

(11) Número de Publicação: **PT 1558641 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/62 (2007.10) **A61K 9/00** (2007.10)
A61K 38/28 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2003.10.16**

(30) Prioridade(s): **2002.10.29 DE 10250297**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.08.03**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.02.25**
074/2010

(73) Titular(es):
SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
BRÜNINGSTRASSE 50 65929 FRANKFURT AM
MAIN DE

(72) Inventor(es):
HARALD BERCHTOLD DE

(74) Mandatário:
PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **CRISTAIS DE ANÁLOGOS DE INSULINA E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"CRISTAIS DE ANÁLOGOS DE INSULINA E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"

A invenção refere-se a cristais de um análogo de insulina, no qual a asparagina (Asn) está trocada na posição B3 da cadeia B por um resíduo de aminoácido básico de ocorrência natural e, pelo menos, um resíduo de aminoácido nas posições B27, B28 ou B29 da cadeia B está trocado por um outro resíduo de aminoácido neutro ou ácido de ocorrência natural, em que a fenilalanina (Phe) na posição B1 da cadeia B pode estar facultativamente ausente, em que os cristais estão presentes no grupo espacial R3 (n° 146) com os eixos celulares $A = 81,5 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ e $C = 33,3 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$.

Em todo o mundo, aproximadamente 120 milhões de pessoas sofrem de *Diabetes mellitus*. Entre estes, aproximadamente 12 milhões são diabéticos do tipo I, para quem a aplicação de insulina representa actualmente a única terapia possível. As pessoas afectadas dependem vitaliciamente de injeções de insulina, em regra, várias vezes ao dia. Embora a diabetes do tipo II, da qual sofrem aproximadamente 100 milhões de pessoas, não esteja implicada, em princípio, com uma carência em insulina, num grande número de casos o tratamento com insulina é todavia encarado como a forma terapêutica mais favorável ou como a única possível.

Com a duração progressiva da doença, um grande número dos doentes sofre das, assim denominadas, complicações tardias da

diabetes. Trata-se, neste caso, essencialmente de danos micro e macrovasculares que, consoante o tipo e extensão, têm como consequência a insuficiência renal, a cegueira, a perda de extremidades ou um risco aumentado para doenças cardiovasculares.

A causa é atribuída, em primeiro lugar, a níveis cronicamente aumentados da glicose sanguínea dado que, mesmo no caso de um ajuste cuidadoso da terapia com insulina, não é alcançado um perfil de glicose sanguínea normal, tal como este corresponderia a uma regulação fisiológica (Ward, J. D. (1989) *British Medical Bulletin* 45, 111-126; Drury, P.L. *et al.* (1989) *British Medical Bulletin* 45, 127-147; Kohner, E.M. (1989) *British Medical Bulletin* 45, 148-173).

Nas pessoas saudáveis, a segregação de insulina está intimamente relacionada com a concentração de glicose do sangue. Os níveis de glicose aumentados, tal como estes ocorrem após as refeições, são rapidamente compensados por uma libertação acrescida de insulina. Em jejum, o nível de insulina no plasma diminui para um valor basal que é suficiente para garantir um abastecimento contínuo de glicose a órgãos e tecidos sensíveis à insulina. Uma optimização da terapia, a assim denominada terapia intensificada com insulina, tem hoje primariamente como objectivo, tanto quanto possível, manter reduzidas as oscilações da concentração da glicose sanguínea, em especial desvios para cima (Bolli, G. B. (1989) *Diabetes Res. Clin. Pract.* 6, S3-S16; Berger, M. (1989) *Diabetes Res. Clin. Pract.* 6, S25-S32). Isto conduz a uma redução significativa da ocorrência e do progresso de complicações tardias da diabetes (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) *N. Engl. J. Med.* 329, 977-986).

É possível deduzir-se da fisiologia da segregação de insulina que, para uma terapia intensificada com insulina, melhorada, utilizando-se preparados aplicados por via subcutânea, são necessárias duas preparações de insulina, com farmacodinâmica diferente. Para a compensação da subida da glicose sanguínea a seguir às refeições, a insulina tem de fluir rapidamente e apenas pode actuar durante algumas horas. Para o abastecimento basal, em particular durante a noite, deverá estar disponível um preparado que actue durante muito tempo, que não apresente um máximo pronunciado e que flua apenas muito lentamente.

Os preparados à base de insulinas humanas e animais preenchem, contudo, apenas de forma restrita as exigências de uma terapia intensificada com insulina. As insulinas de acção rápida (insulinas antigas) alcançam o sangue e o local de acção demasiado lentamente e apresentam uma duração de acção total demasiado longa. A consequência disto é o facto de os níveis de glicose pós-prandiais serem demasiado elevados e, várias horas após a refeição, a glicose sanguínea baixar demasiado (Kang, S. *et al.* (1991) *Diabetes Care* 14, 142-148; Home, P.J. *et al.* (1989) *British Medical Bulletin* 45, 92-110; Bolli, G. B. (1989) *Diabetes Res. Clin. Pract.* 6, S3-S16). As insulinas basais disponíveis, por sua vez, sobretudo as insulinas NPH, apresentam uma duração de acção demasiado curta e possuem um máximo demasiado pronunciado.

A par da possibilidade de influenciar o perfil de acção através de princípios galénicos, existe hoje a alternativa de desenvolver, com auxílio da tecnologia genética, análogos de insulina que obtêm determinadas propriedades, tal como a entrada em acção e a duração de acção, apenas através das suas

propriedades estruturais. Através da utilização de análogos de insulina adequados poderá alcançar-se, por esta razão, um ajuste essencialmente melhor da glicose sanguínea, mais fortemente equiparado às condições naturais.

Nos documentos EP 0214826, EP 0375437 e EP 0678522 são descritos análogos de insulina com entrada em acção acelerada. O documento EP 0214826 refere-se, entre outros, a substituições de B27 e B28, contudo não associadas à substituição de B3. O documento EP 0678522 descreve análogos de insulina que apresentam diferentes aminoácidos, de um modo preferido prolina, na posição B29, mas não ácido glutâmico. O documento EP 0375437 compreende análogos de insulina com lisina ou arginina em B28, que podem estar opcional e adicionalmente modificados em B3 e/ou A21. No documento EP 0885961 A1 é divulgada insulina humana B3-lisina, B29-glutamato como nova insulina de acção rápida.

No documento EP 0419504 são divulgados análogos de insulina que estão protegidos contra modificações químicas na medida em que a asparagina em B3 e, pelo menos, um aminoácido adicional, nas posições A5, A15, A18 ou A21, estão alterados. Os análogos de insulina aqui descritos apresentam contudo, apenas uma modificação na posição B3 e nenhuma modificação adicional do grupo mencionado. Não é dada qualquer indicação de que estes compostos possuem uma farmacodinâmica alterada que tenha como consequência uma entrada em acção mais rápida.

Os análogos de insulina são análogos de insulinas de ocorrência natural, nomeadamente insulina humana ou insulinas animais, que se diferenciam da insulina de ocorrência natural correspondente, de resto idêntica, pela substituição de, pelo menos, um resíduo de aminoácido de ocorrência natural e/ou

adição de, pelo menos, um resíduo de aminoácido e/ou resíduo orgânico.

A cadeia A de insulina humana apresenta, neste caso, a seguinte sequência de aminoácidos:

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)

A cadeia B de insulina humana apresenta, neste caso, a seguinte sequência de aminoácidos:

**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)**

Dos vinte aminoácidos de ocorrência natural, que são codificáveis geneticamente, designam-se aqui os aminoácidos glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), metionina (Met), asparagina (Asn), glutamina (Gln), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e prolina (Pro) como aminoácidos neutros, os aminoácidos arginina (Arg), lisina (Lys) e histidina (His) como aminoácidos básicos e os aminoácidos ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu) como aminoácidos ácidos.

ou seu sal fisiologicamente aceitável, nomeadamente um análogo de insulina ou um sal fisiologicamente aceitável da fórmula I, que se distingue pelo facto de

- A8 ser alanina (Ala),
- A9 ser serina (Ser),
- A10 ser valina (Val) e

B30 ser alanina (Ala) (resíduos de aminoácidos A8 até A10 e B30 da insulina bovina),
A8 ser treonina (Thr),
A9 ser serina (Ser) e
A10 ser isoleucina (Ile) (resíduos de aminoácidos A8 até A10 da insulina humana ou de porco), em que
B30 é alanina (Ala) (resíduo de aminoácido B30 de insulina de porco) ou
B30 é treonina (Thr) (resíduo de aminoácido B30 de insulina humana, comparar SEQ ID n° 2).

É particularmente preferido um análogo de insulina, ou um sal fisiologicamente aceitável do mesmo, da fórmula I com os resíduos de aminoácidos A8 até A10 e B30 de insulina humana, que se distingue ainda pelo facto de

(A1-A5) serem os resíduos de aminoácido nas posições A1 até A5 da cadeia A de insulina humana (comparar SEQ ID n° 1),
(A12-A19) serem os resíduos de aminoácido nas posições A12 até A19 da cadeia A de insulina humana (comparar SEQ ID n° 1),
(B8-B18) serem os resíduos de aminoácido nas posições B8 até B18 da cadeia B de insulina humana (comparar SEQ ID n° 2) e
(B20-B26) serem os resíduos de aminoácido nas posições B20 até B26 da cadeia B de insulina humana (comparar SEQ ID n° 2).

São configurações adicionais preferidas da presente invenção os cristais contendo um análogo de insulina, ou um sal fisiologicamente aceitável do mesmo, da fórmula I, caracterizado por o resíduo de aminoácido na posição B1 da cadeia B ser um resíduo de fenilalanina (Phe) ou

um análogo de insulina, ou um sal fisiologicamente aceitável do mesmo, da fórmula I, caracterizado por o resíduo de aminoácido na posição B3 da cadeia B ser um resíduo de histidina (His), lisina (Lys) ou arginina (Arg).

São configurações adicionais preferidas da presente invenção os cristais contendo um análogo de insulina, ou um sal fisiologicamente aceitável do mesmo, da fórmula I, caracterizado por, pelo menos, um dos resíduos de aminoácido nas posições B27, B28 e B29 da cadeia B estar substituído com um resíduo de aminoácido de ocorrência natural, o qual é seleccionado do grupo dos aminoácidos neutros ou dos ácidos,

um análogo de insulina, ou um sal fisiologicamente aceitável do mesmo, da fórmula I, caracterizado por, pelo menos, um dos resíduos de aminoácido nas posições B27, B28 e B29 da cadeia B ser um resíduo de aminoácido de ocorrência natural, o qual é seleccionado do grupo isoleucina (Ile), ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu), de um modo preferido, caracterizado por, pelo menos, um dos resíduos de aminoácido nas posições B27, B28 e B29 da cadeia B estar substituído por um resíduo de aminoácido de ocorrência natural, o qual é seleccionado do grupo dos aminoácidos neutros, ou, de um modo particularmente preferido, por, pelo menos, um dos resíduos de aminoácido nas posições B27, B28 e B29 da cadeia B ser um resíduo de isoleucina (Ile), ou

um análogo de insulina, ou um sal fisiologicamente aceitável do mesmo, da fórmula I, caracterizado por, pelo menos, um dos resíduos de aminoácido nas posições B27, B28 e B29 da cadeia B ser um resíduo de aminoácido de ocorrência natural, o qual é seleccionado do grupo dos aminoácidos ácidos, de um modo

preferido caracterizado por, pelo menos, um dos resíduos de aminoácido nas

É uma configuração preferida da presente invenção os cristais contendo um análogo de insulina, ou um sal fisiologicamente aceitável do mesmo, que se distingue pelo facto de a cadeia B apresentar a sequência

**Phe Val Lys 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 Glu Thr
(SEQ ID nº 3).**

O análogo de insulina pode ser preparado, de um modo preferido, por tecnologia genética.

A preparação da insulina efectua-se principalmente por tecnologia genética, por meio de mutagénese dirigida segundo métodos padrão.

Para o efeito constrói-se uma estrutura génica codificadora do análogo de insulina desejado e conduz-se à expressão numa célula hospedeira, de um modo preferido numa bactéria, tal como *E. coli* ou uma levedura, em particular *Saccharomyces cerevisiae*, e, caso a estrutura génica codifique uma proteína de fusão, liberta-se o análogo de insulina da proteína de fusão; estão descritos métodos análogos, p. ex., nos documentos EP-A-0211299, EP-A-0227938, EP-A-0229998, EP-A-0286956 e no pedido de patente DE P 3821159.

Pode-se efectuar a dissociação da fracção da proteína de fusão quimicamente por meio de um halogeneto cianogénio, após a lise celular (ver documento EP-A-0180920).

Na preparação por meio de um precursor de pré-proinsulina que possui uma fracção de proteína de fusão (pré-sequência) segundo o documento US 5358857, efectua-se a dissociação da fracção de proteína de fusão numa etapa ulterior, em conjunto com a dissociação do péptido C.

O precursor de insulina é depois submetido à sulfitólise oxidativa segundo o método descrito, p. ex., por R.C. Marshall e A.S. Inglis em "Practical Protein Chemistry - A Handbook" (editor A. Darbre) 1986, páginas 49 - 53 e subsequentemente renaturado na presença de um tiol, sob formação das pontes de dissulfureto correctas, p. ex., segundo o método descrito por G.H. Dixon e A.C. Wardlow em Nature (1960), páginas 721 - 724.

Os precursores de insulina também podem ser, contudo, directamente enrolados (documentos EP-A-0600372; EP-A-0668292).

O péptido C é removido por meio de dissociação triptica, p. ex. de acordo com o método de Kemmler *et al.*, J.B.C. (1971), páginas 6786 - 6791 e o análogo de insulina da fórmula I é purificado por meio de técnicas conhecidas, tal como cromatografia, p. ex. documento EP-A-0305760, e cristalização.

Nestes processos, a extremidade terminal C da cadeia B termina com arginina ou dois resíduos de arginina. Estes podem ser removidos enzimaticamente por meio da carboxipeptidase B.

O análogo de insulina possui actividade biológica completa. Isto foi demonstrado por aplicação intravenosa a coelhos e pela diminuição da glicose sanguínea daí resultante. A entrada em acção mais rápida, após a aplicação subcutânea, foi demonstrada com a técnica de clampagem euglicémica em cães em jejum (documento EP 0885961 A1. Exemplos 5 e 6). Foram administrados 0,3 IE/kg. O preparado de referência foi a insulina humana. Na técnica de clampagem, após a injeção de insulina, é medido o valor de glicose em intervalos curtos e infunde-se exactamente a quantidade de glicose suficiente para compensar a diminuição. Isto tem a vantagem de não ter lugar qualquer contrarregulação nos animais, tal como seria o caso numa forte queda da glicose sanguínea, após a administração de insulina. A quantidade e a variação no tempo da glicose infundida caracterizam a acção da insulina. A Lys(B3), Glu(B29) (SEQ ID nº 3) apresenta uma entrada em acção manifestamente mais rápida que a insulina humana. A acção máxima (taxa de infusão da glicose) é alcançada com a insulina humana após 100 minutos, com a insulina Lys(B3), Glu(B29) (SEQ ID nº 3), pelo contrário, após 80 minutos. Por esta razão, o análogo mencionado, quando injectado pouco tempo antes de uma refeição, deverá compensar melhor a subida pós-prandial da glicose sanguínea que a insulina humana.

O análogo de insulina descrito adequa-se tanto para a terapia da *Diabetes mellitus* do tipo I, como também da do tipo II, de um modo preferido, em associação com uma insulina basal.

Os análogos de insulina também podem ser empregues nas preparações farmacêuticas na forma dos seus sais fisiologicamente aceitáveis, tal como sais de metais alcalinos ou como sais de amónio. Uma fracção arbitrária de um ou vários análogos de insulina pode estar presente numa mistura de outros

destes análogos de insulina, respectivamente, independentemente uns dos outros, na forma dissolvida, amorfa e/ou cristalina.

As insulinas e análogos de insulina são frequentemente preparadas como formulações farmacêuticas aquosas que contêm iões de zinco.

A adição de iões de zinco a preparações de insulina efectua-se essencialmente por duas razões:

1. Os iões de Zn^{2+} actuam de forma estabilizadora sobre as preparações de insulina, dado que estes fomentam a formação de hexâmeros de insulina [Brange et al. Diabetic Medicine, 3, 532-536 (1986)].
2. Em função da concentração de iões de Zn^{2+} é possível controlar a variação no tempo da cinética do fluxo de entrada e de saída de preparações de insulina.

No caso de insulinas de acção rápida, os pontos 1 e 2 conduzem a problemas. Devido à estabilidade galénica aumentada da preparação, são vantajosas concentrações elevadas de hexâmeros de insulina. Dado que os iões de Zn^{2+} retardam, contudo, a cinética do fluxo de entrada e de saída do análogo de insulina, estes actuam de forma contrária à cinética desejada da libertação de substância activa. Por esta razão, optou-se por preparar um dos análogos de insulina descritos, nomeadamente insulina humana Lys B3, Glu B29, na forma de uma formulação aquosa isenta de zinco (pedido internacional de patente PCT/EP02/02625).

Para a preparação da formulação aquosa, isenta de zinco, de insulina humana Lys B3, Glu B29 é necessário que seja possível

empregar cristais deste análogo de insulina isentos de zinco. Para além disso, os cristais do mesmo, isentos de zinco, também podem ser utilizados para a preparação de outras formulações farmacêuticas, p. ex. em formulações sólidas ou emulsões para a administração por inalador ou na administração oral.

O objectivo que está na base da invenção foi assim o de disponibilizar cristais isentos de zinco do análogo de insulina descrito. Neste caso, dever-se-á também evitar uma substituição de iões de zinco por outros iões bivalentes que sejam inadequados para formulações farmacêuticas devido à sua toxicidade.

Verificou-se então surpreendentemente que o análogo de insulina descrito pode ser preparado em cristais hexaméricos que não contêm quaisquer iões bivalentes, tal como, p. ex., iões de zinco.

Esta nova forma cristalina de insulina humana Lys B3, Glu B29 é isomórfica, em termos cristalográficos, em relação ao tipo de insulina 2Zn clássico que está descrito na literatura para a insulina de porco e insulina humana [Baker et al., Phil.Trans.Roy.Soc. 319, 369-454(1988)]. Os novos cristais hexaméricos isentos de zinco pertencem ao grupo espacial romboédrico R3 (nº 146) com dois monómeros de insulina por cada unidade assimétrica. Os eixos celulares elementares a -70 °C (por aplicação do método de congelamento em choque) foram determinados como sendo: $A = 81,5 \text{ \AA}$, $C = 33,3 \text{ \AA}$. A análise estrutural por raios X da nova forma cristalina para uma resolução a $1,8 \text{ \AA}$ mostrou que, no lugar dos iões Zn^{2+} (no tipo clássico 2Zn) com distâncias de ligação (Zn^{2+} -His-B10) por volta de $2,0 \text{ \AA}$, na nova forma cristalina de insulina humana Lys B3,

Glu B29 se encontra apenas um pico de densidade electrónica muito pequeno, que corresponde a uma molécula de água (H_2O) (distância de ligação H_2O -His-B10 por volta de 2,3 Å). Tanto a quantidade da densidade electrónica como também a distância de ligação mostram um arranjo estrutural da região em redor da cadeia lateral histidina-B10, desconhecido, até à data, para uma insulina com cadeia lateral glutamato-B21.

A densidade electrónica (1σ -2Fo-Fc) da região em redor da histidina B-10 é significativamente diferente da do tipo 2Zn clássico, no qual um ião de Zn^{2+} é coordenado de forma octaédrica com, respectivamente, três histidinas B10 simetricamente adjacentes e, respectivamente, três moléculas de água. As distâncias de ligação (Zn^{2+} -His-B10) das estruturas do tipo 2Zn depositadas no banco de dados PDB [Bernstein *et al.*, J.Mol.Biol, 112, 535-542 (1977)] situam-se entre 1,9 e 2,1 Å e são significativamente diferentes das distâncias de ligação por volta de 2,3 Å observadas na nova estrutura cristalina isenta de zinco. É especial na nova forma cristalina hexamérica na insulina humana Lys B3, Glu B29, aqui descrita, o facto de esta conter hexâmeros de insulina sem os catiões bivalentes (p. ex. Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}) de outro modo necessários para o efeito. Até à data assumia-se que a formação de hexâmeros de insulina sem catiões bivalentes só era possível se as forças repulsoras da cadeia lateral glutamato-B21 fossem reduzidas por engenharia proteica (p. ex. pela troca de B21-Glu por Gln) [Bentley *et al.*, J. Mol. Biol. 228, 1163-1176 (1992)]. A conservação da cadeia lateral Glu-B21, a qual fomenta a decomposição de hexâmeros de insulina, é contudo importante, sobretudo para as insulinas de acção rápida, para manter uma cinética rápida do fluxo de entrada e de saída.

São por conseguinte objecto da invenção, os cristais do análogo de insulina, insulina humana Lys B3, Glu B29, estando os cristais presentes no grupo espacial R3 (nº 146) com os eixos celulares $A = 81,5 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ e $C = 33,3 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ e em que as moléculas do análogo de insulina estão presentes na forma de hexâmeros isentos de zinco, constituídos por três dímeros, respectivamente.

São um objecto adicional da invenção, os cristais, tal como descritos acima, em que os resíduos histidina B10 de três moléculas do análogo de insulina, respectivamente, estão ligados num hexâmero com uma molécula de água, um ião de di-hidrogenofosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^{4-}$), um ião mono-hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) ou um ião sulfato (SO_4^{2-}) através de ligações por pontes de hidrogénio.

São um objecto adicional da invenção, os cristais, tal como descritos acima, em que os resíduos de histidina B10 das moléculas do análogo de insulina estão respectivamente enroladas de volta sobre o próprio dímero, num hexâmero, e não existe qualquer formação de pontes de hidrogénio dos resíduos de histidina B10 para uma molécula de água.

Os cristais de acordo com a invenção contêm, neste caso, em particular, um análogo de insulina caracterizado por a cadeia B apresentar a sequência

**Phe Val Lys 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 Glu Thr
(SEQ ID nº 3).**

É um objecto adicional da invenção, uma preparação farmacêutica caracterizada por estar conter, pelo menos, um cristal, tal como descrito acima, em que, de um modo preferido, pode estar contida uma substância auxiliar que facilita a absorção do análogo de insulinas no sangue e, de um modo muito particularmente preferido, em que a formulação farmacêutica apresenta uma actividade insulínica com rápida entrada em acção.

É um objecto adicional da invenção, uma preparação farmacêutica caracterizada por esta conter, pelo menos, um cristal, tal como descrito acima, e uma substância auxiliar que pode ser aplicada em formulações inalativas e/ou orais de insulina ou de análogos de insulina.

É um objecto adicional da invenção, um processo para a preparação de um cristal, tal como descrito acima, no qual

- (a) um pó amorfo, isento de zinco, de um análogo de insulina, tal como descrito acima, é dissolvido em água numa concentração de 15-25 mg/mL,
- (b) é efectuada uma precipitação com um precipitante adequado, e
- (c) os cristais são isolados e secos;

em que o análogo de insulina é, em particular, insulina humana Lys B3, Glu B29.

É um objecto adicional da invenção, um processo para a preparação de um cristal, tal como descrito acima, no qual o precipitante é seleccionado de um grupo contendo

- (a) di-hidrogenofosfato de amónio,
- (b) uma combinação de di-hidrogenofosfato de amónio e citrato trissódico; e
- (c) uma combinação de sulfato de amónio e polietilenoglicol de diversos pesos moleculares;

em que, como precipitante, se aplica, de um modo preferido, di-hidrogenofosfato de amónio ou hidrogenofosfato de diamónio, a valores de pH entre 3,0 e 8,0, ou di-hidrogenofosfato de amónio/hidrogenofosfato de diamónio, em combinação com citrato trissódico, a um valor de pH de $5,5 \pm 1,5$, ou sulfato de amónio em combinação com PEG de diversos pesos moleculares, a um valor de pH de $6,0 \pm 1,5$.

É também objecto da invenção, a utilização de um cristal, tal como descrito acima, para a preparação de um produto farmacêutico para o tratamento de diabetes dos tipos I e/ou II.

A invenção é explicada mais detalhadamente com base nos exemplos, sem ficar restringida aos mesmos.

Exemplo 1: Preparação da nova forma cristalina hexamérica isenta de zinco:

Dissolve-se pó amorfo, isento de zinco, de insulina humana Lys B3, Glu B29 de forma não tamponada em água destilada/HCl a um pH por volta de 2,0. Este processo permite a formação de uma solução límpida para concentrações de insulina por volta de 20 mg/mL. A cristalização tem lugar segundo o método da gota suspensa, em placas Linbro de 24 poços. Como precipitante utiliza-se o seguinte reagente do "Protein Crystallization

Screening Kit" da firma Hampton Research Inc.:
1. di-hidrogenofosfato de amónio 0,4 M, pH 4,2.

Exemplo 2: Preparação da nova forma cristalina hexamérica isenta de zinco:

Dissolve-se pó amorfo, isento de zinco, de insulina humana Lys B3, Glu B29 de forma não tamponada em água destilada/HCl a um pH por volta de 2,0. Este processo permite a formação de uma solução límpida para concentrações de insulina por volta de 20 mg/mL. A cristalização tem lugar segundo o método da gota suspensa, em placas Linbro de 24 poços. Como precipitante utiliza-se o seguinte reagente do "Protein Crystallization Screening Kit" da firma Hampton Research Inc.: di-hidrogenofosfato de amónio 1 M, citrato trissódico 0,1 M, pH 5,6.

Exemplo 3: Preparação da nova forma cristalina hexamérica isenta de zinco:

Dissolve-se pó amorfo, isento de zinco, de insulina humana Lys B3, Glu B29 de forma não tamponada em água destilada/HCl a um pH por volta de 2,0. Este processo permite a formação de uma solução límpida para concentrações de insulina por volta de 20 mg/mL. A cristalização tem lugar segundo o método da gota suspensa, em placas Linbro de 24 poços. Como precipitante utiliza-se o seguinte reagente do "Protein Crystallization Screening Kit" da firma Hampton Research Inc.: sulfato de amónio 0,2 M, 20% de PEG 3350, pH 6,0.

Exemplo 4: Análise estrutural por raios X

Os cristais obtidos de acordo com os exemplos 1-3 estão bem ordenados e possibilitam uma análise estrutural por raios X que revela um arranjo estrutural da região em redor da cadeia lateral de histidina B10, desconhecido, até à data, para uma insulina com cadeia lateral glutamato-B21.

Os cristais de insulina humana, contendo zinco, do tipo 2Zn apresentam, como grupo espacial, R3 (146) e eixos celulares de $A = 82,5$, $C = 34,0$ Å. Os cristais do composto I isentos de zinco são isomórficos e apresentam tipicamente eixos celulares de $A = 81,5$, $C = 33,3$ Å. As moléculas de insulina na estrutura cristalina, contendo zinco, de insulina humana e na estrutura cristalina, isenta de zinco, de insulina humana Lys B3, Glu B29 estão enroladas no assim denominado tipo T_6 ou 2Zn. Na insulina 2Zn (T_6) todos os 6 monómeros estão presentes no estado, assim denominado, T = tensionado. A extremidade N-terminal da cadeia B está estendida sem qualquer característica estrutural secundária significativa, não está presente qualquer estrutura secundária em hélice α , como no estado R alternativo. As diferenças significativas nas estruturas cristalinas da insulina humana e do composto I resultam do arranjo da região em redor da cadeia lateral de histidina-B10.

Para todos os métodos de preparação de acordo com os exemplos 1-3 estão disponíveis análises estruturais por raios X de alta resolução, de monocristais, que comprovam o estado isento de zinco destes cristais hexaméricos de insulina. Como eixos celulares elementares e simetria do cristal determinou-se:

Processo de preparação 1: $A = 81,52$, $C = 33,31 \text{ \AA}$, R3 (grupo espacial n° 146)

Processo de preparação 2: $A = 81,51$, $C = 33,43 \text{ \AA}$, R3 (grupo espacial n° 146)

Processo de preparação 3: $A = 81,38$, $C = 33,22 \text{ \AA}$, R3 (grupo espacial n° 146).

Lisboa, 12 de Abril de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Cristais do análogo de insulina, insulina humana LysB3, GluB29, em que os cristais estão presentes no grupo espacial R3 (n° 146) com os eixos celulares $A = 81,5 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ e $C = 33,3 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$, em que as moléculas do análogo de insulina estão presentes na forma de hexâmeros isentos de zinco, constituídos por três dímeros, respectivamente.
2. Cristais de acordo com a reivindicação 1, em que os resíduos de histidina B10 de três moléculas do análogo de insulina, respectivamente, estão ligados num hexâmero através de ligações por pontes de hidrogénio a uma molécula de água.
3. Cristais de acordo com a reivindicação 1, em que os resíduos de histidina B10 de três moléculas do análogo de insulina, respectivamente, estão ligados num hexâmero através de ligações por pontes de hidrogénio a um ião de di-hidrogenofosfato (H_2PO_4^-).
4. Cristais de acordo com a reivindicação 1, em que os resíduos de histidina B10 de três moléculas do análogo de insulina, respectivamente, estão ligados num hexâmero através de ligações por pontes de hidrogénio a um ião mono-hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}).
5. Cristais de acordo com a reivindicação 1, em que os resíduos de histidina B10 de três moléculas do análogo de insulina,

respectivamente, estão ligados num hexâmero através de ligações por pontes de hidrogénio a um ião sulfato (SO_4^{2-}).

6. Cristais de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 até 5, em que os resíduos de histidina B10 das moléculas do análogo de insulina estão respectivamente enroladas de volta sobre o próprio dímero, num hexâmero, e não existe qualquer formação de pontes de hidrogénio dos resíduos de histidina B10 para uma molécula de água.
7. Preparação farmacêutica caracterizada por esta conter, pelo menos, um cristal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 6.
8. Preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por esta conter ainda uma substância auxiliar que facilita a absorção do análogo de insulina no sangue.
9. Preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por esta conter, pelo menos, um cristal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 6 e uma substância auxiliar que pode ser aplicada em formulações inalativas e/ou orais de insulina ou de análogos de insulina.
10. Utilização de um cristal de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 até 6 para a preparação de uma preparação farmacêutica a qual apresenta uma actividade insulínica com rápida entrada em acção.
11. Processo para a preparação de um cristal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 6, no qual

- (a) um pó amorfo, isento de zinco, do análogo de insulina, de acordo com as reivindicações 1 até 10, é dissolvido em água numa concentração de 15-25 mg/mL,
- (b) é efectuada uma precipitação com um precipitante adequado, e
- (c) os cristais são isolados e secos.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11, no qual o precipitante é seleccionado de um grupo contendo

- (a) di-hidrogenofosfato de amónio,
- (b) uma combinação de di-hidrogenofosfato de amónio e citrato trissódico; e
- (c) uma combinação de sulfato de amónio e polietilenoglicol de diversos pesos moleculares.

13. Processo para a preparação dos cristais de acordo com uma ou várias das reivindicações 1, 3, 4 e 6, segundo um processo de acordo com a reivindicação 12, em que, como precipitante, se aplica di-hidrogenofosfato de amónio ou hidrogenofosfato de diamónio, a valores de pH entre 3,0 e 8,0.

14. Processo para a preparação dos cristais de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 até 6, segundo um processo de acordo com a reivindicação 12, em que, como precipitante, se aplica di-hidrogenofosfato de amónio/hidrogenofosfato de diamónio em combinação com citrato trissódico, a um valor de pH de $5,5 \pm 1,5$, ou sulfato de amónio em combinação com PEG de diversos pesos moleculares, a um valor de pH de $6,0 \pm 1,5$.

15. Utilização de um cristal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6 para a preparação de um produto farmacêutico para o tratamento de diabetes dos tipos I e/ou II.

Lisboa, 12 de Abril de 2010

RESUMO

"CRISTAIS DE ANÁLOGOS DE INSULINA E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"

A invenção refere-se a cristais de um análogo de insulina, no qual a asparagina (Asn) está trocada na posição B3 da cadeia B por um resíduo de aminoácido básico de ocorrência natural e, pelo menos, um resíduo de aminoácido nas posições B27, B28 ou B29 da cadeia B está trocado por um outro resíduo de aminoácido neutro ou ácido de ocorrência natural, em que a fenilalanina (Phe) na posição B1 da cadeia B pode estar facultativamente ausente, em que os cristais estão presentes no grupo espacial R3 (n° 146) com as eixos celulares $A = 81,5 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ e $C = 33,3 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$, à sua preparação e utilização, bem como a uma composição farmacêutica contendo estes cristais.