienen la función de controlar el azúcar en sangre, a insulina, que tiene la función de controlar el azúcar en sangre. La secuencia de aminoácidos de la insulina es la siguiente.

Cadena alfa:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-
Cys-Asn (SEQ ID No: 1)

Cadena beta:

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

- 5 Los agonistas de insulina son sustancias que al estar unidas al receptor de insulina *in vivo* exhiben las mismas actividades biológicas que la insulina, independientemente de la estructura de la insulina.
- 10 Los derivados de insulina son péptidos que muestran una homología de secuencia de al menos el 80 % en su secuencia de aminoácidos en comparación con la insulina nativa, tienen algunos grupos de residuos de aminoácidos alterados en forma de sustitución química (por ejemplo, alfa-metilación, alfa-hidroxilación), eliminación (por ejemplo, desaminación) o modificación (por ejemplo, N-metilación, glicosilación, ácido graso), y tienen la función de controlar el azúcar en sangre en el cuerpo.
- 15 Los fragmentos de insulina son tipos de insulina en la que uno o más aminoácidos se añaden o eliminan a los terminales amino o carboxi de la insulina, y los aminoácidos que se añaden también pueden ser aminoácidos no nativos (por ejemplo, aminoácido tipo D). Dichos fragmentos de insulina retienen la función de controlar el azúcar en sangre en el cuerpo.
- 20 Los métodos respectivos para la preparación de agonistas, derivados y fragmentos de insulina se pueden usar independientemente o en combinación.
- 25 Como es específico de una modalidad, la insulina usada en la presente invención se puede producir mediante el método de recombinación y también se puede producir a partir del método sintético que incluye la síntesis en fase sólida.
- 30 Además, la insulina usada en la presente invención se caracteriza porque el polímero no peptídico está conjugado con los extremos N-terminal (amino terminal) de la cadena beta. En el caso de la insulina, dado que la modificación de la cadena alfa conduce a una disminución de la actividad y a una disminución de la estabilidad, la presente invención une un polímero no peptídico al N-terminal de la cadena beta de la insulina para mantener la actividad de la insulina mientras mejora la estabilidad de la insulina.
- 35 El término "polímero no peptídico", como se usa en la presente invención, indica un polímero biocompatible formado al combinar dos o más unidades repetidas, en donde las unidades repetidas están unidas entre sí mediante un enlace covalente opcional en lugar de un enlace peptídico.
- 40 Los polímeros no peptídicos que se pueden usar en la presente invención se pueden seleccionar del grupo que consiste en: polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímero de etilenglicol y propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, poliviniléter, polímeros biodegradables tales como ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico-glicólico (PLGA), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y la combinación de los mismos, preferentemente polietilenglicol. Todos los derivados de los mismos ya conocidos en la técnica y los derivados que pueden prepararse fácilmente al nivel técnico de la técnica están incluidos dentro del alcance de la presente invención.
- 45 Los enlazadores peptídicos utilizados en la fusión de proteínas, preparados de acuerdo con el método de fusión anterior, tienen la desventaja de que se escinden fácilmente *in vivo* por las enzimas proteolíticas y, por lo tanto, cualquier aumento de la vida media en sangre de los fármacos activos debido al uso del portador correspondiente está por debajo de las expectativas. Sin embargo, en la presente invención se encuentra que la vida media en sangre del péptido es similar a la del portador, debido al uso de polímeros que son resistentes a las enzimas proteolíticas. Por lo tanto, en la presente invención, cualquier polímero que tenga dicha función, es decir, que tenga resistencia a la enzima proteolítica *in vivo*, puede usarse como polímero no peptídico sin ninguna limitación. Los polímeros no peptídicos tienen preferentemente un peso molecular en el intervalo de 1 a 100 kDa, preferentemente en el intervalo de 1 a 20 kDa. Además, aunque el polímero no peptídico que se va a conjugar con el polipéptido fisiológicamente activo puede ser un tipo de polímero específico, la combinación de diferentes tipos de polímeros también puede usarse en la presente invención.
- 50 Los polímeros no peptídicos utilizados en la presente invención tienen grupos reactivos en ambos extremos que pueden conjugarse con la insulina y los portadores.
- 55 Los grupos reactivos de los polímeros no peptídicos son grupos aldehído reactivos, por ejemplo, el grupo propionaldehído y grupo butiraldehído. En particular, el grupo aldehído reactivo es efectivo para minimizar la reacción no específica y para conjugar los polímeros no peptídicos, respectivamente, con la insulina y los portadores en sus extremos. Los productos finales producidos por la alquilación reductora con enlaces aldehído son mucho más estables que los producidos por enlaces amida. Los grupos reactivos aldehídos se pueden hacer reaccionar selectivamente con terminales amino a un nivel de pH bajo, y pueden formar el enlace covalente con residuos de lisina a un nivel de pH alto, por ejemplo, bajo la condición de pH 9,0.
- 60
- 65

Los grupos reactivos presentes en ambos extremos de los polímeros no peptídicos pueden ser idénticos o diferentes entre sí. Cuando se usa polietilenglicol como polímero no peptídico, el conjugado de proteína de la presente invención se puede preparar activando los grupos hidroxilo en los diversos grupos reactivos con reacciones químicas conocidas o mediante el uso de polietilenglicoles disponibles comercialmente que tienen grupos reactivos modificados.

Mientras tanto, el procedimiento para separar y purificar el conjugado que comprende un polipéptido fisiológicamente activo en el cual los N-terminales están unidos covalentemente con un polímero no peptídico, en la etapa (2) de la presente invención puede usar cualquier método conocido en la técnica sin ningún tipo de limitación, y puede emplear preferentemente cromatografía de intercambio iónico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un complejo de insulina, que comprende (1) preparar el conjugado de insulina y el polímero no peptídico de acuerdo con dicho método; y (2) unir covalentemente un portador seleccionado del grupo que consiste en: región Fc de inmunoglobulina, anticuerpo, albúmina, y transformar con el polímero no peptídico del conjugado para producir un complejo peptídico en donde los extremos del polímero no peptídico se unen al polipéptido fisiológicamente activo y al portador respectivamente.

En la presente invención, el término "complejo" pretende hacer referencia a una estructura compuesta por al menos una insulina, al menos un polímero no peptídico y al menos un portador, con interconexión mediante enlaces covalentes entre ellos. Con el fin de diferenciarse del término "complejo", el término "conjugado" se usa en la presente descripción para referirse a una estructura en la que solo los pares de insulina y polímero no peptídico están interconectados mediante un enlace covalente.

En la presente invención, el término "portador" denota una sustancia que se une al fármaco y, en general, es una sustancia que se une al fármaco para aumentar, disminuir o eliminar las actividades biológicas del fármaco. El portador es una sustancia que permite minimizar la disminución en la actividad *in vivo* del polipéptido fisiológicamente activo que se va a unir y al mismo tiempo permite aumentar la estabilidad *in vivo* del fármaco. El portador puede comprender preferentemente, pero no se limita a, región Fc de inmunoglobulina, anticuerpo, albúmina o transferrina.

La región Fc de la inmunoglobulina es un polipéptido biodegradable que se metaboliza en el organismo vivo y, por lo tanto, es seguro utilizarlo como portador del fármaco. Además, dado que la región Fc de inmunoglobulina tiene un peso molecular menor que el de una molécula de inmunoglobulina completa, es ventajoso para la preparación, purificación y rendimiento del conjugado. Además, dado que las secuencias de aminoácidos son diferentes en cada anticuerpo, al eliminar las porciones Fab, que muestran una alta heterogeneidad, se puede esperar que proporcione el efecto de que se incrementa en gran medida la homogeneidad de las sustancias y se reduzca la posibilidad de inducir la antigenicidad sanguínea.

En la presente invención, la "región Fc de inmunoglobulina" denota las porciones de la región constante de la cadena pesada 2 (CH2) y la región constante de la cadena pesada 3 (CH3) de la inmunoglobulina, excepto las regiones variables de la cadena pesada y ligera, la región constante de la cadena pesada 1 (CH1) y la región constante de cadena ligera 1 (CL1) de la inmunoglobulina, y también puede comprender una porción de bisagra de la región constante de la cadena pesada. Además, si la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención tiene un efecto sustancialmente equivalente o mejorado en comparación con la forma nativa, puede ser la región Fc expandida que comprende una parte o la totalidad de la región constante de la cadena pesada 1 (CH1) y/o la región constante de cadena ligera 1 (CL1), excepto las regiones variables de cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina. Además, también puede ser una región en donde se eliminan secuencias de aminoácidos significativamente largas correspondientes a CH2 y/o CH3. Es decir, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede ser (1) dominio CH1, dominio CH2, dominio CH3 y dominio CH4, (2) dominio CH1 y dominio CH2, (3) dominio CH1 y dominio CH3, (4) dominio CH2 y dominio CH3, (5) la combinación de uno o dos o más dominios y la región bisagra de inmunoglobulina (o una parte de la región bisagra), y (6) un dímero de dominios respectivos de regiones constantes de cadena pesada y regiones constantes de cadena ligera.

Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención incluye secuencias de aminoácidos nativas y también secuencias mutantes. Las secuencias de aminoácidos mutantes indican aquellas que tienen diferentes secuencias debido a la delección, inserción o sustitución no conservadora o conservadora de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos nativa y la combinación de los mismos. Por ejemplo, en el caso de IgG Fc, los residuos de aminoácidos presentes en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322 o 327 a 331 pueden usarse como sitios adecuados para la modificación. Además, se encuentran disponibles varios tipos de mutantes en los que se eliminan los sitios capaces de formar enlaces disulfuro, se eliminan algunos aminoácidos de los terminales N del Fc nativo, o también se añaden residuos de metionina a los terminales N del Fc nativo. Además, para eliminar los sitios de unión del complemento de la función efectora, por ejemplo, se pueden eliminar los sitios de unión de C1q y también se pueden eliminar los sitios de ADCC. Las técnicas para preparar tales mutantes de secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se describen en Publicación de Patente Internacional No. 97/34631, y Publicación de Patente Internacional No. 96/32478, entre otros.

En la técnica se realizan algunos tipos de intercambio de aminoácidos en proteínas y péptidos que no alteran totalmente las actividades de las moléculas (H. Neurath, RL Hill, The Proteins, Academic Press, Nueva York, 1979). El intercambio que ocurre con más frecuencia es el intercambio entre los residuos de aminoácidos 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 o Asp/Gly.

En su caso, se pueden modificar con fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, etc.

Los mutantes Fc descritos anteriormente son mutantes que muestran las mismas actividades biológicas que la región Fc de la presente invención y, además, tienen mejorada la estabilidad estructural de la región Fc frente al calor, pH, etc.

Además, dicha región Fc se puede obtener a partir de la forma nativa separada del cuerpo vivo de seres humanos y animales que incluyen ganado, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas, cobayas, etc., y también pueden ser los recombinantes obtenidos a partir de células animales o microorganismos transformados, o sus derivados. En la presente descripción, las regiones Fc adquiridas de la forma nativa se pueden obtener con la separación de la inmunoglobulina completa del cuerpo vivo de humanos o animales y el tratamiento de la inmunoglobulina completa con enzimas proteolíticas. Cuando la inmunoglobulina se trata con papaína, se escinde en Fab y Fc, y en caso de tratarla con pepsina, la inmunoglobulina se puede escindir en pF'c y F(ab)2. Posteriormente, la mezcla de reacción se puede someter a cromatografía de exclusión por tamaño para separar Fc o pF'c.

Es preferible la región Fc de inmunoglobulina recombinante obtenida a partir de la región Fc de origen humano mediante el uso de microorganismos.

Además, la región Fc de inmunoglobulina puede estar en formas que tienen una cadena de glúcidos nativa, una cadena de glúcidos mayor en comparación con la forma nativa, una cadena de glúcidos menor en comparación con la forma nativa o estar desglucosilada. El aumento y la disminución, o la eliminación de tales cadenas de glúcidos de inmunoglobulina Fc se pueden lograr mediante métodos convencionales que incluyen métodos químicos, métodos enzimológicos y métodos de ingeniería genética que utilizan microorganismos. En la presente descripción, dado que las regiones Fc de inmunoglobulina en las que la cadena de glúcidos se elimina del Fc muestran una disminución significativa de la fuerza de unión del complemento (c1q) y proporcionan una disminución o eliminación de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente del complemento, estas no inducen cualquier reacción inmunológica necesaria en el organismo vivo. En vista de esto, la forma más adecuada del portador para los fármacos, para el propósito esencial de la presente invención, puede ser la región Fc de inmunoglobulina desglucosilada o aglicosilada.

En la presente invención, el término "desglucosilación" se refiere a la región Fc de la que se elimina el grupo glicosilo con enzimas, y el término "aglicosilación" denota la región Fc que se produce a partir de animales procariontes, preferentemente *E. coli*, y que no está glicosilada.

Además, la región Fc de inmunoglobulina puede ser la región Fc derivada de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, o la región Fc derivada de combinaciones o híbridos de las mismas. Preferentemente, la región Fc de inmunoglobulina se puede derivar de IgG o IgM, que son más abundantes en la sangre humana, y con la máxima preferencia se deriva de IgG que se sabe que mejora la vida media de las proteínas conjugadas con un ligando.

Mientras tanto, el término "combinación" en la presente invención indica que se forma una unión de polipéptidos que codifican la región Fc de inmunoglobulina monocatenaria derivada del mismo origen con polipéptidos monocatenarios derivados de un origen diferente para la producción de dímeros o multímeros. Es decir, puede formarse los dímeros o multímeros a partir de dos o más fragmentos que se seleccionan del grupo que consiste en fragmentos Fc de IgG, Fc de IgA, Fc de IgM, Fc de IgD y Fc de IgE.

En la presente invención, el término "híbrido" indica que las secuencias correspondientes a dos o más fragmentos Fc de inmunoglobulina derivados de diferentes orígenes están presentes en la región Fc de inmunoglobulina monocatenaria. En la modalidad específica de la presente invención, están disponibles varios tipos de híbridos. Es decir, están disponibles híbridos que comprenden de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 y CH4 de Fc de IgG, Fc de IgM, Fc de IgA, Fc de IgE y Fc de IgD, que pueden comprender además la porción de bisagra.

Además, la IgG también se puede clasificar en subclases de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y en la presente invención también se puede usar una combinación o híbridos de las mismas. Son preferibles las subclases de IgG2 e IgG4, y con la máxima preferencia la región Fc de IgG4, que prácticamente no tiene función efectora, tal como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Es decir, la región Fc de inmunoglobulina con mayor preferencia usada como portador para el fármaco que está en la presente invención es el dominio Fc aglicosilado derivado de IgG4 humana. Las regiones Fc derivadas de

humanos actúan como un antígeno en el cuerpo humano y, por lo tanto, tienen mayor preferencia que las regiones Fc derivadas de no humanos, que pueden causar reacciones inmunes indeseables tales como la formación de un nuevo anticuerpo.

- 5 El complejo de insulina de la presente invención se puede preparar con alta pureza y rendimiento de acuerdo con el método de la presente invención, y puede mostrar una duración y estabilidad mejoradas *in vivo* de modo que la adaptabilidad a la ingesta de medicamentos puede mejorarse mucho en el tratamiento con insulina. En un ejemplo de la presente invención, se usaron complejos insulina-PEG-inmunoglobulina Fc preparados de acuerdo con el método de la presente invención para confirmar su vida media de eliminación *in vivo*. Como resultado, se identificó que mostraron una duración de 15,73 horas en el caso de la administración intravenosa y 16,98 horas en el caso de la administración subcutánea, lo que es 30 veces mayor que la duración de aproximadamente 0,5 horas en el caso de la insulina nativa (Figura 6). Además, de acuerdo al resultado de la prueba de potencia *in vivo*, también se descubrió que su potencia para reducir los niveles de azúcar en sangre dura aproximadamente 4 días (Figura 7).
- 10
- 15 En la presente descripción, aunque no reivindicada, se encuentra una formulación sostenida de insulina que comprende los complejos de insulina preparados de acuerdo con el método de la presente invención.

El término "administración" significa que una sustancia dada se introduce en un paciente por medio de cualquier método adecuado. Los complejos preparados de acuerdo con el método de la presente invención se pueden administrar a través de cualquiera de las vías convencionales siempre que la vía permita que el fármaco alcance el tejido diana. La administración del complejo puede incluir, pero no se limita a, administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar, intrarrectal y similares. Sin embargo, dado que los fármacos peptídicos se digieren en el caso de la administración oral, se prefiere que la composición oral se formule con revestimiento del fármaco activo de modo que esté protegido de la digestión gástrica. Preferentemente, los complejos se pueden administrar en forma de inyección. Además, la formulación de liberación sostenida se puede administrar por medio de cualquier aparato opcional que pueda permitir que el material activo se mueva hacia las células diana.

20

25

La formulación de liberación sostenida que comprende el complejo preparado de acuerdo con el método de la presente invención puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen aglutinantes, lubricantes, desintegrantes, excipientes, solubilizantes, dispersantes, estabilizadores, agentes de suspensión, colorantes, perfumes, etc., que pueden usarse para la administración oral; tampones, conservantes, agentes para disminuir el dolor, solubilizantes, agentes de isotonicidad, estabilizantes, etc., que pueden usarse en sus combinaciones para inyecciones; y se pueden usar bases, excipientes, lubricantes, conservantes, etc., para la administración tópica. La formulación de liberación sostenida se puede preparar de forma diversa mezclándola con los portadores farmacéuticamente aceptables como se describió anteriormente. Por ejemplo, la formulación se puede preparar en forma de comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, etc., para administración oral, y en forma de ampollas para dosificación unitaria o múltiple para inyección. Los complejos preparados de acuerdo con el método de la presente invención también se pueden formular en otras formas que incluyen soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, etc.

30

35

40

Mientras tanto, como ejemplos de portadores, excipientes y diluyentes adecuados para la formulación, pueden usarse lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábiga, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceites minerales, etc. Además, se pueden utilizar adicionalmente rellenos, anticoagulantes, lubricantes, agentes humectantes, perfumes, conservantes, etc.

45

La administración de la formulación de liberación sostenida se puede determinar en dependencia del tipo de fármaco utilizado como ingrediente activo, junto con varios factores involucrados, incluidos las enfermedades a tratar, las vías de administración, la edad, el sexo, el peso de los pacientes y la gravedad de las enfermedades, etc. Las formulaciones de liberación sostenida tienen una buena duración y potencia *in vivo* y, por lo tanto, pueden conducir a una disminución significativa en la frecuencia de administración de la formulación farmacéutica de la presente invención. Además, la formulación de liberación sostenida puede mantener la duración y la estabilidad *in vivo* de los polipéptidos fisiológicamente activos y, por lo tanto, puede usarse eficazmente para el tratamiento de enfermedades.

50

55

Modo de la invención

De aquí en adelante, se pretende explicar más específicamente la presente invención a través de ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos se proporcionan sólo para ilustrar la presente invención con mayor detalle y el alcance de la presente invención no está limitado en ningún aspecto por estos ejemplos.

60

Ejemplo 1: Reacción de pegilación de insulina y purificación de insulina monopegilada

65

5 El polvo de insulina se disolvió en HCl 10 mM y luego se hizo reaccionar con 3,4 K PEG propión-ALD2 (PEG que tiene dos grupos propionaldehído, BID, Corea), de 4 °C a 8 °C, durante aproximadamente 2 horas en condiciones que incluyen una relación molar de 1:2-4 de insulina:PEG y una concentración de insulina de 3-5 mg/ml, para pegilar el N-terminal de la cadena beta de la insulina. Esta reacción se llevó a cabo en citrato de sodio 50 mM, pH 6,0, isopropanol al 45 %, con adición de reductor NaCNBH₃ 4-20 mM. La solución de reacción se purificó con una columna SP-HP (GE Healthcare) mediante el uso de un tampón que contenía citrato de sodio (pH 3,0), EtOH al 45 % y un gradiente de concentración de KCl.

10 Se identificó mediante SE-HPLC y análisis de mapeo de péptidos que la insulina monopegilada, preparada de esta forma, se pegilaba en un 98 % o más en la fenilalanina n° 1 (B1F) de la cadena beta (Figuras 1 y 2).

Ejemplo 2: Cambio en el rendimiento y el contenido de impurezas de mono PEG-insulina en dependencia del pH de la solución de reacción y la concentración del solvente orgánico

15 Para comparar el rendimiento de reacción de mono PEG-insulina y la producción de impurezas durante la preparación cuando solventes orgánicos tales como isopropanol se incluyen en la solución para la reacción de insulina con PEG, se hicieron reaccionar insulina y 3,4K PEG propión-ALD2 en proporción molar de 1:2 con 3 mg/ml de concentración de insulina a 4 °C durante 4 horas. En la presente descripción, se utilizaron como solución de reacción: solución tampón de 50 mM de citrato de sodio pH 6,0, isopropanol al 45 %; solución tampón de citrato de sodio 50 mM pH 6,0 isopropanol al 55 %; solución tampón de fosfato potásico 100 mM pH 6,0; solución tampón de fosfato potásico 100 mM pH 6,0, isopropanol al 30 %; solución tampón de fosfato potásico 100 mM pH 6,0, isopropanol al 45 %; solución tampón de fosfato potásico 100 mM pH 6,0, isopropanol al 55 %; solución tampón de acetato de sodio 50 mM pH 4,0; solución tampón de acetato de sodio 50 mM pH 4,0, isopropanol al 10 %; solución tampón de acetato de sodio 50 mM pH 4,0, isopropanol al 20 %; solución tampón de acetato de sodio 50 mM pH 4,0, isopropanol al 30 %; solución tampón de acetato de sodio 50 mM pH 4,0, isopropanol al 40 %; solución tampón de acetato de sodio pH 4,0, isopropanol al 45 %; y solución tampón de acetato de sodio 50 mM pH 4,0, isopropanol al 50%. A estas se añadió NaCNBH₃ 20 mM como agente reductor. Las soluciones de reacción respectivas se purificaron con el mismo método que se usó en el Ejemplo 1, y los perfiles de purificación de las mismas se muestran en la Figura 3. Cuando ambos N-terminales de las cadenas alfa y beta de insulina reaccionan simultáneamente con PEG en forma de puente, es imposible que se produzca una reacción de acoplamiento de insulina monopegilada con inmunoglobulina Fc. Por lo tanto, la proporción de tales impurezas se muestra en la Tabla 1. Como se muestra en la Tabla 1, se identificó que la proporción de insulina monopegilada varía con el contenido de isopropanol en la solución de reacción y la condición de pH, y el contenido de insulina monopegilada alcanza el máximo a pH 6,0 cuando el contenido de isopropanol es aproximadamente del 45 al 55 %. La condición de pH bajo condujo a un aumento en el contenido de impurezas pegiladas de tipo puente a medida que se elevó el contenido de isopropanol y, por lo tanto, provocó una disminución en el rendimiento de insulina monopegilada.

Tabla 1

Condición de búfer	Solvente orgánico	Contenido de impurezas pegiladas tipo puente	Contenido de mono PEG-insulina
Fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0)	-	1,9 %	12,0 %
	30 % de isopropanol	8,1 %	32,0 %
	45 % de isopropanol	10,5 %	44,0 %
	55 % de isopropanol	6,4 %	21,0 %
Citrato de sodio 50 mM (pH 6,0)	45 % de isopropanol	9,9 %	45,0 %
	55 % de isopropanol	12,3 %	43,0 %
Acetato de sodio 50 mM (pH 4,0), NaCl 0,2 M	-	4,7 %	18,0 %
	10 % de isopropanol	6,9 %	18,0 %
	20 % de isopropanol	19,3 %	27,0 %
	30 % de isopropanol	25,7 %	31,0 %
	40 % de isopropanol	28,9 %	32,0 %
	45 % de isopropanol	31,0 %	34,0 %
	50 % de isopropanol	33,9 %	34,0 %

Ejemplo 3: Preparación del complejo de insulina monopegilada e inmunoglobulina Fc

Para preparar el complejo insulina-PEG-inmunoglobulina Fc, se hicieron reaccionar insulina monopegilada preparada por el método del Ejemplo 1 e inmunoglobulina Fc en la relación molar de 1:1 con un nivel de proteína total de 20-50 mg/ml, a 25 °C durante 15-17 horas. En esta reacción, la solución de reacción incluía HEPES 100 mM, fosfato potásico 22 mM, etanol al 10 %, pH 8,2, y además contenía NaCNBH₃ 20 mM como reductor.

Una vez completada la reacción, la solución de reacción se purificó primero a través de la columna Source 15Q (GE Healthcare) para eliminar cualquier inmunoglobulina Fc residual e insulina monopegilada. En este caso, la elución se realizó mediante el uso de tampón Tris-HCl (pH 7,5) y gradiente de concentración de NaCl.

Luego, se utilizó Source 15ISO (GE Healthcare) como segunda columna para eliminar cualquier complejo residual de inmunoglobulina Fc e insulina multi-pegilada, y obtener el complejo insulina-PEG-inmunoglobulina Fc. En este caso, la elución se realizó mediante el uso de gradiente de concentración de sulfato de amonio que comprende Tris-HCl (pH 7,5).

El complejo insulina-PEG-inmunoglobulina Fc eluido se analizó con RP-HPLC, SE-HPLC y SDS PAGE, y después se confirmó que se preparó con una alta pureza de al menos el 98 % (Figuras 4 y 5).

Ejemplo 4: Medición de la vida media de eliminación *in vivo* del complejo de insulina de liberación sostenida

Para confirmar la duración *in vivo* del complejo de insulina de liberación sostenida en forma de complejo insulina-PEG-inmunoglobulina Fc preparado en el Ejemplo 3, se usó rata macho normal (rata SD normal) para determinar el perfil farmacocinético del fármaco administrado por vía intravenosa y subcutánea. Se administraron por vía intravenosa y subcutánea 0,1 mg/kg (basado en insulina) del complejo de insulina de liberación sostenida una vez a una rata macho normal, y después se midió el cambio en la concentración sanguínea a lo largo del tiempo por medio de un kit de ELISA de insulina. A partir de los valores medidos, se calcularon los parámetros farmacocinéticos con WinNonlin 5.2. Como resultado, se identificó que la vida media de eliminación *in vivo* del complejo de insulina de liberación sostenida fue de 15,73 horas, en el caso de la administración intravenosa, y de 16,98 horas en el caso de la administración subcutánea, lo que corresponde a una duración 30 veces superior a las aproximadamente 0,5 horas en caso de insulina nativa. Además, también se identificó que, en el caso de la administración subcutánea, la disponibilidad biológica era aproximadamente del 54 % (Figura 6).

Ejemplo 5: Prueba de potencia *in vivo* para el complejo de insulina

Para comparar la potencia *in vivo* de los complejos de insulina, se realizó la prueba para comparar la potencia de reducir el azúcar en sangre en ratas que tenían diabetes mellitus inducida por estreptozotocina. La diabetes mellitus

se indujo mediante la administración intraperitoneal de estreptozotocina disuelta en solución tampón de ácido cítrico 10 mM (pH 4,5) a un nivel de 60 mg/kg, a ratas normales que habían estado en ayunas durante 16 horas. Posteriormente, el complejo de insulina se administró una vez por vía subcutánea a la dosis de 0,5 mg/kg a ratas que tenían el nivel de azúcar en sangre elevado, a 500 mg/dl o más, y luego se comparó la potencia de disminución del azúcar en sangre. Como resultado, el efecto de la insulina de bajar el azúcar en sangre se observó hasta aproximadamente el 4to día y el azúcar en la sangre aumentó a un nivel equivalente a la del portador en el 5^{to} día (Figura 7).

<110> Hanmi Science Co., Ltd.

<120> Método para preparar un complejo polipeptídico fisiológicamente activo

<130> OPA12119PCT

<150> 10-2011-0114828

<151> 2011-11-04

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un conjugado de insulina y un polímero no peptídico, que comprende:
- 5 (1) hacer reaccionar insulina, que tiene dos extremos N-terminal, con un polímero no peptídico en una solución de reacción que comprende un solvente orgánico para unir dicha insulina con dicho polímero no peptídico, en donde el polímero no peptídico tiene grupos aldehído reactivos en ambos extremos; y
 (2) aislar y purificar el conjugado de insulina unida covalentemente a un polímero no peptídico de la mezcla de reacción de la etapa (1);
- 10 en donde
- la solución de reacción comprende el solvente orgánico en una cantidad de 30 a 55 % en volumen basado en el volumen total de la solución de reacción;
- 15 la solución de reacción tiene un pH de 4,5 a 6,5;
 el solvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en isopropanol, etanol y metanol;
 el polímero no peptídico se une al N-terminal de la cadena beta de la insulina; y
 la insulina es
- 20 a) insulina nativa, o
 b) un derivado que se prepara mediante cualquiera de sustitución, adición, delección, modificación o combinaciones de los mismos, en uno o más aminoácidos de la insulina nativa, que tiene (i) una homología de secuencia de aminoácidos de al menos 80 % en comparación con la insulina nativa que tiene la secuencia de la cadena alfa de SEQ ID NO. 1 y la secuencia de la cadena beta de SEQ ID
- 25 NO. 2, y (ii) la función de controlar el azúcar en sangre en el cuerpo, o
 c) un fragmento de insulina en donde (i) se añaden o eliminan uno o más aminoácidos de los terminales amino o carboxi de la insulina, y (ii) el fragmento de insulina retiene la función de controlar el azúcar en sangre en el cuerpo.
- 30 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el solvente orgánico es isopropanol.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solución de reacción comprende el solvente orgánico en una cantidad de 45 a 55 % en volumen, basado en el volumen total de la solución de reacción.
- 35 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polímero no peptídico se une al grupo amina o al grupo tiol de la insulina o derivado de insulina.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polímero no peptídico se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxiethylado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, un polímero biodegradable, un polímero lipídico, quitina, ácido hialurónico y la combinación de los mismos.
- 40 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el grupo aldehído se selecciona del grupo que consiste en un grupo propionaldehído y un grupo butiraldehído.
- 45 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el aislamiento y la purificación se realizan mediante cromatografía de intercambio iónico.
8. Un método para preparar un complejo de insulina, que comprende:
- 50 (1) preparar el conjugado de insulina y polímero no peptídico de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
 (2) unir covalentemente un portador seleccionado del grupo que consiste en: región Fc de inmunoglobulina, anticuerpo, albúmina o transferrina, con un polímero no peptídico del conjugado para producir un complejo de insulina en donde los extremos de dicho polímero no peptídico se unen a la insulina y al portador, respectivamente.
- 55 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la región Fc de inmunoglobulina está compuesta de 1 a 4 dominios seleccionados del grupo que consiste en dominios CH1, CH2, CH3 y CH4.
- 60 10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la región Fc de inmunoglobulina comprende además una región bisagra.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc derivada de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.
- 65

12. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4 aglicosilada humana.

5

10

Figura. 1

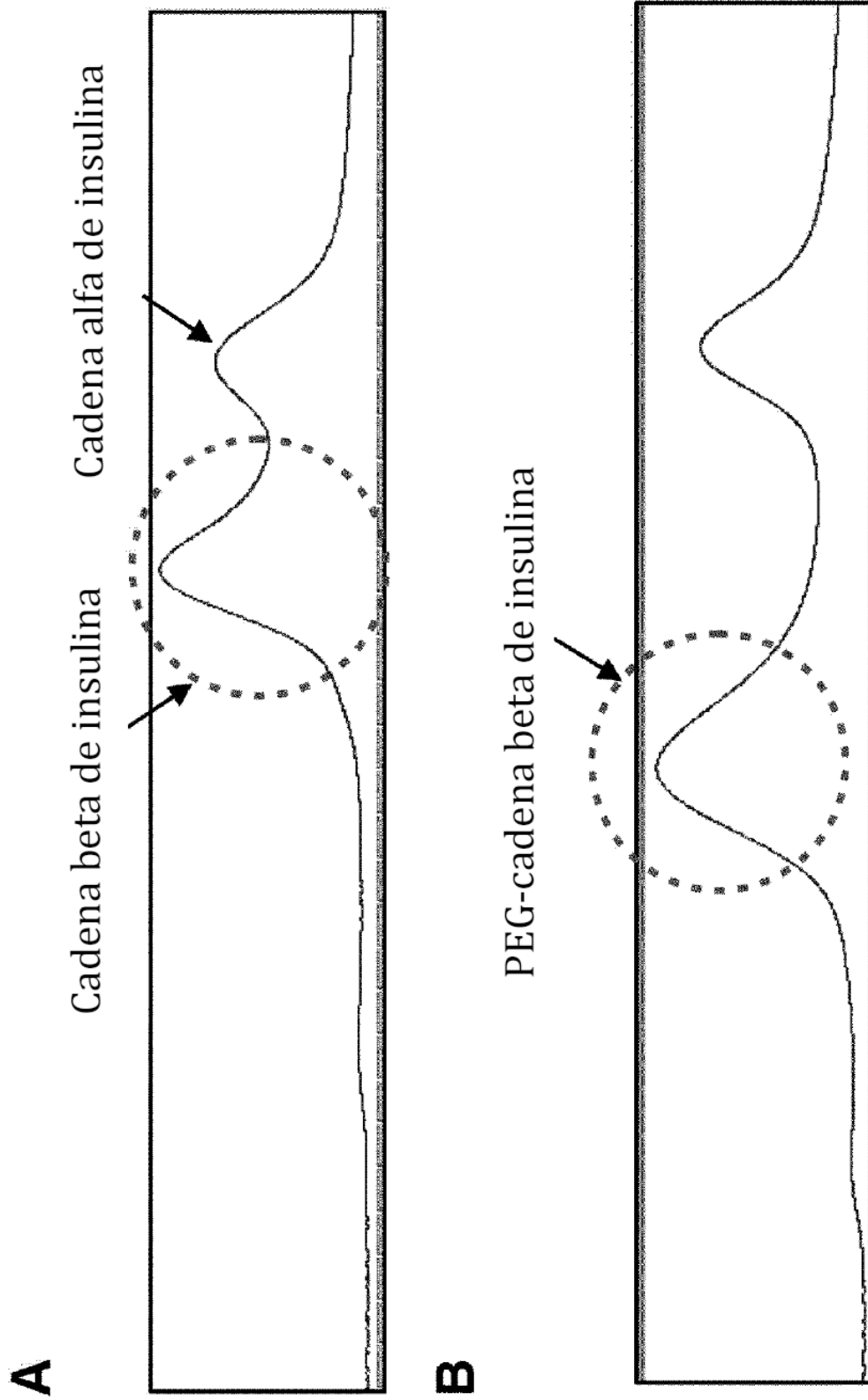


Figura. 2

Pico que comprende el N-terminal de la cadena beta de insulina

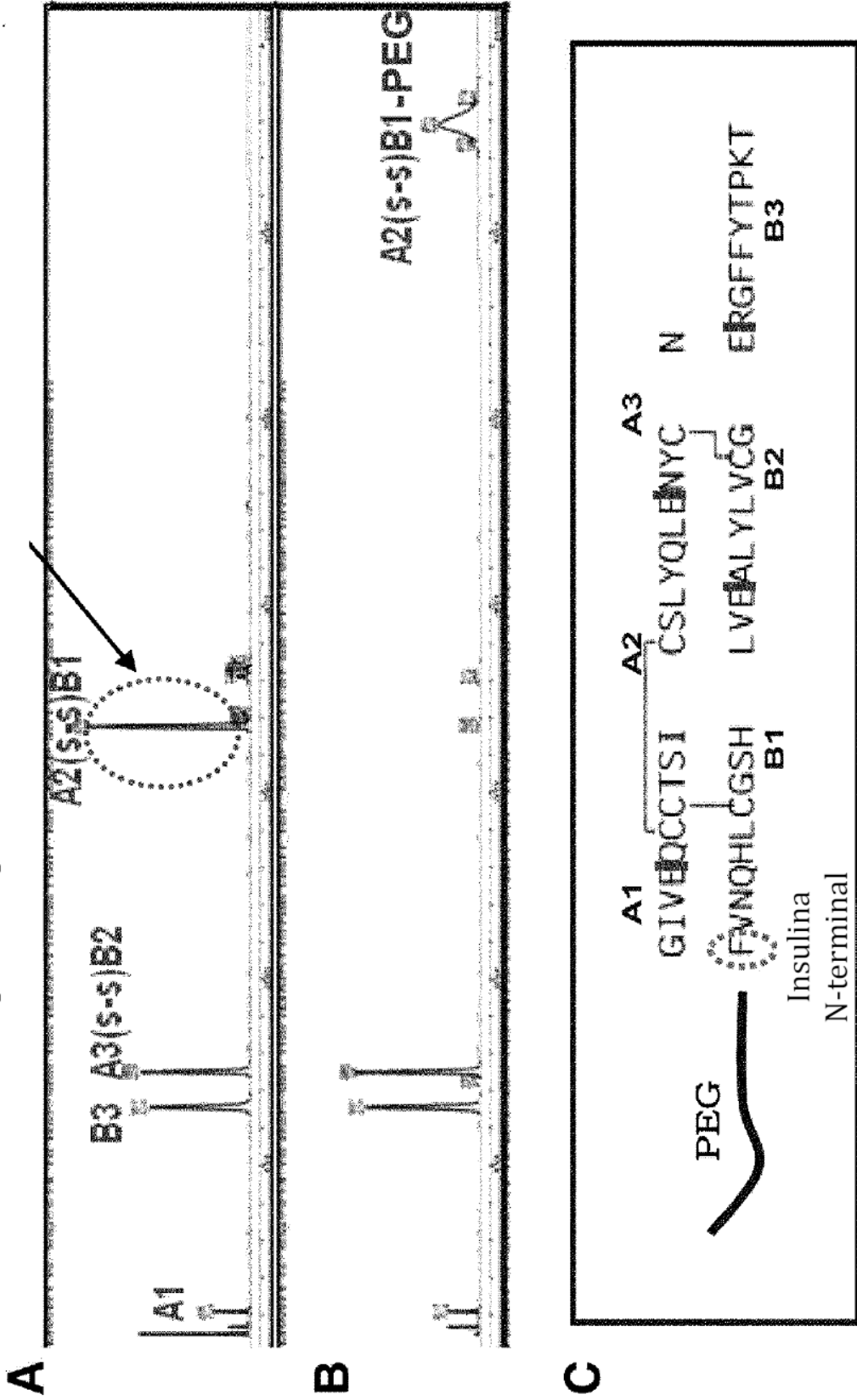


Figura. 3

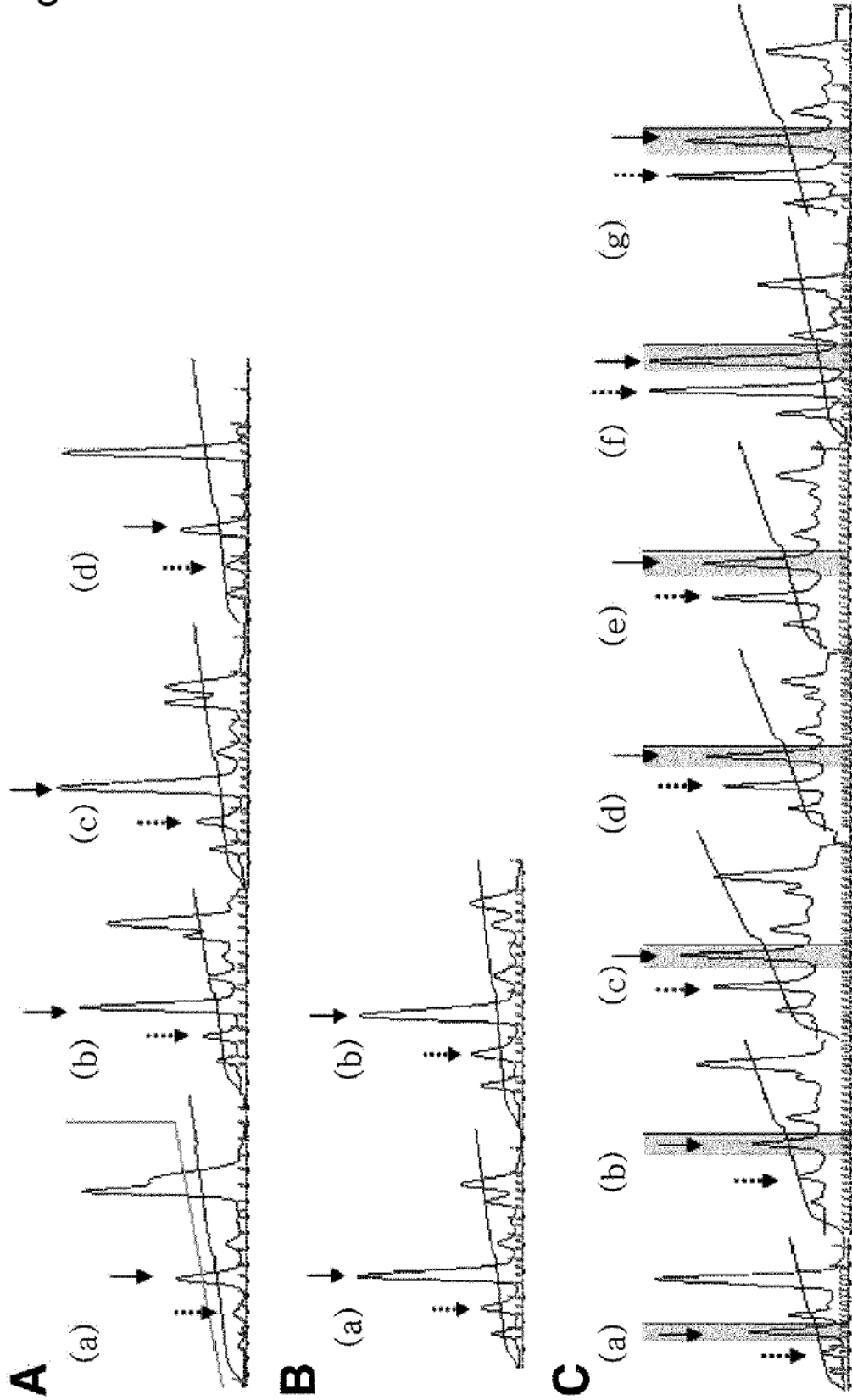


Figura. 4

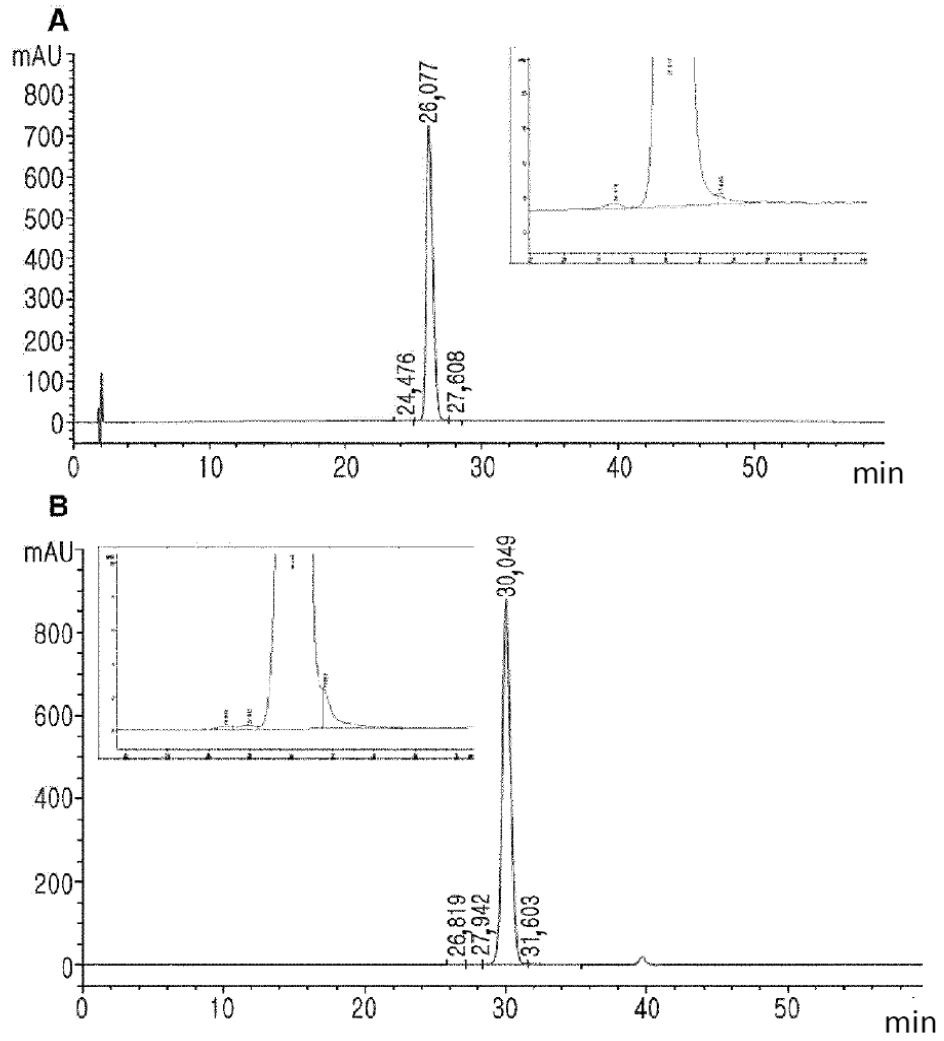


Figura. 5

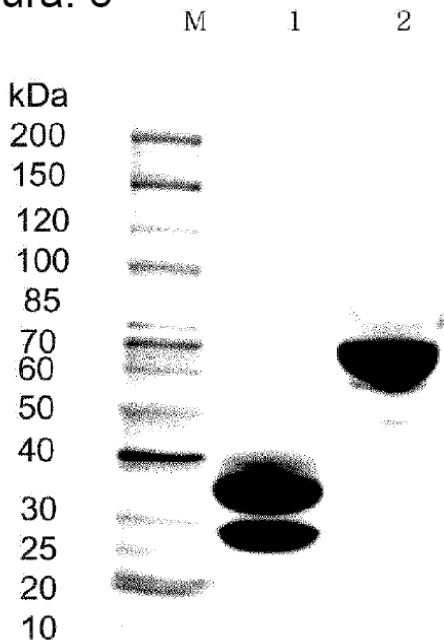


Figura. 6

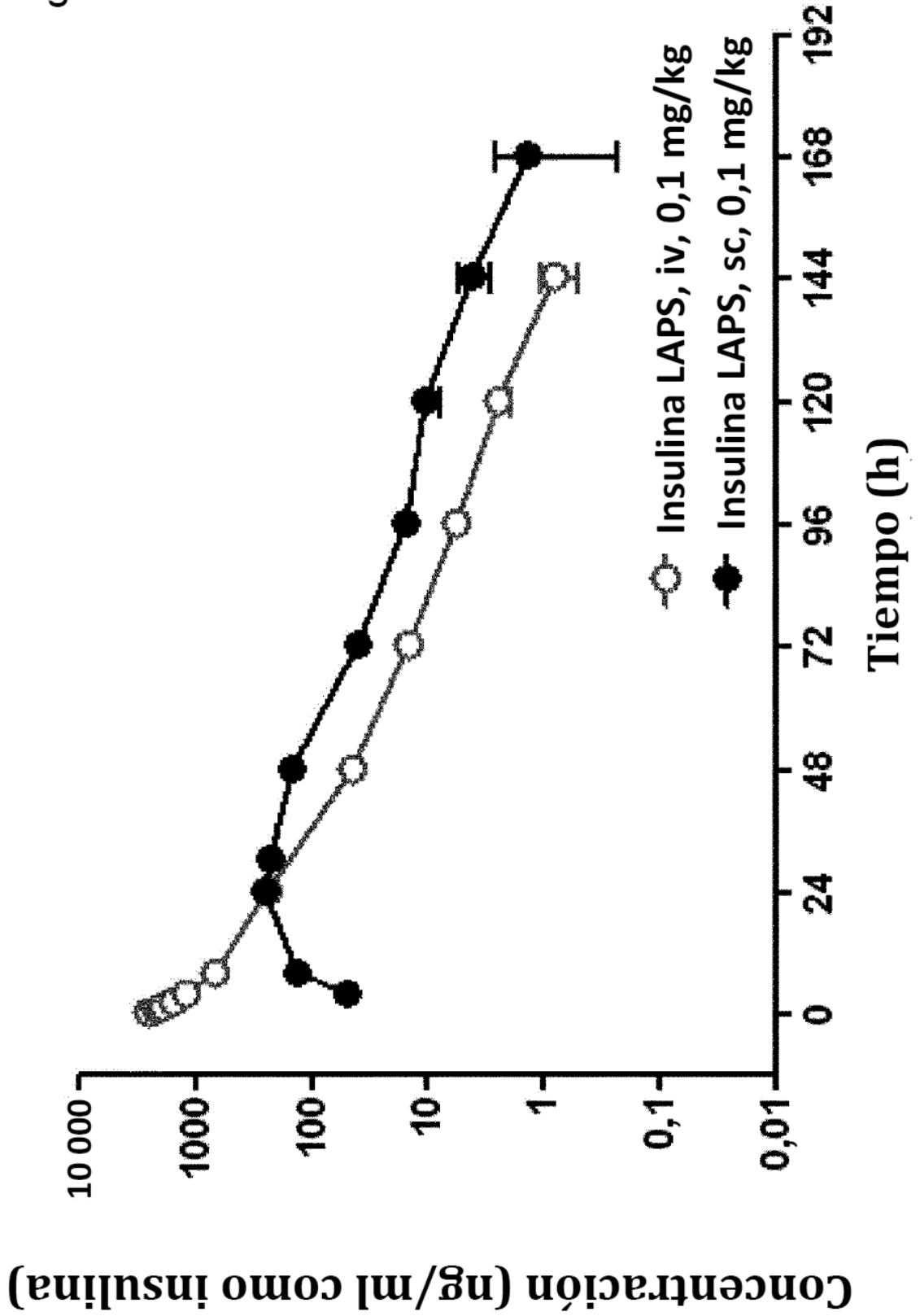


Figura. 7

