

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2009.06.09	(73) Titular(es): ELI LILLY AND COMPANY LILLY CORPORATE CENTER INDIANAPOLIS, IN 46285 US
(30) Prioridade(s): 2008.06.13 US 61281 P 2008.12.10 US 121394 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2011.03.02	(72) Inventor(es): JOHN MICHAEL BEALS US GORDON BUTLER ER US BRANDON DOYLE US RYAN JOHN HANSEN US SHUN LI US
(45) Data e BPI da concessão: 2012.04.25 095/2012	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS LISPRO DE INSULINA PEGUILADA**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO ESTÁ RELACIONADO COM O CAMPO DOS DIABETES. MAIS PARTICULARMENTE, O INVENTO ESTÁ RELACIONADO COM COMPOSTOS DE INSULINA LISPRO PEGUILADA QUE SÃO PEGUILADOS COM POLIETILENOGLICOL DE ELEVADA MASSA MOLECULAR, SÃO ALTAMENTE SOLÚVEIS A PH FISIOLÓGICO, POSSUEM UMA DURAÇÃO DE ACTUAÇÃO PROLONGADA E SÃO CARACTERIZADOS POR RELAÇÕES PICO-VALE FARMACOCINÉTICAS, FARMACODINÂMICAS E/OU DE ACTIVIDADE INFERIORES A 2. O INVENTO TAMBÉM ESTÁ RELACIONADO COM MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE TAIS MOLÉCULAS, COM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO AS MESMAS E COM AS SUAS UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS.

RESUMO

"COMPOSTOS LISPRO DE INSULINA PEGUILADA"

O presente invento está relacionado com o campo dos diabetes. Mais particularmente, o invento está relacionado com compostos de insulina lispro peguilada que são peguilados com polietilenoglicol de elevada massa molecular, são altamente solúveis a pH fisiológico, possuem uma duração de actuação prolongada e são caracterizados por relações pico-vale farmacocinéticas, farmacodinâmicas e/ou de actividade inferiores a 2. O invento também está relacionado com métodos de obtenção de tais moléculas, com composições farmacêuticas contendo as mesmas e com as suas utilizações terapêuticas.

DESCRIÇÃO**"COMPOSTOS DE INSULINA LISPRO PEGUILADA"**

O presente invento está relacionado com o campo dos diabetes. Mais particularmente, o invento está relacionado com compostos lispro de insulina peguilada que são altamente solúveis e possuem um perfil de actuação prolongado, com métodos de obtenção de tais moléculas, com composições farmacêuticas contendo as mesmas e com a utilização terapêutica de tais compostos.

Para se conseguir uma glicemia normal, a terapia de reposição de insulina destina-se a repor tanto quanto possível o padrão de secreção de insulina endógena de indivíduos normais. A necessidade fisiológica diária de insulina flutua e pode ser separada em duas fases: (a) a fase absortiva que requiere um pulso de insulina para gerir o aumento repentino de glucose no sangue relacionada com a refeição e (b) a fase pós-absortiva que requer uma quantidade constante de insulina para regular a produção de glucose hepática para manutenção do nível óptimo de glucose sanguínea em jejum. Assim, a terapia eficaz com insulina dos diabéticos, geralmente, envolve o uso combinado de dois tipos de formulações de insulina exógena: insulina de acção rápida na altura das refeições, proporcionada pelas injeções de bolus e uma insulina de acção prolongada,

administrada através de injeção, uma ou duas vezes ao dia para controlar os níveis de glucose no sangue entre as refeições.

As terapias de reposição de insulina actualmente disponíveis são deficientes em um ou mais aspectos clínicos importantes. Por exemplo, as formulações de insulina tradicionais de acção intermédia e prolongada, tais como o análogo da insulina basal, insulina detemir, possuem uma duração de actividade que é insuficiente para proporcionar controlo da glucose basal durante um dia inteiro quando administrado diariamente. Como consequência, a duração da acção da insulina basal é muitas vezes insuficiente para controlar adequadamente a hiperglicemia e, mais especificamente, as necessidades da fase pós-absortiva, com uma única injeção diária. Ainda, a omissão de uma única injeção das terapias actuais pode conduzir ao aumento significativo nos níveis de "pico-vale" do fármaco, resultando no descontrolo da glucose. Ainda, a utilização de estratégias de insolubilidade para prolongar a libertação de insulina em formulações de insulina de acção intermédia e prolongada, e.g., suspensões cristalinas de insulina com protamina neutra de Hagedorn (NHP) e ULTRALENTE®, ou a estratégia de precipitação *in vivo* da insulina glargina, aumenta a variabilidade intra-injeção resultando em aumento da variabilidade no perfil de dose-resposta. Mais especificamente, as suspensões de NHP e ULTRALENTE® requerem mistura mecânica para assegurar a uniformidade do produto, possuem maior variabilidade intra-indivíduo e tendem a originar picos em

lugar de proporcionarem um perfil farmacodinâmico "plano" necessário para manter a glucose óptima no sangue em jejum durante um período prolongado de tempo entre refeições. Assim, as formulações de insulina que se baseiam num estado insolúvel para prolongar a distribuição de insulina são inerentemente menos previsíveis do que as formulações solúveis e resultam num controlo menos adequado da glucose sanguínea e numa maior susceptibilidade a episódios de hipoglicemia que podem ser fatais. Ainda, os análogos modernos da insulina basal não são facilmente misturáveis com formulações de acção rápida ou imediata. Assim, as terapêuticas actuais de reposição de insulina ainda deixam os doentes diabéticos susceptíveis a episódios hipoglicémicos que podem ser fatais, complicações médicas graves a longo prazo dos diabetes e/ou impõem considerável inconveniência e desvantagens na qualidade de vida do doente.

A Patente dos Estados Unidos N° 4179337 intitulada "Polipéptidos não imunogénicos" descreve insulina conjugada com moléculas de PEG lineares tendo uma massa molecular entre cerca de 500 e cerca de 20000 Da. Hinds e Kim descreveram insulina conjugada com monometoxipoli(etilenoglicol) de baixa massa molecular (600 Da, 750 Da e 2000 Da) (Hinds, K.D., e Kim *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:505-530 (2002)). Neste artigo, os autores estabeleceram que restringiram o seu estudo a conjugados de insulina com mPEG de baixa massa molecular "devido à ligação de mPEG de massa molecular mais elevada (5000 Da) ter-se encontrado [previamente] como baixando considera-

velmente a bioactividade do conjugado". O Pedido de Patente Internacional PCT Publicação N° WO 2006/079641 descreve a conjugação de derivados de insulina, incluindo insulina lispro, com pequenos polímeros ramificados. O Pedido de Patente Internacional PCT Publicação N° WO 2004/091494 descreve, *inter alia*, moléculas de insulina conjugadas com moléculas de PEG lineares e ramificadas tendo uma massa molecular total de PEG até cerca de 10 kDa e cerca de 20 kDa, respectivamente. Os Pedidos de Patente Internacional PCT Publicações Nos WO 2008/015099 (publicada em 7 de Fevereiro 2008) e WO 2008/084051 (publicada em 17 de Julho 2008) descrevem, *inter alia*, vários análogos de insulina conjugados com moléculas de PEG tendo uma massa molecular nominal na gama entre cerca de 200 e cerca de 40000 Da.

Claramente, existe ainda uma necessidade crítica de insulinas de duração prolongada que sejam mais adequadas para os regimes de reposição de insulina. Em particular, são necessárias insulinas basais solúveis que sejam misturáveis com formulações de insulina prandial, possuam perfis de acção prolongados no tempo (*i.e.* sejam capazes de controlar adequadamente os níveis de glucose no sangue com uma dose diária ou injeções menos frequentes), actividade mais plana, perfis farmacocinéticos (*i.e.*, relações "pico-vale" mais baixas), variabilidade intra-doente reduzida (*i.e.*, perfil de tempo-acção mais previsível traduzindo-se em incidência reduzida de hipoglicemia e/ou aumento de peso) e/ou menor irritação no local de injeção ou dor quando da injeção.

Descrevemos aqui a descoberta de que a insulina lispro pode ser peguilada com derivados do poli(etileno-glicol) de elevada massa molecular para proporcionar compostos de insulina lispro peguilada que possuem actividade de insulina basal terapeuticamente eficaz, perfis de tempo-acção prolongados, são altamente solúveis a pH fisiológico e/ou são misturáveis com outras formulações de insulina prandiais.

De acordo com um primeiro aspecto, o presente invento proporciona um composto da Fórmula I:

$P-[(A)-(B)]$ ou um seu sal farmacologicamente aceitável, em que:

A é a cadeia A da insulina lispro e possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1;

B é a cadeia B da insulina lispro e tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3; e

P é um PEG com uma massa molecular na gama entre cerca de 20 kDa e cerca de 40 kDa e em que A e B estão adequadamente ligadas de forma cruzada e P está ligado, directamente ou indirectamente, através de uma ligação covalente ao grupo alfa-amino da glicina na posição 1 de A, ao grupo alfa-amino da fenilalanina na posição 1 de B ou ao grupo épsilon-amina da lisina na posição 28 de B.

De preferência, o composto de insulina lispro do presente invento possui um PEG tendo uma massa molecular na gama entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 25 kDa. Mais de preferência, o PEG possui uma massa molecular na gama entre cerca de 20 kDa e cerca de 25 kDa. Mesmo mais de preferência, o PEG possui uma massa molecular de aproximadamente 20 kDa.

O composto de insulina lispro do presente invento possui uma relação pico-vale inferior a 2 quando da administração parentérica a um doente de uma quantidade terapêuticamente eficaz do composto.

O presente invento proporciona igualmente composições compreendendo uma pluralidade de compostos de insulina lispro mono- e di-peguilada em que mais de cerca de 75% dos compostos de insulina lispro peguilada na composição são compostos mono-peguilados da Fórmula I.

O presente invento também proporciona composições compreendendo compostos de insulina mono-peguilada da Fórmula I em que mais de cerca de 50% dos compostos mono-peguilados na composição possuem um PEG ligado covalentemente, directamente ou indirectamente, ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B.

O presente invento também proporciona composições farmacêuticas compreendendo uma insulina lispro peguilada

da Fórmula I e um ou mais conservantes, agentes de isotonicidade, iões metálicos ou tampões farmacêuticamente aceitáveis. Nalgumas realizações do invento, as composições farmacêuticas compreendendo uma insulina lispro peguilada da Fórmula I e um ou mais conservantes, agentes de isotonicidade, iões metálicos ou tampões ainda compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo da insulina.

De acordo com um segundo aspecto do presente invento, é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo um composto de insulina lispro do presente invento e um ou mais excipientes, diluentes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis.

De preferência, a composição farmacêutica do presente invento ainda compreende um tampão TRIS numa concentração na gama entre cerca de 10 mM e cerca de 25 mM, em que o pH da referida composição farmacêutica varia entre cerca de pH 7,0 e cerca de pH 8,0 e pelo menos um agente de isotonicidade, em que a composição possui uma isotonicidade entre cerca de 270 mOsm e cerca de 330 mOsm. Como alternativa, pode também compreender um tampão de fosfatos numa concentração na gama entre cerca de 5 mM e cerca de 10 mM e em que o pH da referida composição farmacêutica se situa entre aproximadamente pH 7,0 e aproximadamente pH 7,5 e pelo menos um agente de isotonicidade, em que a composição possui isotonicidade entre cerca de 270 mOsm e cerca de 330 mOsm.

A composição farmacêutica do presente invento pode compreender o composto de insulina lispro peguilada numa concentração entre cerca de 15 mg/ml e cerca de 40 mg/ml, zinco numa proporção relativamente ao composto de insulina lispro peguilada entre aproximadamente 0,33 e aproximadamente 0,83 e m-cresol numa concentração entre cerca de 10 mM e cerca de 40 mM, a um pH entre cerca de 7,0 e cerca de 8,0. De preferência, ainda compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz de insulina lispro consistindo numa cadeia A e numa cadeia B, em que a cadeia A tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 e a cadeia B tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3; e em que a cadeia A e a cadeia B estão adequadamente ligadas entre si.

De acordo com um quarto aspecto do presente invento, é proporcionado um processo de produção do composto de insulina lispro peguilada da fórmula:

P-[(A)-(B)] ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em que:

A é a cadeia A da insulina lispro e possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1;

B é a cadeia B da insulina lispro e tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3; e

P é um PEG com uma massa molecular na gama entre

cerca de 20 kDa e cerca de 40 kDa e em que A e B estão adequadamente ligadas de forma cruzada e P está ligado através de uma ligação covalente de uretano ao grupo épsilon-amina da lisina na posição 28 de B, que se caracteriza pela reacção do grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 de B com o carbonato de monometoxipoli(etilenoglicol) p-nitrofenil carbonato (mPEG-NPC), tendo uma massa molecular média entre cerca de 20 kDa e cerca de 40 kDa, num solvente aquoso a um pH ente cerca de 8,5 e cerca de 11,5 e entre cerca de 25°C e cerca de 30°C, durante um período de tempo entre cerca de 3 e cerca de 6 horas.

De preferência, o processo possui uma proporção molar de PEG insulina lispro entre cerca de 2,5 e cerca de 5,0. A massa molecular média do mPEG-NPC é, de preferência, cerca de 20 kDa. O pH da reacção é, de preferência, mantido entre cerca de 10,5 e cerca de 11,5 e esta pode ser conduzida entre cerca de 25°C e cerca de 30°C, durante cerca de 3 horas.

O presente invento proporciona igualmente métodos de tratamento de hiperglicemia, diabetes mellitus ou diabetes gestacional compreendendo a administração a um doente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um composto de insulina lispro peguilada do presente invento.

O presente invento também inclui a utilização de um composto de insulina lispro peguilada do presente invento para terapêutica.

De preferência, o composto de insulina lispro do presente invento é para usar no tratamento de hiperglicemia ou diabetes.

O presente invento também inclui a utilização de um medicamento para o tratamento de hipoglicemia, diabetes mellitus ou diabetes gestacional.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 descreve graficamente perfis simulados de PK humana para PEG-B28-insulina lispro de 20 kDa, PEG-B28-insulina lispro de 40 kDa e insulina detemir, baseados na escala alométrica dos parâmetros PK para ratos e cães. Os perfis representam um intervalo de dosagem após uma semana de dosagem. Os números são relações pico-vale médias.

A Figura 2 é um gráfico das velocidades de infusão de glucose (GIR) em seres humanos após uma dose subcutânea de PEG_{20kDa}-B28 ($\geq 95\%$)/A1 ($\leq 5\%$)-insulina lispro (LY: 0,225 mg/kg) ou insulina glargina (0,5 U/kg). Os perfis GIR são baseados nos dados observados e uma função "modulação LOESS" (Splus 2000, Professional Edition, MathSoft, Inc) desenvolvida dentro dos Lilly Research Laboratories foi usada para ajustar os dados observados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

As abreviaturas que se seguem foram aqui usadas: ACN: Acetonitrilo. Boc: tert-butoxicarbonilo. BSA: albumina sérica bovina. DCM: diclorometano, cloreto de metileno. DMF: N,N-dimetilformamida. DMSO: Dimetilsulfóxido. DTT: Ditiotreitól. EDTA: ácido etilenodiaminatetracético. Et: Etilo. EtOH: etano. Fmoc: 9-fluorometiloxicarbonilo. HCl: ácido clorídrico. Da: Dalton. kDa: quilodalton. Lilly: Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN). mAb: anticorpo monoclonal. Me: Metilo. MeOH: Metanol. PBS: soro fisiológico tamponado com fosfatos. RP-HPLC: cromatografia líquida de alta resolução em fase inversa. SEC: cromatografia de exclusão por tamanho. SEM: erro padrão. SPA: ensaio de cintilação de proximidade. TFA: ácido trifluoroacético. Todas as abreviaturas de aminoácidos usadas nesta descrição são as aceites pela United States Patent and Trademark Office como descrito em 37 C.F.R. §1.822(B)(2).

O termo "insulina" destina-se a incluir insulina selvagem de qualquer espécie incluindo insulina suína, insulina bovina e insulina humana mas não lhes estando limitado. A insulina nativa ou selvagem refere-se a insulina com a sequência de aminoácidos correspondente à sequência de aminoácidos da insulina natural. As sequências de polinucleótidos e de aminoácidos codificadoras da insulina de uma série de espécies diferentes são conhecidas dos familiarizados com a área. Por exemplo, a insulina humana possui uma cadeia A de vinte e um aminoácidos e uma

cadeia B de trinta aminoácidos (SEQ ID NOS: 1 e 2, respectivamente). A insulina pode ser natural (*i.e.* isolada a partir de uma fonte natural), produzida por biossíntese ou por síntese química. O termo "insulina" destina-se igualmente a incluir qualquer derivado de insulina e/ou análogo de insulina.

Um "análogo de insulina" ou "derivado de insulina" é aqui definido como proteína com actividade de insulina e substancialmente a mesma sequência de aminoácidos da insulina humana, mas diferindo da insulina humana numa modificação relativamente à insulina humana que inclui uma ou mais substituições, deleções, inversões ou adições de aminoácidos. Tais compostos são conhecidos na área. Ver, *e.g.*, Pedidos de Patente Internacional Publicações PCT Nos. WO 96/15804 e WO 03/053339; Patente U.S. Nos 3528960, 5514646, 5618913, 5750497, 6011007, 6251856 e Patentes EP Nos. 254516 e 280534. Uma lista exemplificativa e não exaustiva de análogos de insulina, conhecidos dos familiarizados com a área, inclui insulina aspartato, insulina lispro, insulina glargina, insulina detemir e insulina glulisina. Ainda, o termo "insulina" também cobre compostos que podem ser considerados como sendo um derivado de insulina e um análogo de insulina. Exemplos de tais compostos estão descritos nas Patentes U.S. Nos. 5750497 e 6011007. Um exemplo específico de tal composto conhecido na área é a insulina detemir.

Vários análogos e/ou derivados de insulina são

conhecidos como análogos de insulina de "acção rápida" e "acção imediata" são usados indiferentemente. Um "análogo de insulina de acção rápida" produz um efeito na glucose prandial que (a) começa mais cedo após a administração subcutânea do que a insulina humana e/ou (b) apresenta uma duração mais curta de acção do que a insulina humana após administração subcutânea. Exemplos de análogos de insulina de acção rápida incluem "análogos monoméricos da insulina" que são de acção rápida por serem, de um modo geral, menos susceptíveis à dimerização ou à auto-associação em condições fisiológicas. Os análogos de insulina monoméricos são conhecidos na área. Ver, e.g., Patete U.S. N° 5700662 e Patente Europeia N° 214826. A insulina lispro é um análogo monomérico da insulina de acção rápida em que a prolina na posição 28 da cadeia B da insulina selvagem (SEQ ID NO:2) e a lisina na posição 29 da cadeia B selvagem (SEQ ID NO:2) foram trocadas. Assim, a insulina lispro é conhecida na área por várias designações incluindo, mas não estando limitadas a Lys^{B28}Pro^{B29}-insulina humana, LysB28ProB29-insulina humana e insulina humana B28Lys, B29Pro.

O termo "ligadas de forma cruzada" significa ligações dissulfureto existentes entre os resíduos de cisteína. Por exemplo, a insulina humana adequadamente ligada de forma cruzada possui uma ligação dissulfureto entre a cisteína na posição 7 de SEQ ID NO:1 e a cisteína na posição 7 de SEQ ID NO:2, entre a cisteína na posição 20 de SEQ ID NO:1 e a cisteína na posição 19 de SEQ ID NO:2 e a cisteína na posição 6 de SEQ ID NO:1 e a cisteína na

posição 11 de SEQ ID NO:1. De forma semelhante, um composto de insulina lispro possui uma ligação dissulfureto entre a cisteína na posição 7 de SEQ ID NO:1 e a cisteína na posição 7 de SEQ ID NO:3, entre a cisteína na posição 20 de SEQ ID NO:1 e a cisteína na posição 19 de SEQ ID NO:3 e entre a cisteína na posição 6 de SEQ ID NO:1 e a cisteína na posição 11 de SEQ ID NO:3.

Como aqui usado, "insulina lispro conjugada com PEG" ou "insulina lispro peguilada" refere-se a insulina humana lispro, ou um seu derivado, ligada covalentemente a pelo menos um PEG e possuindo actividade de insulina *in vivo*.

As actividades biológicas da insulina e da insulina lispro estão bem estabelecidas. A frase "actividade de insulina" relativamente ao composto de insulina lispro peguilada do presente invento destina-se a significar a capacidade de baixar significativamente os níveis de glucose do sangue em pelo menos um modelo animal *in vivo* dos genericamente aceites incluindo modelos animais de diabetes do Tipo 1 e do Tipo 2 descritos abaixo no Exemplo 5 e no Exemplo 6, respectivamente, mas não lhes estando limitados. Assim, a actividade de insulina inclui a capacidade de um composto de insulina lispro peguilada para reduzir os níveis de glucose no sangue para um nível de 100 mg/dl ou menos num rato tratado com STZ, durante um período de aproximadamente 4 horas até pelo menos 36 horas após uma única injeção subcutânea numa dose de 568 nmol/kg.

O termo "polietilenoglicol" ou "PEG" refere-se a um composto de polialquilenoglicol ou seu derivado, com ou sem agentes de acoplagem ou derivatização com grupos de acoplagem ou de activação. Na sua forma típica, PEG é um polímero linear com grupos hidroxilo terminais e possui a fórmula $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$. O número de subunidades repetidas " n " no PEG é aproximadamente a massa molecular descrita em Daltons. Tipicamente, os reagentes de PEG usados para preparar compostos peguilados compreendem uma mistura heterogénea de PEGs tendo um número diferente (n) de subunidades de etilenoglicol no polímero de PEG. Uma única subunidade de etilenoglicol ($\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}$) de PEG possui uma massa molecular de aproximadamente 44 Daltons. Assim, a massa molecular do polímero de PEG depende do número (n). Os PEGs ligados aos compostos de insulina lispro peguilada do presente invento terão n na gama entre cerca de 400 e cerca de 1000 subunidades. De preferência, os PEGs ligados aos compostos de insulina lispro peguilada do presente invento possuirão n na gama entre cerca de 400 e cerca de 750. Mais de preferência, os PEGs ligados aos compostos de insulina lispro peguilada do presente invento possuirão n na gama entre cerca de 400 e cerca de 550. Mais de preferência, os PEGs ligados aos compostos de insulina lispro Peguilados do presente invento possuirão n entre cerca de 400 e cerca de 500.

Na área são conhecidos numerosos derivados de PEG e métodos para os preparar e conjugar a uma proteína, como seja insulina ou insulina lispro e são adequados para usar no presente invento. Ver, e.g., Pedido de Patente Interna-

cional PCT Pub. Nos. WO 01/6287, WO 2006/028745, WO 2006/096535, WO 2006/036825; Zalipsky, S. *Bioconjugate Chem.* 6:150-165, 1995; Veronese, *et al.*, *Applied Biochem. and Biotech.* 11:141-152, 1985; e Roberts, M. *et al.*, *Advanced Drug Reviews*, 54:459-476, 2002. Um PEG particularmente preferido para usar no invento é um PEG tendo um extremo do polímero que termina com um grupo relativamente inerte, como seja um grupo alcoxilo inferior C₁₋₆. De preferência, o PEG é monometoxi-PEG (normalmente referido como mPEG), o qual é uma forma linear de PEG em que um extremo do polímero é um grupo metoxilo (-OCH₃). Ainda mais de preferência, o PEG usado no invento é um "mPEG activado" em que um extremo do PEG linear termina com um grupo metoxilo e o outro extremo termina com um grupo reactivo, adequado para acoplagem a um local pretendido na insulina lispro ou a um derivado de insulina lispro derivatizado de forma a facilitar a peguilação com um mPEG activado pretendido num local específico da molécula de insulina lispro.

Devido aos PEGs serem tipicamente gerados e usados como misturas de compostos PEG que variam dentro de certos limites relativamente à sua massa molecular, os familiarizados com a área, de um modo geral, descrevem a massa molecular de um PEG ligado a um composto através da descrição do tamanho médio do reagente PEG usado na reacção de peguilação que gerou o composto peguilado particular. Entre as muitas formas possíveis de reportar médias, existem três normalmente usadas: a média numérica, a média mássica e as massas moleculares médias z. Como aqui usado, a frase "massa molecular média" destina-se a referir a

massa molecular média mássica que pode ser medida usando técnicas conhecidas incluindo a espectrometria de massa em matriz com ionização por dessorção a laser - tempo de voo (MALDI-TOF), cromatografia de permeação em gel ou outras técnicas de cromatografia líquida, técnicas de dispersão da luz, ultracentrifugação e viscosimetria, mas não lhes estando limitadas. A fórmula para calcular a massa molecular média mássica pode ser representada como $\Sigma(M_i^2 N_i) / \Sigma(M_i N_i)$ em que N_i é a fracção molar (ou número decimal) de moléculas com massa molecular M_i na mistura. A fórmula para calcular a massa molecular média numérica pode ser representada como $\Sigma(M_i N_i) / \Sigma(N_i)$ em que N_i é a fracção molar (ou a fracção numérica) de moléculas com massa molecular M_i na mistura. A razão entre a massa molecular média mássica e a massa molecular média numérica é conhecida como o índice de polidispersidade (PDI) e proporciona uma indicação pouco rigorosa da amplitude da distribuição. Os reagentes PEG adequados para a preparação dos compostos de insulina lispro peguilados do invento são tipicamente polidispersos (*i.e.*, a massa molecular média numérica e a massa molecular média mássica dos polímeros não são iguais). De preferência, o PDI para os reagentes PEG usados para preparar os compostos ou composições do presente invento é inferior a cerca de 1,1. Mais de preferência, o PDI para os reagentes PEG usados para preparar os compostos ou composições do presente invento é inferior a cerca de 1,05.

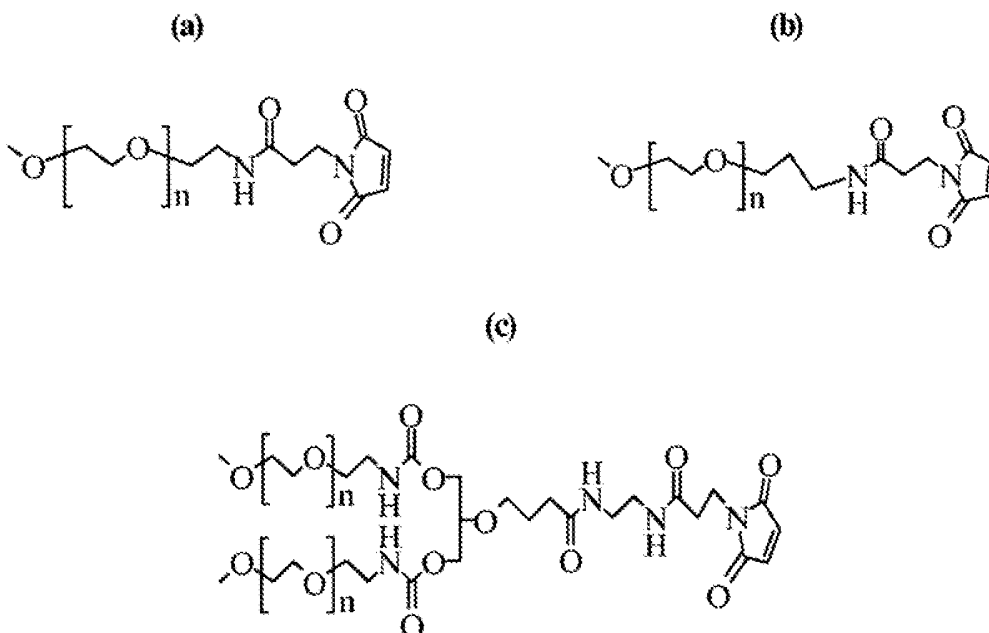
Relativamente aos compostos de insulina lispro peguilada do presente invento, o PEG ligado covalentemente

a uma molécula de insulina lispro possui uma massa molecular na gama entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 40 kDa (*n* situa-se na gama entre cerca de 400 e cerca de 1000) ou o PEG possui uma massa molecular média entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 40 kDa. De preferência, o PEG ligado covalentemente a uma molécula de insulina lispro possui uma massa molecular na gama entre cerca de 20 kDa e cerca de 30 kDa (*n* situa-se na gama entre cerca de 450 e cerca de 750) ou o PEG tem uma massa molecular média entre cerca de 20 kDa e cerca de 30 kDa. Mais de preferência, o PEG ligado covalentemente a uma molécula de insulina lispro possui uma massa molecular na gama entre cerca de 17,4 kDa e cerca de 25 kDa (*n* situa-se na gama entre cerca de 400 e cerca de 550) ou o PEG possui uma massa molecular média entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 25 kDa. Mais de preferência, o PEG ligado covalentemente a uma molécula de insulina lispro possui uma massa molecular na gama entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 20 kDa (*n* situa-se na gama entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 20 kDa).

Nalgumas realizações, os compostos de insulina lispro peguilada do presente invento são preparados pela ligação covalente de um mPEG activado com uma massa molecular média pretendida a insulina lispro. As condições de reacção para a peguilação de insulina lispro variarão dependendo do PEG particular empregue, do local de ligação na insulina lispro, do tipo particular do grupo reactivo na insulina lispro que é o alvo de ligação, do grau pretendido de peguilação e similares, e pode ser facilmente determinado pelos familiarizados com a área. As condições

experimentais optimizadas para uma estratégia de peguilação particular podem ser facilmente determinadas, tipicamente usando experimentação de rotina, por alguém familiarizado com a área.

São aqui descritos compostos de insulina lispro peguilados preparados por conjugação indirecta de um mPEG activado que seja relativamente selectivo para tióis, como seja mPEG-maleimida (mPEG-MAL) ou um mPEG-tiol (mPEG-SH), a insulina lispro através de conjugação do mPEG activado selectivo para tióis a um grupo tiol que foi introduzido na insulina lispro usando modificadores de "amina para tiol", tais como N-succinimidil-S-acetilthiopropionato (SATP) e N-succinimidil-S-acetilthioacetato (SATA). Mais de preferência, o mPEG activado empregue para ligar covalentemente um PEG a um grupo tiol (sulfidriolo) na insulina lispro é uma mPEG-maleimida como seja (a), (b) ou (c) mostrado abaixo.

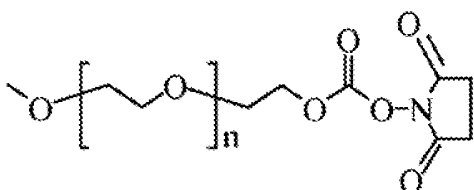


Um método preferido de preparação de compostos de insulina lispro peguilada utiliza adição de Michael para formar uma ligação tioéter estável. A reacção é altamente específica e decorre em condições suaves na presença de outros grupos funcionais. Por exemplo, mPE-maleimida é útil como um mPEG activado para a preparação de conjugados de insulina lispro peguilados do presente invento. De preferência, o procedimento de peguilação usa um excesso molar de uma insulina lispro derivatizada com tiol relativamente a mPEG-maleimida para dirigir a reacção até ao fim. De preferência, as reacções são igualmente realizadas entre pH 4,0 e 9,0 à temperatura ambiente durante 1 a 40 horas. O excesso de péptido contendo tiol não peguilado é facilmente separado do produto peguilado por métodos de separação convencionais. As condições exemplificativas necessárias à peguilação de insulina lispro usando mPEG-maleimida activada estão descritas no Exemplo 1.

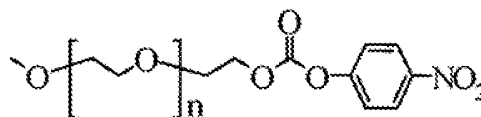
São aqui descritos compostos de insulina lispro peguilada preparados por conjugação de um mPEG activado que é relativamente específico para aminas. mPEGs activados adequados, principalmente para Peguilação específica de aminas da insulina lispro, incluem mPEG-succinimidil propionato (mPEG-SPA), mPEG succinimidil butanoato (mPEG-SBA), mPEG-succinimidil α -metilbutanoato (mPEG-SMB), mPEG-succinimidil carbonato (mPEG-SC), mPEG-benzotriazole carbonato e mPEG-p-nitrofenil carbonato (mPEG-NPC).

Nas realizações preferidas do invento, os mPEGs activados usados para peguilação de insulina lispro resulta numa insulina lispro ligada covalentemente a um mPEG através de uma ligação uretano (igualmente conhecida como carbamato) covalente estável em termos de hidrólise. Mais de preferência, o mPEG activado usado para a peguilação de insulina lispro é mPEG-SC ou mPEG-NPC, ambos resultam numa insulina lispro ligada covalentemente ao PEG através de uma ligação uretano (ou carbamato). Condições exemplificativas úteis para a peguilação de insulina lispro usando mPEG-NPC de várias massas moleculares estão descritas no Exemplo 2.

mPEG-SC:



mPEG-NPC:



Os compostos de insulina lispro peguilada do invento são tipicamente purificados usando uma ou mais técnicas de purificação, tais como cromatografia de troca iónica, cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia de afinidade, cromatografia de interacção hidrofóbica e/ou cromatografia de fase reversa. A heterogeneidade global dos compostos de insulina lispro peguilada (número e proporção de compostos de insulina lispro peguilada gerados a partir de uma reacção de peguilação) numa amostra pode ser avaliada usando um ou mais dos métodos que se seguem: cromatografia, electroforese, espectrometria de massa e, em particular, MALDI-MS e espectroscopia de NMR.

A insulina lispro, usada para preparar os compostos de insulina lispro peguilada do presente invento, pode ser preparada através de qualquer um de uma variedade de técnicas de síntese de péptidos conhecidas incluindo métodos em solução, métodos em fase sólida, métodos semi-sintéticos e métodos de DNA recombinante. Por exemplo, a Patente U.S. N° 5700662 (Chance *et al.*) e a Patente Europeia N° 214826 (Brange, *et al.*), descrevem a preparação de vários análogos da insulina. As cadeias A e B da insulina lispro podem também ser preparadas através de uma molécula precursora do tipo pró-insulina usando técnicas de DNA recombinante. Em realizações preferidas, um precursor do tipo pró-insulina é usado para preparar a insulina lispro usada para preparar a insulina lispro peguilada do presente invento.

O presente invento proporciona um composto da Fórmula I:

$P-[(A)-(B)]$ ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em que:

A é a cadeia A da insulina lispro (SEQ ID NO:1);

B é a cadeia B da insulina lispro (SEQ ID NO:3);

e

P é um PEG com uma massa molecular na gama entre

cerca de 17,5 kDa e cerca de 40 kDa e em que A e B estão adequadamente ligadas de forma cruzada e P está ligado directamente, através de uma ligação covalente, ao grupo épsilon-amina da lisina na posição 28 da cadeia B. São aqui descritos compostos em que (a) P está covalentemente ligado a insulina lispro através de uma ligação uretano ou tioéter; e (b) o composto é caracterizado por ter um K_i para o receptor da insulina humana de cerca de 30 nM, cerca de 20 nM, cerca de 10 nM ou cerca de 5 nM ou menos, uma semi-vida de eliminação superior a cerca de 6 horas, cerca de 8 horas, cerca de 10 horas, cerca de 2 horas ou cerca de 14 horas num rato tratado com STZ doseado a cerca de 568 nmol/kg ou através da actividade de abaixamento da glucose sanguínea para um nível de cerca de 100 mg/dl ou menor num rato tratado com STZ, durante um período que varia entre 4 horas e pelo menos cerca de 36 horas, cerca de 48 horas, cerca de 60 horas, cerca de 72 horas, cerca de 84 horas, cerca de 96 horas, cerca de 108 horas ou cerca de 120 horas após uma única injeção subcutânea do composto numa dose de cerca de 568 nmol/kg. Os compostos preferidos são aqueles em que: (a) P está ligado covalentemente a insulina lispro via uma ligação uretano; (b) o composto é caracterizado por ter um K_i para o receptor da insulina humana de aproximadamente 10 nM ou inferior; (c) o composto caracteriza-se por ter uma semi-vida de eliminação superior a 6 horas num rato tratado com STZ doseado a cerca de 568 nmol/kg; e (d) o composto caracteriza-se pela actividade de abaixamento da glucose sanguínea para um nível de aproximadamente 100 mg/dl ou menos num rato tratado com STZ, durante um período

que varia entre cerca de 4 horas e pelo menos cerca de 48 horas, cerca de 60 horas, cerca de 72 horas, cerca de 84 horas, cerca de 96 horas, cerca de 108 horas ou cerca de 120 horas após uma única injeção subcutânea do composto numa dose de cerca de 568 nmol/kg. Os compostos mais preferidos são aqueles em que: (a) P está ligado covalentemente a insulina lispro via uma ligação uretano; (b) o composto é caracterizado por ter um K_i para o receptor da insulina humana de aproximadamente 10 nM ou menos; (c) o composto caracteriza-se por ter uma semi-vida de eliminação superior a 6 horas num rato tratado com STZ doseado a cerca de 568 nmol/kg; e (d) o composto caracteriza-se pela actividade de abaixamento da glucose no sangue para um nível de aproximadamente 100 mg/dl ou menos num rato tratado com STZ durante um período que varia entre cerca de 4 horas e pelo menos cerca de 48 horas, cerca de 60 horas, cerca de 72 horas, cerca de 84 horas, cerca de 96 horas, cerca de 108 horas ou cerca de 120 horas após uma única injeção subcutânea do composto numa dose de cerca de 568 nmol/kg e (e) o composto caracteriza-se por ter uma semi-vida de eliminação superior a cerca de 24 horas, cerca de 30 horas, cerca de 32 horas, cerca de 34 horas, cerca de 36 horas, 38 horas, cerca de 40 horas ou cerca de 42 horas num ser humano quando da administração de uma única dose parentérica a 0,225 mg/kg.

De acordo com as características e princípios consistentes com o invento, uma realização do invento proporciona um composto de insulina lispro mono-peguilada,

compreendendo um PEG tendo uma massa molecular média de aproximadamente 17,5 kDa, cerca de 20 kDa, cerca de 25 kDa, cerca de 30 kDa ou cerca de 40 kDa ligado covalentemente directamente ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B da insulina lispro (PEG-LysB28 insulina lispro). É aqui descrita insulina lispro mono-peguilada compreendendo PEG com uma massa molecular média de aproximadamente 17,5 kDa, cerca de 20 kDa, cerca de 25 kDa, cerca de 30 kDa ou cerca de 40 kDa ligado directamente ou indirectamente ao grupo alfa-amino na posição 1 da cadeia B da insulina lispro ou ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B de insulina lispro. Mais de preferência, a insulina lispro mono-peguilada compreende um PEG tendo uma massa molecular média de aproximadamente 17,5 kDa, cerca de 20 kDa, cerca de 15 kDa, cerca de 30 kDa ou cerca de 40 kDa ligado ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B de insulina lispro. Ainda mais de preferência, a insulina lispro mono-peguilada compreende um PEG tendo uma massa molecular média de aproximadamente 17,5 kDa ou cerca de 20 kDa ligado ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B da insulina lispro (20 kDa-PEG-LysB28 insulina lispro). Mais de preferência, a insulina lispro mono-Peguilada compreende um PEG tendo uma massa molecular média de aproximadamente 20 kDa ligado ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B da insulina lispro (*i.e.*, PEG_{20kDa}-LysB28 insulina lispro).

São aqui descritos compostos de insulina lispro mono-peguilada compreendendo um PEG tendo uma massa

molecular de aproximadamente 17,5 kDa, cerca de 20 kDa, cerca de 25 kDa, cerca de 30 kDa ou cerca de 40 kDa ligado covalentemente, directamente ou indirectamente, ao grupo alfa-amino da glicina na posição 1 da cadeia A da insulina lispro, ao grupo alfa-amino da fenilalanina na posição 1 da cadeia B da insulina lispro ou ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B da insulina lispro. De preferência, a insulina lispro mono-peguilada compreende um PEG tendo uma massa molecular de aproximadamente 17,5 kDa, cerca de 20 kDa, cerca de 25 kDa, cerca de 30 kDa ou cerca de 40 kDa ligado, directamente ou indirectamente, ao grupo alfa-amino da fenilalanina na posição 1 da cadeia B da insulina lispro ou ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B da insulina lispro. Mais de preferência, a insulina lispro mono-peguilada compreende um PEG tendo uma massa molecular de aproximadamente 17,5 kDa, cerca de 20 kDa, cerca de 25 kDa, cerca de 30 kDa ou cerca de 40 kDa ligado ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B da insulina lispro. Mais de preferência, a insulina lispro mono-peguilada compreende um PEG tendo uma massa molecular de aproximadamente 20 kDa ligado ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B da insulina lispro e a PEG-LysB28-insulina lispro caracteriza-se por ter uma semi-vida de eliminação superior a cerca de 24 horas, cerca de 30 horas, cerca de 32 horas, cerca de 34 horas, cerca de 36 horas, 38 horas, cerca de 40 horas ou cerca de 42 horas num ser humano quando da administração de uma única dose subcutânea da composição a 0,225 mg/kg.

São aqui descritas composições compreendendo compostos de insulina lispro mono-peguilada em que a ligação do PEG ocorre em locais diferentes e/ou uma mistura de compostos de insulina lispro mono-peguilada, di-peguilada e tri-peguilada. São exemplos de composições de acordo com o invento as que compreendem mais de um composto de insulina lispro peguilada seleccionados do grupo consistindo em: i) insulina lispro PEG-GlyA1, ii) insulina lispro PEG-PheB1, iii) insulina lispro PEG-LysB28, iv) insulina lispro di-PEG-GlyA1PheB1, v) insulina lispro di-PEG-GlyA1LysB28, vi) insulina lispro di-PEG-PheB1LysB28 e vii) insulina lispro di-PEG-GlyA1PheB1. Mais de preferência, as composições do presente invento compreendem uma mistura de compostos de insulina lispro peguilada em que mais de aproximadamente 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% ou cerca de 97% dos compostos de insulina lispro peguilados são compostos de insulina lispro mono-peguilados da Fórmula I. Ainda mais de preferência, as composições do presente invento compreendem uma mistura de compostos de insulina lispro peguilados em que mais de aproximadamente 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% ou cerca de 97% dos compostos de insulina lispro peguilada são compostos de insulina lispro mono-peguilada e menos de aproximadamente 20%, cerca de 15%, cerca de 10%, cerca de 5% ou cerca de 3% dos compostos de insulina lispro totais peguilados são di-peguilados. Ainda mais de preferência, as composições compreendem uma mistura de compostos de insulina lispro peguilada em que mais de

aproximadamente 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% ou cerca de 97% dos compostos de insulina lispro peguilada são insulina lispro PEG-LysB28. Ainda mais de preferência, as composições compreendem uma mistura de compostos de insulina lispro peguilada em que mais de aproximadamente 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% ou cerca de 97% dos compostos de insulina lispro peguilados são insulina lispro PEG-LysB28 e menos de aproximadamente 20%, cerca de 15%, cerca de 10%, cerca de 5% ou cerca de 3% dos compostos de insulina lispro totais peguilados são insulina lispro PEG-GlyA1. Ainda mais de preferência, as composições compreendem uma mistura de compostos de insulina lispro peguilados em que mais de aproximadamente 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% ou cerca de 97% dos compostos de insulina lispro peguilados são insulina lispro PEG-LysB28 e menos de aproximadamente 20%, cerca de 15%, cerca de 10%, cerca de 5% ou cerca de 3% dos compostos de insulina lispro totais peguilada são insulina lispro PEG-GlyA1 e menos de cerca de 10%, cerca de 5% ou cerca de 3% dos compostos de insulina lispro totais peguilada são compostos de insulina lispro di-peguilados. Mesmo mais de preferência, as composições compreendem uma mistura de compostos de insulina lispro peguilada em que cerca de 80% dos compostos totais de insulina lispro peguilada são insulina lispro PEG-LysB28, cerca de 10% são insulina lispro PEG-GlyA1 e cerca de 10% são compostos de insulina lispro di-PEG-GlyA1LysB28. Ainda mais de preferência, as composições compreendem uma mistura de compostos de insulina lispro peguilada em que cerca de

90% ou mais dos compostos totais de insulina lispro peguilados são insulina lispro PEG-LysB28, cerca de 5% ou menos são insulina lispro PEG-GlyA1 e cerca de 5% ou menos são compostos de insulina lispro di-PEG-GlyA1LysB28. Ainda mais de preferência, as composições compreendem uma mistura de compostos de insulina lispro peguilada em que cerca de 90% ou mais dos compostos totais de insulina lispro peguilada são insulina lispro PEG-LysB28, cerca de 5% ou menos são insulina lispro PEG-GlyA1, cerca de 5% ou menos são compostos de insulina lispro di-PEG-GlyA1LysB28 e em que a insulina lispro PEG-LysB28 se caracteriza por possuir uma semi-vida de eliminação superior a cerca de 24 horas, cerca de 30 horas, cerca de 32 horas, cerca de 34 horas, cerca de 36 horas, cerca de 38 horas, cerca de 40 horas ou cerca de 42 horas num ser humano quando da administração subcutânea de uma única dose da composição a 0,225 mg/kg. Mais de preferência, as composições compreendem uma mistura de compostos de insulina lispro peguilada em que cerca de 95% ou mais dos compostos totais de insulina lispro peguilada são insulina lispro PEG-LysB28, cerca de 5% ou menos são insulina lispro PEG-GlyA1 e a insulina lispro PEG-LysB28 caracteriza-se por possuir uma semi-vida de eliminação superior a cerca de 24 horas, cerca de 30 horas, cerca de 32 horas, cerca de 34 horas, cerca de 36 horas, cerca de 38 horas, cerca de 40 horas ou cerca de 42 horas num ser humano quando da administração subcutânea de uma única dose da composição a 0,225 mg/kg.

O termo "condições básicas" como aqui usado

refere-se ao carácter básico da reacção de peguilação. Para peguilar mais selectivamente a insulina lispro na posição 28 da cadeia B da insulina lispro, a reacção deverá ser realizada com os grupos alfa-amino da insulina lispro substancialmente desprotonados. Num solvente ou co-solvente aquoso, as condições básicas significam que a reacção é realizada a um pH superior a 7,0. De preferência, a reacção de peguilação é conduzida a pH entre cerca de 8,5 e cerca de 11,5. Num solvente orgânico, a reacção é realizada na presença de uma base com uma basicidade equivalente a um pK_a superior ou igual a 10,75 em água.

O presente invento também inclui um processo de preparação de um composto de insulina lispro peguilada da fórmula:

$P-[(A)-(B)]$ ou um seu sal farmacologicamente aceitável, em que:

A é a cadeia A da insulina lispro (SEQ ID NO:1);

B é a cadeia B da insulina lispro (SEQ ID NO:3);

e

P é um PEG com uma massa molecular na gama entre cerca de 20 kDa e cerca de 40 kDa e em que A e B estão adequadamente ligadas de forma cruzada e P está ligado através de uma ligação covalente de uretano ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B, o qual compreende a reacção do grupo épsilon-amino da lisina na

posição 28 de B com monometoxipoli(etilenoglicol) p-nitrofenilcarbonato (mPEG-NPC) tendo uma massa molecular média mássica entre cerca de 20 kDa e cerca de 40 kDa num solvente aquoso a um pH entre cerca de 8,5 e cerca de 11,5 e a uma temperatura de reacção entre cerca de 25°C e cerca de 30°C. De preferência, o pH da reacção é mantido entre cerca de 10,5 e cerca de 11,1, a reacção de peguilação é conduzida a uma temperatura entre cerca de 25°C e cerca de 30°C durante um período de tempo entre cerca de 2 e cerca de 12 horas, e a razão entre mPEG-NPC e insulina lispro situa-se na gama entre cerca de 1,0 e cerca de 5,0. Mais de preferência, a massa molecular média mássica do mPEG-NPC é cerca de 20 kDa, o pH da reacção é mantido entre cerca de 10,5 e cerca de 11,1, a reacção de peguilação é conduzida a uma temperatura entre cerca de 25°C e cerca de 30°C durante um período de tempo entre cerca de 2 e cerca de 12 horas e a razão entre mPEG-NPC e insulina lispro situa-se na gama entre cerca de 1,0 e cerca de 5,0. Mesmo mais de preferência, a proporção molar de PEG:insulina lispro situa-se na gama entre cerca de 2,5 e cerca de 4,5, a massa molecular média mássica do mPEG-NPC é cerca de 20 kDa, o pH da reacção de peguilação é mantido entre cerca de 10,5 e cerca de 11,1, a temperatura da reacção de peguilação é mantida entre cerca de 25°C e cerca de 30°C durante um período de tempo entre cerca de 3 e cerca de 6 horas. Mais de preferência a proporção molar de PEG:insulina lispro situa-se na gama entre cerca de 2,6 e cerca de 4,5, a massa molecular média mássica do mPEG-NPC é cerca de 20 kDa, o pH da reacção de peguilação é mantido entre cerca de 10,5 e

cerca de 11,0 e a temperatura da reacção é mantida entre cerca de 25°C e cerca de 30°C durante cerca de 3 horas.

Caso se pretenda, os compostos de insulina lispro peguilada do presente invento tendo diferentes massas moleculares podem ser isolados usando várias técnicas conhecidas dos familiarizados com a área incluindo a cromatografia de filtração em gel e/ou cromatografia de permuta iónica, mas não lhes estando limitadas. Ou seja, a cromatografia de filtração em gel pode ser usada para fraccionar compostos de insulina lispro mono-peguilada, di-peguilada e tri-peguilada com base nas suas diferentes massas moleculares (em que a diferença corresponde essencialmente à massa molecular do PEG usado na reacção de peguilação). Por exemplo, num exemplo de reacção em que uma insulina lispro é conjugada com um mPEG activado tendo uma massa molecular média de aproximadamente 20 kDa, a mistura de reacção resultante pode conter insulina lispro não modificada tendo uma massa molecular de aproximadamente 5808 Daltons, insulina lispro mono-peguilada tendo uma massa molecular média de aproximadamente 25808 Daltons, insulina lispro di-peguilada tendo uma massa molecular média de aproximadamente 45808 Daltons e insulina lispro tri-peguilada tendo uma massa molecular média de cerca de 65808 Daltons. No entanto, devido às técnicas de filtração em gel separarem os compostos com base no tamanho hidrodinâmico, a insulina lispro mono-peguilada conjugada com um mPEG tendo uma massa molecular média de cerca de 20 kDa migrará durante a filtração em gel como uma proteína de

aproximadamente 82 kDa apesar de ter uma massa molecular média de cerca de 25808 Daltons. Os familiarizados com a área esperarão que uma espécie di- e tri-peguilada com um mPEG de massa molecular média de cerca de 20 kDa tenha migração ou tempos de retenção muito diferentes permitindo a sua purificação e/ou quantificação.

A frase "semi-vida no plasma" refere-se ao tempo para a concentração no plasma do fármaco no corpo cair para metade. Um termo usado em alternativa é "semi-vida de eliminação", o qual corresponde à velocidade de eliminação da fase log-linear terminal. Os familiarizados com a área saberão que a semi-vida é um parâmetro derivado que muda em função da eliminação e do volume de distribuição. O termo "prolongada", "mais longa" ou "aumentada" usado no contexto de semi-vida no plasma ou semi-vida de eliminação são usados indiferenciadamente e destinam-se a significar que existe um aumento estatisticamente significativo na semi-vida de um composto a testar (e.g., uma insulina lispro peguilada) relativamente à da molécula de referência (e.g., insulina lispro) conforme determinado em condições comparáveis.

Eliminação é a medida da capacidade do corpo para eliminar um fármaco. À medida que a eliminação decresce devido, por exemplo, a modificações de um fármaco, espera-se que a sua semi-vida aumente. No entanto, esta relação recíproca é exacta apenas quando não existe alteração no volume de distribuição. Uma relação aproximada útil entre a

semi-vida log-linear terminal ($t_{1/2}$), eliminação (CL) e volume de distribuição (V) é dada pela equação: $t_{1/2} \sim 0,693 (V/CL)$. A eliminação não indica quanto fármaco é removido mas antes o volume de fluido biológico, como seja sangue ou plasma, que teria de ser completamente removido para se fazer a eliminação. A eliminação é expressa como um volume por unidade de tempo.

O termo "tratamento" ou "a tratar" como aqui usado refere-se à manipulação e cuidados de um doente tendo diabetes ou hiperglicemia, ou outra condição para a qual a administração de insulina seja indicada com o objectivo de combater ou aliviar sintomas e complicações destas condições. O tratamento inclui administração de compostos ou composições do presente invento para prevenir o estabelecimento de sintomas ou complicações, alívio dos sintomas ou complicações ou eliminação da doença, condição ou distúrbio. O doente a ser tratado é um mamífero e de preferência um ser humano.

Os compostos de insulina lispro peguilados da Fórmula I são eficazes no tratamento de hiperglicemia através da administração, a um doente necessitado, de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um ou mais compostos da Fórmula I. Como aqui usada, a frase "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se à quantidade de um composto de insulina lispro peguilado da Fórmula I ou composições do mesmo suficientes para regular a glucose do sangue num doente. De preferência, uma quantidade

terapeuticamente eficaz de uma insulina lispro peguilada da Fórmula I situa-se entre 0,01 nmol/kg e cerca de 100 nmol/kg. Mais de preferência, uma quantidade terapêuticamente eficaz situa-se entre 0,01 nmol/kg e cerca de 50 nmol/kg. Ainda mais de preferência, uma quantidade terapêuticamente eficaz situa-se entre 0,01 nmol/kg e cerca de 20 nmol/kg. Mesmo mais de preferência, uma quantidade terapêuticamente eficaz situa-se entre 0,01 nmol/kg e cerca de 10 nmol/kg. Mesmo mais de preferência, uma quantidade terapêuticamente eficaz situa-se entre 0,1 nmol/kg e cerca de 7,5 nmol/kg. Ainda mais de preferência, uma quantidade terapêuticamente eficaz situa-se entre 0,1 nmol/kg e cerca de 5 nmol/kg. Ainda mais de preferência, uma quantidade terapêuticamente eficaz situa-se entre 0,5 nmol/kg e cerca de 5 nmol/kg. No entanto, deve-se entender que a quantidade de um composto de insulina lispro peguilada ou composição compreendendo um ou mais compostos de insulina lispro peguilada administrados será determinada por um médico face às circunstâncias relevantes, incluindo a condição a ser tratada (*i.e.*, a causa da hiperglicemia), a espécie particular de insulina lispro peguilada ou mistura particular dos compostos de insulina lispro peguilada a serem administrados, outros fármacos, insulinas ou de outra forma a serem co-administrados, da via parentérica de administração escolhida, da idade, do peso e da resposta do doente individual e da gravidade dos sintomas do doente. Assim, as gamas de dosagem atrás referidas não se destinam a limitar o âmbito do invento de alguma forma.

A frase "suficiente para regular a glucose do sangue" significa que a administração de um composto ou composição a um doente resulta num nível de glucose no plasma em jejum. Um nível de glucose no plasma em jejum clinicamente normal é de 70-110 mg/dl. Um nível de glucose no plasma pós-prandial clinicamente normal é inferior a 140 mg/dl.

Sabe-se que durante o armazenamento podem ocorrer as alterações químicas covalentes na estrutura da insulina. Isto pode conduzir à formação de moléculas que são menos activas e potencialmente imunogénicas tais como produtos de desamidação e produtos de transformação de massa molecular mais elevada (e.g., dímeros, oligómeros, polímeros). Um estudo compreensivo da estabilidade química da insulina está apresentado por Jens Brange em "Stability of Insulin", Kluwer Academic Publishers, 1994. A semi-vida dos produtos de insulina está principalmente comprometido pela formação de agregados solúveis (dímeros, oligómeros e polímeros) ao longo do tempo, apesar do facto das composições de insulina serem tipicamente guardadas a baixa temperatura de não mais de 2-8°C, o que melhora a semi-vida consideravelmente comparativamente com o armazenamento, e.g., à temperatura ambiente. Por outro, os produtos de insulina são sujeitos à formação de agregados insolúveis (fibrilhas) como resultado de agitação, e.g., quando realizado no bolso de um doente ou durante o transporte. É essencial para a qualidade de um produto de insulina que a tendência para formar agregados solúveis e insolúveis, como resultado de influências

químicas ou físicas, seja reduzida para um mínimo absoluto. Assim, as composições de insulina deverão demonstrar características químicas aceitáveis e estabilidade física de forma a serem usadas terapêuticamente.

O termo "estabilidade" como aqui usado refere-se a estabilidade física e/ou química de formulações de compostos de insulina lispro peguilada. A instabilidade física de uma formulação de insulina lispro peguilada pode ser causada pela agregação das moléculas de proteína para formar polímeros de ordem superior ou mesmo precipitados. Uma formulação "estável" é uma em que o grau de agregação de proteínas é controlado de forma aceitável e não aumenta de forma inaceitável com o tempo. Em determinadas realizações do invento, uma formulação de insulina lispro peguilada é considerada estável ao longo de um determinado período de tempo se o grau de agregação estiver entre cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% ou 30% do grau de agregação observado no material de partida. Em determinadas realizações do invento, uma formulação de insulina lispro peguilada é considerada estável ao longo de um determinado período de tempo se a actividade biológica do polipéptido tiver pelo menos 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% ou 50% da actividade observada com o material de partida.

O termo "estabilidade química" como aqui usado refere-se à tendência de uma composição de insulina lispro peguilada para formar agregados de proteína solúvel durante

o armazenamento em condições estáticas, incluindo armazenamento a baixas temperaturas de aproximadamente 2-8°C ou a temperaturas elevadas de aproximadamente 20-40°C. A estabilidade química de um composto de insulina lispro peguilada do invento pode ser medida de através da determinação de características analíticas em condições específicas, tais como uma condição de temperatura e humidade particular ao longo de um determinado período de tempo. Os atributos analíticos que podem ser medidos incluem a formação de espécies de massa molecular elevada usando HPLC de exclusão de tamanho, por exemplo. Os resultados podem ser então monitorizados e comparados com parâmetros específicos.

O termo "estabilidade física" como aqui usado refere-se à tendência de uma composição de insulina lispro peguilada para formar agregados de proteína insolúvel como resultado de uma acção física, como seja agitação de uma composição de insulina lispro peguilada. A estabilidade física dos compostos de insulina lispro peguilada do invento quando do armazenamento durante um período de tempo a várias temperaturas e em várias formulações farmacêuticas pode ser avaliada por métodos conhecidos na área, incluindo medição da atenuação de luz aparente na amostra (absorvância ou densidade óptica). Tal medição da atenuação de luz está relacionada com a turbidez de uma formulação. A turbidez é produzida por agregação ou precipitação de proteínas ou complexos na formulação. Outros métodos para avaliação da estabilidade física são conhecidos e incluem avaliação visual da presença ou ausência de partículas ou através da

detecção da formação de fibrilhas/gel por microscopia de fluorescência de Tioflavina T.

Outras realizações do invento proporcionam composições farmacêuticas adequadas para administração a um doente, particularmente a um ser humano, compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de pelo menos um composto de insulina lispro peguilada da Fórmula I e um ou mais excipientes, diluentes, tampões, íons metálicos ou veículos farmacêuticamente aceitáveis. Tais composições farmacêuticas são tipicamente, ainda que não necessariamente, de natureza parentérica e podem ser preparadas através de qualquer uma de uma variedade de técnicas usando excipientes, tampões, diluentes, íons metálicos ou veículos convencionais para produtos parentéricos que são conhecidos na área.

Devido aos compostos de insulina lispro peguilados do presente invento serem muito solúveis em água, uma composição farmacêutica do presente invento inclui uma composição compreendendo água como solvente primário, compostos de insulina lispro peguilada numa concentração total de pelo menos 1 mg/ml, pelo menos 2 mg/ml, pelo menos 5 mg/ml, pelo menos 10 mg/ml, pelo menos 15 mg/ml, pelo menos 20 mg/ml, pelo menos 25 mg/ml, pelo menos 30 mg/ml, pelo menos 35 mg/ml, pelo menos 40 mg/ml. Pelo menos 45 mg/ml, pelo menos 50 mg/ml ou superior e um tampão farmacêuticamente aceitável em que a composição farmacêutica possui um pH entre cerca de 4,0 e cerca de 8,5. De preferência, uma composição farmacêutica do presente

invento possui um pH entre cerca de 6,0 e cerca de 8,5. Mais de preferência, uma composição farmacêutica do invento compreende compostos de insulina lispro peguilada numa concentração total na gama entre cerca de 2,5 mg/ml e cerca de 60 mg/ml e um tampão em que a composição possui um pH na gama entre cerca de 6,0 e cerca de 8,5. Mais de preferência, uma composição farmacêutica do invento compreende compostos de insulina lispro peguilada numa concentração na gama entre cerca de 5 mg/ml e cerca de 50 mg/ml e um tampão em que a composição farmacêutica possui um pH na gama entre cerca de 6,5 e cerca de 7,5. Ainda mais de preferência, uma composição farmacêutica do invento compreende compostos de insulina lispro peguilada numa concentração na gama entre cerca de 10 mg/ml e cerca de 40 mg/ml e um tampão em que a composição farmacêutica tem um pH na gama entre cerca de 6,5 e cerca de 7,5. Ainda mais de preferência, uma composição farmacêutica do invento compreende compostos de insulina lispro Peguilados na gama entre cerca de 15 mg/ml e cerca de 40 mg/ml e um tampão em que a composição farmacêutica possui um pH na gama entre cerca de 7,0 e cerca de 7,5 ou entre cerca de 7,0 e cerca de 8,0. Mesmo mais de preferência, uma composição farmacêutica do invento ainda compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma insulina. Ainda mais de preferência, a insulina é um análogo de insulina. Mesmo mais de preferência, o análogo da insulina é um análogo de insulina de actuação rápida. Mais de preferência, o análogo de insulina de actuação rápida é insulina lispro.

O termo "tampão" refere-se a uma solução que resiste a alterações no pH pela acção dos seus componentes conjugados ácido-base. De preferência, os tampões empregues são tampões farmacêuticamente aceitáveis. A frase "tampão farmacêuticamente aceitável" refere-se a uma solução que é segura para usar em formulações de insulina e que tem o efeito de controlar o pH da composição farmacêutica no pH pretendido. Em realizações preferidas, o tampão tem um pH na gama entre cerca de 6,0 e cerca de 8,5. Mais de preferência, o tampão tem um pH na gama entre cerca de 7,0 e cerca de 8,0. Tampões farmacêuticamente aceitáveis para o controlo do pH das composições do presente invento nesta gama incluem, mas não estão limitados a agentes tais como tampões de fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS e histidina, assim como uma sua combinação. "TRIS" refere-se a 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol e qualquer sal farmacêuticamente aceitável do mesmo. A base livre e a forma de hidrocloreto (*i.e.* TRIS-HCl) são duas formas comuns de TRIS. O TRIS é igualmente conhecido na área como trimetilol aminometano, trometamina e tris(hidroximetil)-aminometano. De preferência, uma composição farmacêutica do presente invento compreende tampão fosfato ou TRIS entre cerca de 2,5 mM e cerca de 50 mM. Mais de preferência, as composições farmacêuticas do presente invento compreendem tampão de fosfatos ou TRIS entre cerca de 5 mM e cerca de 20 mM. Ainda mais de preferência, uma composição farmacêutica do presente invento compreende tampão de fosfatos entre cerca de 5 mM e cerca de 10 mM. Mesmo mais de preferência, uma composição farmacêutica do presente inven-

to compreende tampão de fosfatos aproximadamente 5 mM. Mesmo mais de preferência, uma composição farmacêutica do presente invento compreende tampão TRIS entre cerca de 7,5 mM e 50 mM. Ainda mais de preferência uma composição farmacêutica do presente invento compreende tampão TRIS entre cerca de 10 mM e 25 mM. Ainda mais de preferência, uma composição farmacêutica do presente invento compreende tampão TRIS entre cerca de 15 mM e 20 mM. Mais de preferência, uma composição farmacêutica do presente invento compreende tampão TRIS aproximadamente 16 mM.

Os compostos e composições de insulina lispro peguilada do invento podem ser formulados de forma análoga com formulações conhecidas de insulina que são administradas aos doentes por via parentérica. Tais formulações são conhecidas dos familiarizados com a área. De preferência, os compostos de insulina lispro peguilada são formulados de forma análoga à formulação de insulina lispro HUMALOG® ou Humulin®. Assim, uma composição farmacêutica preferida do presente invento pode compreender água, um composto de insulina lispro peguilada da Fórmula I, um agente de isotonicidade e um tampão farmacêuticamente aceitável. De preferência, uma composição farmacêutica do invento ainda compreende um conservante farmacêuticamente aceitável. Mais de preferência, uma composição farmacêutica do invento ainda compreende um catião divalente como seja zinco e/ou cobalto, o que pode facilitar a hexamerização da insulina. Ainda mais de preferência, uma composição farmacêutica do invento ainda compreende pelo menos um

agente estabilizador de hexâmeros. Ainda, ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio podem ser adicionados para ajustar o pH.

Um "agente de isotonicidade" é um composto que é fisiologicamente tolerado e confere uma tonicidade adequada a uma formulação para prevenir o fluxo de água através das membranas celulares que estão em contacto com uma composição farmacêutica administrada. O glicerol, também conhecido como glicerina, é frequentemente usado como agentes de isotonicidade. Outros agentes de isotonicidade incluem i) outros álcoois de açúcares como sejam o manitol e o sorbitol mas não lhes estão limitados, ii) sais tais como NaCl, mas não lhe estando limitados, iii) monossacáridos incluindo dextrose, mas não lhe estando limitados, e iv) dissacáridos incluindo lactose, sucrose e tre-halose mas não lhes estando limitados. As composições farmacêuticas do presente invento podem incluir um ou mais agentes de isotonicidade. De preferência, as formulações farmacêuticas do presente invento possuem um ou mais agentes de isotonicidade que produzem uma formulação com uma isotonicidade na gama entre cerca de 270 e cerca de 330 mOsm. Mais de preferência, os agentes de isotonicidade são glicerol, sorbitol, sucrose, NaCl, tre-halose e/ou manitol. Ainda mais de preferência, o agente de isotonicidade é glicerol, sorbitol, sucrose, NaCl e/ou tre-halose. Ainda mais de preferência glicerol, sorbitol, sucrose, NaCl ou tre-halose numa concentração entre cerca de 100 e cerca de 200 mM está presente nas composições farmacêuticas do presente invento.

Ainda mais de preferência, nas composições farmacêuticas do presente invento está presente glicerol entre cerca de 100 e cerca de 200 mM. Ainda mais de preferência, nas composições farmacêuticas do presente invento o glicerol está presente numa concentração entre cerca de 150 e cerca de 180 mM. Ainda mais de preferência, nas composições farmacêuticas do presente invento o glicerol está presente numa concentração entre cerca de 130 e cerca de 175 mM. Ainda mais de preferência, nas composições farmacêuticas do presente invento NaCl está presente numa concentração entre cerca de 50 e cerca de 300 mM. Ainda mais de preferência, nas composições farmacêuticas do presente invento NaCl está presente numa concentração entre cerca de 100 e cerca de 200 mM. Mais de preferência, nas composições farmacêuticas do presente invento NaCl está presente numa concentração de aproximadamente 180 mM.

As composições farmacêuticas do presente invento podem igualmente conter um composto estabilizador de hexâmeros. A frase "composto estabilizador de hexâmeros" refere-se a um composto não proteico de massa molecular baixa que estabiliza os compostos de insulina lispro peguilada do presente invento num estado de associação hexamérica. Iões de cálcio, zinco, cobalto, cobre, níquel ferro, magnésio, manganês, aniões, particularmente cloreto, brometo, iodeto, tiocianato e compostos fenólicos, particularmente fenol, conservantes fenólicos, resorcinol, 4'-hidroxiacetanilida, 4-hidroxibenzamida e 2,7-di-hidroxi-naftaleno, são compostos estabilizadores de hexâmeros para

as moléculas de insulina. De preferência, o composto estabilizador de hexâmeros é fenol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, metilparabeno, cálcio, cloreto ou uma combinação de dois ou mais destes compostos. Mais de preferência, o composto estabilizador de hexâmeros é fenol, m-cresol, cálcio, cloreto ou uma combinação destes. De preferência, uma composição farmacêutica do invento compreende cálcio entre cerca de 1 mM e 75 mM, cálcio entre cerca de 1 mM e 50 mM, cálcio entre cerca de 1 mM e 25 mM, cálcio entre cerca de 5 mM e 50 mM, cálcio entre cerca de 2,5 mM e 30 mM, cálcio entre cerca de 2,5 mM e 15 mM, cálcio entre cerca de 2,5 mM e 10 mM, cálcio entre cerca de 5 mM e 30 mM, cálcio entre cerca de 5 mM e 15 mM. Mais de preferência, uma composição farmacêutica do invento compreende cálcio entre cerca de 2,5 mM e 10 mM.

Formulações multi-usos das composições farmacêuticas do presente invento podem também conter um conservante. O termo "conservante" refere-se a um composto adicionado a uma formulação farmacêutica para actuar como agente antimicrobiano. Entre os conservantes conhecidos na área como sendo eficazes e aceitáveis nas formulações parentéricas encontram-se cloreto de benzalcónio, benzetónio, cloro-hexidina, fenol, m-cresol, álcool benzílico, metilparabeno, propilparabeno, clorobutanol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, nitrato fenilmercúrico, timerosal, ácido benzóico e várias misturas dos mesmos. Determinados conservantes fenólicos, tais como metilparabeno, fenol e m-cresol são conhecidos por se ligarem a moléculas de

insulina e do tipo insulina e assim induzem alterações conformacionais que aumentam a estabilidade física ou química, ou ambas (Ver, e.g., Birnbaum, D.T., et al., *Pharmaceutical Res.* 14:25-36 (1997); Rahuel.Clermont, S., et al., *Biochemistry* 36:5837-5845 (1997)). O "conservante fenólico" inclui os compostos fenol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, metilparabeno e misturas dos mesmos. O conservante usado nas formulações dos compostos de insulina lispro peguilados do presente invento pode ser um conservante fenólico e pode ser o mesmo composto estabilizador de hexâmeros ou outro. De preferência, o conservante fenólico é m-cresol ou fenol. Mais de preferência, uma composição farmacêutica do presente invento compreende fenol e/ou m-cresol numa concentração entre cerca de 0,1 e cerca de 75 mM como conservante, a um pH entre cerca de 7,0 e cerca de 8,0. Mesmo mais de preferência, uma composição farmacêutica do presente invento compreende fenol e/ou m-cresol numa concentração entre cerca de 1 e 60 mM como conservante, a um pH entre cerca de 7,0 e cerca de 8,0. Ainda mais de preferência, uma composição farmacêutica do presente invento compreende fenol e/ou m-cresol numa concentraçãp entre cerca de 10 e cerca de 40 mM como conservante, a um pH entre cerca de 7,0 e cerca de 8,0. Mesmo mais de preferência, uma composição farmacêutica do presente invento compreende fenol e/ou m-cresol numa concentração de aproximadamente 30 mM, a um pH entre cerca de 7,0 e cerca de 8,0. Mais de preferência, uma composição farmacêutica do presente invento compreende fenol e/ou m-cresol numa concentração de aproximadamente 30 mM, a um pH entre cerca de 7,3 e cerca de 7,5.

Como mencionado atrás, as composições farmacêuticas do presente invento podem compreender catiões metálicos divalentes tais como zinco ou cobalto que conduzem a hexamerização de insulina ou de outra forma estabilizam os compostos de insulina. "Catião metálico divalente" significa que o ião ou iões participam na formação de um complexo com uma multiplicidade de moléculas proteicas. Os metais de transição, os metais alcalinos e os metais alcalino-terrosos são exemplos de metais que são conhecidos por formarem complexos com compostos de insulina. São preferidos os metais de transição. De preferência, o catião metálico divalente é um ou mais dos catiões seleccionados do grupo consistindo em zinco, cobre, cobalto, níquel, manganês, magnésio, cádmio e ferro. Mais de preferência, o zinco é o catião metálico divalente. O zinco é conhecido por facilitar a formação de hexâmeros de insulina e de vários análogos de insulina e/ou derivados, incluindo insulina lispro. O principal papel dos catiões divalentes, tais como zinco ou cobalto, nas composições farmacêuticas do presente invento é facilitar a formação de hexâmeros dos compostos de insulina lispro peguilados do presente invento e/ou quaisquer outras insulinas ou análogos de insulina numa composição farmacêutica compreendendo um composto de insulina lispro peguilado do presente invento. Na presença de um conservante fenólico, a formação dos hexâmeros pode ser facilitada levando o pH de uma solução compreendendo composições farmacêuticas do presente invento para a região neutra na presença de iões Zn(II) ou pela adição de Zn(II),

após o pH ter sido ajustado para a região neutra. De preferência, a razão entre zinco e o composto de insulina, análogo de insulina e/ou composto de insulina lispro peguilado liga-se no limite mais baixo em cerca de 0,33, ou seja dois átomos de zinco por hexâmero de insulina, hexâmero análogo de insulina e/ou hexâmero de insulina lispro peguilada. Mais de preferência, a razão entre zinco e o composto de insulina, análogo de insulina e/ou o composto de insulina lispro peguilada é entre cerca de 0,33 e cerca de 0,67. Pode ser usado ainda mais zinco durante o processo se um composto que compete com a proteína para a ligação ao zinco, como seja citrato ou fosfato, estiver presente. Excesso de zinco acima da quantidade necessária para a hexamerização pode ser desejável para dirigir mais fortemente a hexamerização, e.g., uma razão entre zinco e o composto de insulina, análogo de insulina e/ou composto de insulina lispro peguilada entre cerca de 0,33 e cerca de 0,83. Igualmente zinco excessivo acima da quantidade necessária para a hexamerização pode estar presente numa composição farmacêutica do presente invento e pode ser desejável para melhorar a estabilidade química e física, para melhorar a "capacidade de formar suspensões" e possivelmente para prolongar o tempo de acção. Por outro lado, quantidades excessivas de zinco em tampões de citrato ou de fosfato podem conduzir à precipitação de citrato de zinco ou fosfato de zinco, respectivamente, assim como de insulina.

De acordo com o presente invento, o zinco pode

estar presente na formulação numa quantidade entre cerca de 0,3 mole e cerca de 3 moles por mole de insulina, análogo de insulina e hexâmero de insulina lispro peguilada. Mais de preferência, o zinco está presente nas composições farmacêuticas do presente invento numa quantidade entre cerca de 0,3 mole e cerca de 1 mole por mole de insulina, análogo de insulina e hexâmero de insulina lispro peguilada totais. Ainda mais de preferência, o zinco está presente nas composições farmacêuticas do presente invento numa quantidade entre cerca de 0,3 mole e cerca de 0,7 mole por mole de insulina, análogo de insulina e hexâmero de insulina lispro peguilada totais. Mais de preferência, o zinco está presente nas composições farmacêuticas do presente invento numa quantidade entre cerca de 0,3 mole e cerca de 0,55 mole por mole de insulina, análogo de insulina e hexâmero de insulina lispro peguilada totais. O composto de zinco que proporciona zinco para o presente invento pode ser qualquer composto de zinco farmacêuticamente aceitável. A adição de zinco a preparações de insulina é conhecida na área, tal como o são fontes farmacêuticamente aceitáveis de zinco. De preferência, o zinco é proporcionado como um sal, como seja sulfato de zinco, cloreto de zinco, acetato de zinco, citrato de zinco, óxido de zinco ou nitrato de zinco.

Numa outra realização do invento a composição farmacêutica do presente invento ainda compreende um ou mais tensioactivos. O termo "tensioactivo" como aqui usado inclui agentes que reduzem a tensão superficial de um

líquido por absorção na interface ar-líquido. Exemplos de tensioactivos incluem, sem limitação, tensioactivos não iónicos, tais como polissorbatos (e.g., polissorbato 80 ou polissorbato 20); poloxâmeros (e.g., poloxâmero 188); Triton™ X-100); polietilenoglicol; polipropilglicol; e copolímeros de etileno e propielnoglicol (e.g., pluronics, PF68). Por exemplo, o tensioactivo pode estar presente numa composição farmacêutica do presente invento numa quantidade a partir de aproximadamente de 0,001-0,5%, e.g., a partir de aproximadamente 0,05-0,3%. De preferência, o tensioactivo usado na composição farmacêutica do presente invento é poloxâmero 188. Mais de preferência, o tensioactivo é poloxâmero 188 numa concentração entre cerca de 0,5 e cerca de 10 mg/ml, entre cerca de 1 e cerca de 10 mg/ml, entre cerca de 2 e cerca de 10 mg/ml, entre cerca de 3 e cerca de 10 mg/ml, entre cerca de 4 e cerca de 10 mg/ml, entre cerca de 1 e cerca de 5 mg/ml, entre cerca de 2 e cerca de 5 mg/ml, entre cerca de 3 e cerca de 5 mg/ml e entre cerca de 4 e cerca de 5 mg/ml.

O invento proporciona igualmente um composto de insulina lispro peguilada da Fórmula I ou um seu sal farmacêuticamente aceitável para usar no tratamento de hiperglicemia e/ou diabetes, de preferência, em seres humanos.

O invento proporciona igualmente um composto de insulina lispro peguilado da Fórmula I ou um seu sal

farmaceuticamente aceitável para usar na produção de um medicamento para o tratamento de hiperglicemia e/ou diabetes, de preferência, em seres humanos.

As composições farmacêuticas compreendendo uma insulina lispro peguilada de acordo com o presente invento devem ser administrados parentericamente a doentes necessitados de tal tratamento. A administração parentérica pode ser realizada por injeção subcutânea, intramuscular ou intravenosa por meio de uma seringa, facultativamente uma seringa tipo caneta ou injector mecânico. Como alternativa, a administração parentérica pode ser realizada por meio de uma bomba de infusão.

Preparação 1

GlyAl-HSCH₂CH₂CO-insulina lispro (3) e LysB28-HSCH₂CH₂CO-insulina lispro (4)

Trt-SCH₂CH₂CO-OH, N-hidroxisuccinimida (NHS) e diisopropilcarbodiimida (DIC), uma mmole de cada, são misturados em 2 ml de DMF durante 30 minutos para preparar o éster de Trt-SCH₂CH₂CO-NHS. Um décimo de mmole de insulina lispro foi dissolvido em 10 ml de 5% de trietilamina (TEA) em DMSO. À solução adicionou-se 0,2 mmol de Trt-SCH₂CH₂CO-NHS activado. Após 2 horas à temperatura ambiente, 0,2 ml de etanolamina foi adicionado para terminar a reacção. A mistura de reacção foi então diluída com

90 ml de H₂O e aplicada numa coluna de RP-C18 para purificação. As fracções pretendidas de LysB28-Trt-SCH₂CH₂CO-insulina lispro (2) foram reunidas e liofilizadas. Separadamente, as fracções pretendidas de GlyA1-HSCH₂CH₂CO-insulina lispro (1) foram reunidas e liofilizadas. Um décimo de mmole de (1) ou (2) foi dissolvido em 5 ml de TFA contendo 0,2 ml de tioanisole e 0,4 ml de tri-isopropilsilano. Após 30 min, o TFA foi removido por evaporação e o péptido residual foi suspenso em 50 ml de 10% ACN em H₂O. A solução resultante foi aplicada numa coluna de RP-C18 para purificação. As fracções pretendidas de (3) ou (4) foram reunidas e, facultativamente, liofilizadas.

Preparação 2

PheB1-HSCH₂CH₂CO-insulina lispro (7)

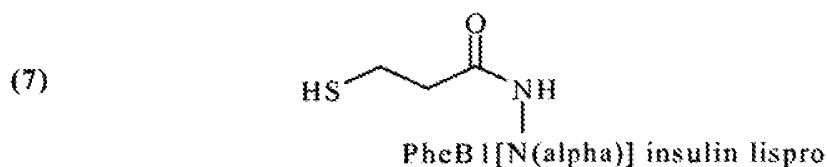
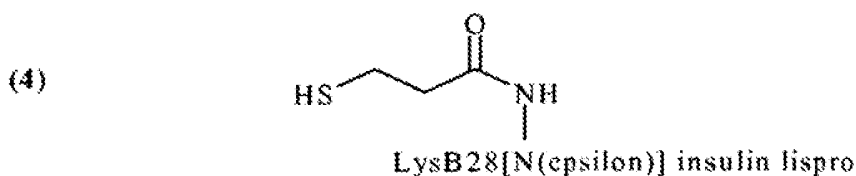
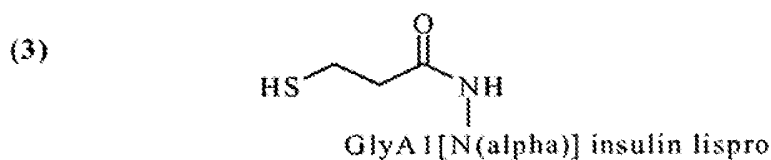
Um décimo de mmole de insulina lispro foi dissolvido em 10 ml de 5% TEA em DMSO. À solução foi adicionado 0,2 mmole de di-tert-butilcarbonato em DMSO. Após 1 hora à temperatura ambiente, 0,2 ml de etanolamina foi adicionado para terminar a reacção. A mistura de reacção foi então diluída com 90 ml de H₂O e aplicada numa coluna de RP-C18 para purificação. As fracções pretendidas de Boc-GlyA1, Boc-LysB28-insulina lispro foram reunidas e liofilizadas para dar (5). Um décimo de mmole de (5) foi dissolvido em 10 ml de 5% TEA em DMSO. À solução foi adicionado 0,2 mmole de Trt-SCH₂CH₂CO-NHS. Após 2 horas à

temperatura ambiente, 0,2 ml de etanolamina foi adicionado para terminar a reacção. A mistura de reacção foi então diluída com 90 ml de H₂O e aplicada numa coluna de RP-C18 para purificação. As fracções pretendidas foram reunidas e liofilizadas para dar Trt-SCH₂CH₂CO-PheB1, Boc-GlyAl, Boc-LysB28-insulina lispro (6). Um décimo de mmole de (6) foi dissolvido em 5 ml de TFA contendo 0,2 ml de tioanisole e 0,4 ml de triisopropilsilano. Após 30 min, TFA foi removido por evaporação e o péptido residual foi suspenso em 50 ml de 10% ACN em H₂O. A solução resultante foi aplicada numa coluna RP-C18 para purificação. As fracções pretendidas foram reunidas e liofilizadas para dar (7).

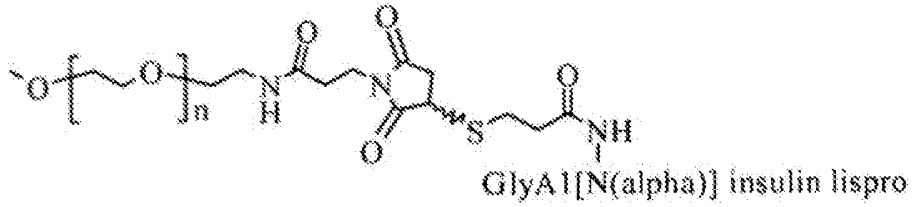
Exemplo 1: Peguilação de intermediários de insulina lispro derivatizados com tiol

Monometoxi-PEG-MAL com uma massa molecular média de aproximadamente 20 kDa (b), 30 kDa (a), 40 kDa (a) ou 60 kDa (c) foi dissolvido numa mistura de 1:1 de tampão NH₄Ac 100 mM (pH 4,69) e ACN. Um pó liofilizado de uma insulina lispro derivatizada com tiol, e.g., composto (3), (4) ou (7), foi adicionado à solução. A reacção pode ser seguida por RP-HPLC analítica. Quando a reacção estava completa (geralmente após aproximadamente 4 horas), a mistura foi diluída com H₂O e aplicada numa coluna RP-HPLC para purificação. As fracções pretendidas foram reunidas e liofilizadas para dar os compostos de insulina lispro peguilada. Exemplos de compostos de insulina lispro pegui-

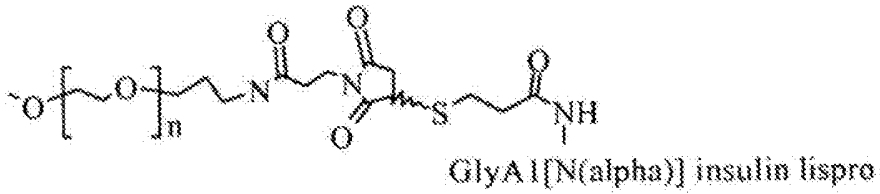
lada preparados como descrito no Exemplo 1 estão apresentados abaixo como (8(a)), (8(b)), (9(a)), (9(b)), (10(a)), (10(b)) e (15(c)). De preferência, estes compostos de insulina lispro peguilada terá n na gama entre cerca de 400 e cerca de 1000. Mais de preferência, estes compostos de insulina peguilada terão n na gama entre cerca de 500 e cerca de 750. Mais de preferência, estes compostos de insulina lispro peguilada terão n na gama entre cerca de 400 e cerca de 550. Ainda mais de preferência, estes compostos de insulina lispro peguilada terão n entre cerca de 400 e cerca de 500. Ainda mais de preferência, estes compostos de insulina lispro peguilada terão n entre cerca de 450 e cerca de 500. Mais de preferência, estes compostos de insulina lispro peguilada terão n de aproximadamente 450.



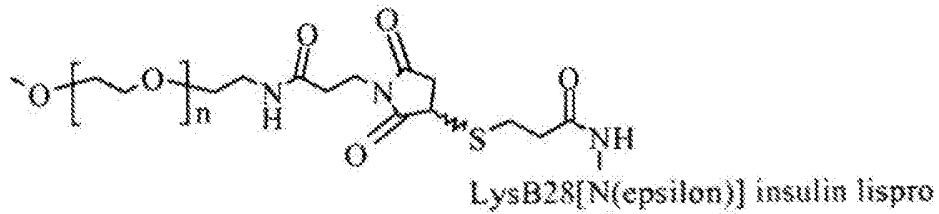
(8(a))



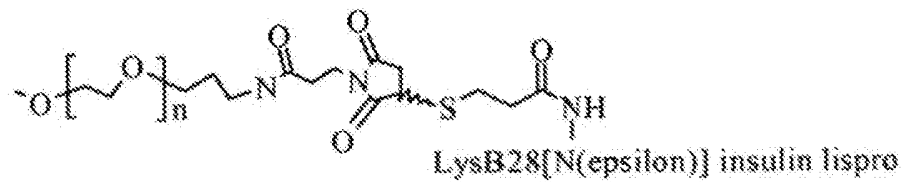
(8(b))



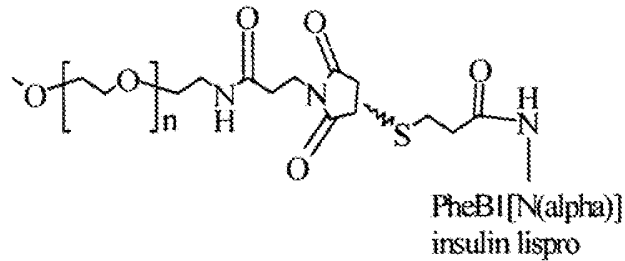
(9(a))



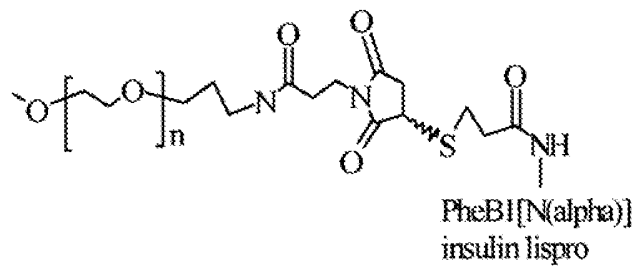
(9(b))



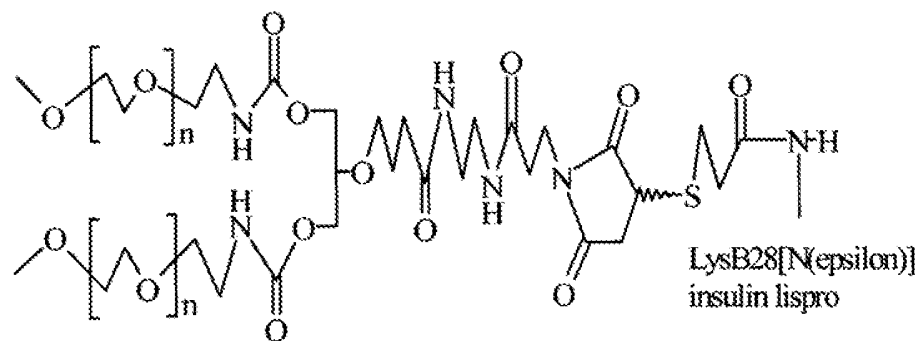
(10(a))



(10(b))



(15(c))



Exemplo 2: Peguilação de insulina lispro usando monometoxipoli(etilenoglicol) p-nitrofenilcarbonato (mPEG-NPC)

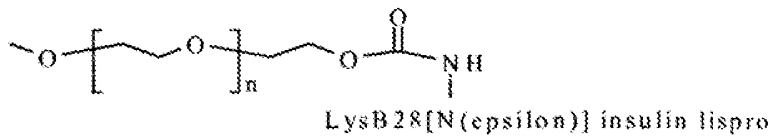
Um décimo de mmole de insulina lispro foi dissolvido em 20 ml de tampão borato 0,2M, pH 10,5 e 1,98 g de mPEG-NPC tendo um massa molecular média de aproximadamente 20 kDa em 20 ml de ACN foi adicionado à

solução com agitação forte. A reacção foi monitorizada por RP-HPLC e SEC. Após aproximadamente 4 horas, a mistura de reacção foi acidificada para pH 5-7 usando ácido acético e aplicada numa coluna de RP-HPLC para purificação. As fracções pretendidas foram reunidas e liofilizadas para dar PEG20K-insulina lispro mono-peguilada num rendimento que variou entre 20 e 45%. A identidade e pureza foram confirmadas por RP-HPLC, SEC e MALDI-MS. A proporção de mPEG ligado à cadeia A ou à cadeia B foi determinada pelas integrações das áreas de cadeia A livre e cadeia B libertada após tratamento do conjugado resultante com hidrocloreto de tris(2-carboxietil) fosfino (TCEP). A proporção de mPEG-NPC para insulina lispro determina a distribuição do produto das espécies mono-peguiladas e di-peguiladas. O pH da reacção governa a especificidade de local da peguilação. À medida que o pH aumenta entre cerca de 8 e cerca de 12, o composto (11) torna-se o principal produto. Quando a reacção é conduzida a pH 10,5 com mPEG-NPC tendo uma massa molecular média de aproximadamente cerca de 20 kDa (n é cerca de 450), a proporção de (11) para (12) é de aproximadamente 85:15.

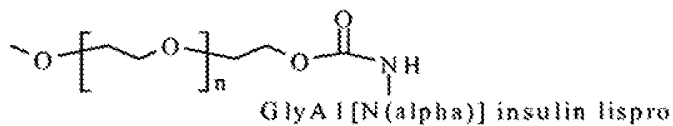
A reacção de peguilação atrás descrita pode ser igualmente conduzida numa solução aquosa não tamponada através da manutenção do pH da mistura de reacção pela adição contínua de NaOH. Quando conduzida numa solução aquosa não tamponada usando mPEG-NPC tendo uma massa molecular média de aproximadamente 20 kDa, enquanto o pH é mantido a cerca de pH 11,5, os produtos da reacção de peguilação incluem (11) e (12) numa proporção de aproxima-

damente 92:8. De preferência, o composto (11) terá n na gama entre cerca de 400 e cerca de 1000. Mais de preferência, o composto (11) terá n na gama entre cerca de 400 e cerca de 750. Ainda mais de preferência, o composto (11) terá n na gama entre cerca de 400 e cerca de 550. Ainda mais de preferência, o composto (11) terá n entre cerca de 400 e cerca de 500. Ainda mais de preferência, o composto (11) terá n entre cerca de 450 e cerca de 500. Mais de preferência, o composto (11) terá n de aproximadamente 450.

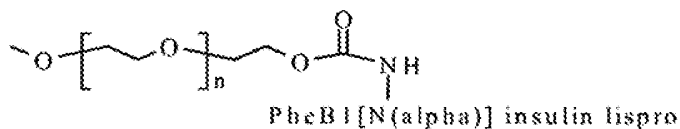
(11)



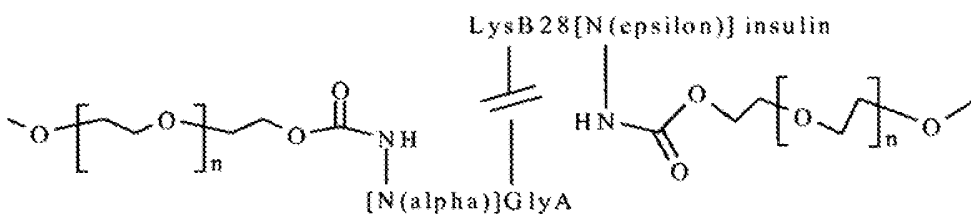
(12)



(13)



(14)



Exemplo 3: Afinidade para o receptor *in vitro*

Os ensaios de ligação a receptores foram realizados em membranas P1 a partir de células HEK 293 EBNA estavelmente transfectadas a expressarem abundantemente o receptor da insulina humana (hIR) ou o receptor de IGF-1 humano (hIGF-1R). As afinidades de ligação foram determinadas a partir de um ensaio de ligação de ligando radioactivo usando (3-[¹²⁵I]iodotirosil A¹⁴)-insulina humana recombinante (2000 Ci/mmol) ou [¹²⁵I]factor de crescimento tipo insulina humano 1 recombinante (2000 Ci/mmol). O ensaio foi realizado com um método SPA usando pérolas SPA acopladas a aglutinina de gérmen de trigo Tipo A tratadas com PEI PVT. O tampão de ensaio SPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,1% BSA) foi usado em todas as preparações de reagentes. Diluições seriadas de três vezes dos compostos (100 nM a 2 pM) foram preparadas em tampão de ensaio usando um robot Freedom/Evo (Tecan) e adicionado a microplacas de 96 alvéolos brancas de fundo transparente (Corning/Costar) com um Multimek (Beckman Coulter). O ligando radioactivo, as membranas e as pérolas SPA foram adicionadas usando um instrumento de gotejamento múltiplo (Titertek). Após uma incubação de 10 horas à temperatura ambiente, a radioactividade foi determinada usando um contador de cintilação Microbeta Trilux. A insulina lispro não marcada e IGF-1 não marcado foram incluídos em cada uma das experiências como controlos positivo e negativo, respectivamente. Os valores de IC₅₀ foram determinados a

partir da análise de regressão logística não linear com 4 parâmetros. A constante de afinidade (K_i) foi calculada a partir do valor de IC_{50} baseado na equação $K_i = IC_{50}/(1+D/K_d)$ em que D é igual à concentração de ligando radioactivo usada na experiência e K_d igual à constante de afinidade de ligação em equilíbrio do ligando radioactivo determinada a partir da análise de saturação da ligação (K_d para hIR e hIGF-1R é 0,124 e 0,130 nM, respectivamente). O K_i da média geométrica descrito abaixo é $10^{(\text{Log } K_i \text{ Médio})}$ $K_i = \text{Média } (K_{i1}+K_{i2}+K_{i3} \dots K_{in})$ e o número de experiências independentes (n) é superior a dois. No entanto, quando anotado abaixo relativamente a IGF-1 humano, n é dois.

Os compostos de insulina lispro peguilada que se seguem, preparados como descrito no Exemplo 1, possuem um K_i de média geométrica inferior a 30 nM no ensaio de ligação de hIR descrito atrás: composto 10(a) preparado usando mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa, composto 8(a) preparado usando mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa, composto 15(c) preparado usando mPEG-MAL bifurcado tendo uma massa molecular média de aproximadamente 60 kDa, composto 9(a) preparado usando mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 30 kDa, composto 9(a) preparado usando mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa e composto 9(b) preparado usando mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 20 kDa. Os ensaios de ligação de hIR e de

hIGFR, o composto 9(a) preparado usando mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa tem um K_i de média geométrica de $3,07 \text{ nM} \pm 0,32 \text{ nM}$ (\pm S.E.M.; $n=6$) e superior a $84,3 \text{ nM}$ (SEM = não determinado; $n=6$), respectivamente. Ainda, os produtos heterogêneos de insulina lispro peguilada, gerados como descrito no Exemplo 2 usando um mPEG-NPC linear de 40, 30 ou 20 kDa também possuem um K_i de média geométrica inferior a 30 nM no ensaio de ligação de hIR atrás descrito. No ensaio de ligação de hIR atrás descrito, insulina lispro possui um K_i de média geométrica de $0,22 \pm 0,72 \text{ nM}$ (\pm SEM; $n=4$). No ensaio de ligação de hIGFR atrás descrito, todos os compostos atrás referidos possuem um K_i de média geométrica superior a 75 nM e IGF-1 humano possui um K_i de média geométrica de $1,51 \pm 0,23 \text{ nM}$ (\pm SEM; $n = 2$).

Estes dados mostram que a posição de peguilação B28 reduz a afinidade hIR em cerca de 10 vezes, tornando estas espécies peguiladas de insulina lispro agonistas fracos do hIR. As espécies de insulina lispro peguilhada também possuem propriedades de ligação a IGFR-1 não mensuráveis neste ensaio nestas condições.

Exemplo 4: Avaliação da potência de insulina lispro peguilada usando um ensaio de fosforilação dos receptores de insulina de células totais.

Os compostos de insulina lispro peguilada do presente invento podem ser avaliados relativamente à

actividade funcional usando DELFIA®, um método de ensaio comercial fluorimétrico heterogéneo em tempo de resposta (Perkin-Elmer). Resumidamente, células HEK293 expressando abundantemente o receptor da insulina humana foram tripsinizadas e semeadas a 60000 células/alvéolo em placas de cultura de tecidos de 96 alvéolos Costar metade da área, revestidas com poli-D-lisina, em meio sem soro (SFM), (DMEM com 0,1% BSA sem ácidos gordos). As placas de culturas celulares foram incubadas durante a noite a 37°C numa incubadora de CO₂. As placas de captura com o mAb 8314 anti-cadeia A do receptor da insulina foram também preparadas na noite anterior usando placas de microtitulação Costar de 96 alvéolos ½ área, negras, tratadas durante a noite a 4°C com 30 µl de mAb 8314 anti-cadeia A do receptor da insulina (Soos, M.A., et al. *Biochem J* 235:199-208 (1986); disponível comercialmente incluindo da Abcam, Inc., Cambridge, MA), diluído a 1 µg/ml em carbonato de sódio 10 mM. As placas de captura com mAb 8314 foram lavadas quatro vezes com TRIS 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM e 0,1% Tween (TBST) para remover qualquer mAb 8314 não ligado. A placa de captura com o mAb 8314 foi então bloqueada durante mais de 1 hora, a 4°C, com 1% BSA em TBST. Após bloqueio, a placa de captura foi lavada duas vezes com TBST para remover o excesso de solução de BSA. Uma vez a placa de captura em tampão de bloqueio, as placas de culturas celulares foram removidas da incubadora e equilibradas até à temperatura ambiente. Os compostos a testar foram seriamente diluídos em SFM. Para estimular a autofosforilação do receptor de insulina, 50 µl do agente a testar diluído foi adicionado à monocamada celular. Após 30 minutos à

temperatura ambiente, a reacção foi parada removendo por aspiração o composto a testar e adicionando novamente 50 µl de um tampão de lise 2x (2% NP40, TRIS 100 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, inibidores de proteases Roche Complete™ com EDTA e vanadato 4 mM). Após 30 minutos em tampão de lise à temperatura ambiente, 30 µl do lisado foram transferidos para a placa de captura bloqueada contendo 30 µl de um anticorpo Európio-N1-antifosfotirosina PY20, Eu-N1-PY20 (Perkin Elmer), diluído a 50 ng/ml em Hepes 10 mM, NaCl 140 mM e 0,1% Tween. Esta mistura foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente seguido de 6 lavagens com TBST para remover Eu-N1-PY20 não ligado e lisado celular. A incubação com 50 µl de Solução Intensificadora (Perkin Elmer) durante 10 minutos foi feita com agitação intermitente à medida que o sinal surgia. O receptor da insulina fosforilado foi quantificado usando um Wallac Victor ajustado para fluorescência de Európio em tempo de resposta. O nível de fluorescência foi calculado como uma % da resposta para uma dose de estimulação máxima de insulina (100 nM). As potências dos análogos de insulina foram calculadas como a dose de EC₅₀ usando um ajustamento de quatro parâmetros da dose resposta. Os compostos de insulina lispro peguilada preparados como descrito no Exemplo 1 tendo um EC₅₀ inferior a 1,5 nM no ensaio descrito no Exemplo 4 incluem 10(a) preparado usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa, 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa, 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 30 kDa e 9(b) preparado usando mPEG-MAL tendo uma

massa molecular média de aproximadamente 20 kDa. No ensaio descrito no Exemplo 4, o composto 9(a) preparado usando mPEG-MAL linear possui um EC_{50} de 10,88 nM. Os produtos heterogêneos de insulina lispro peguilada gerados como descrito no Exemplo 2 usando um mPEG-NPC linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40, cerca de 30 ou cerca de 20 kDa também possuem um EC_{50} inferior a 15 nM no ensaio descrito no Exemplo 4. Uma mistura de 50:50 e de 70:30 do composto 8(a) preparado usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular de aproximadamente 40 kDa e o composto 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa também possuem um EC_{50} inferior a 15 nM no ensaio descrito no Exemplo 4. No mesmo ensaio, a insulina humana e a insulina lispro possuem um EC_{50} de 2,3 e 0,7 nM, respectivamente.

Os dados mostram que a peguilação da posição B28 reduz a actividade de hIR *in vitro* em cerca de 10 a 20 vezes, tornando estas espécies de insulina lispro peguilada agonistas fracos de hIR. As espécies de insulina lispro peguilada também não possuem propriedades de ligação a IGFR-1 mensuráveis.

Exemplo 5: Avaliação da potência *in vivo* e perfis farmacocinéticos de insulina lispro peguilada num modelo de diabetes tipo 1 em rato

Ratos machos Sprague-Dawley Harlan com dez semanas de idade (Harlan, Indianapolis) 250-280g de peso de

corpo, foram doseados intravenosamente na veia da cauda com 45 mg/kg de estreptozocotina (STZ) em ácido cítrico 0,5M, pH 4,5, três dias antes do início do estudo. No início do estudo os animais foram distribuídos por grupos com base no peso do corpo e glucose no sangue. Apenas os animais com glucose no sangue entre 400-550 mg/dl foram incluídos no estudo. Na manhã do início do estudo, os animais receberam uma única injeção subcutânea do composto a testar a uma de várias doses pré-determinadas. Periodicamente, amostras de sangue em duplicado foram retiradas da veia da cauda e colhidas para tubos contendo EDTA di-sódico. Os níveis de glucose no sangue foram medidos com um glucómetro. Igualmente, o plasma foi colhido da amostra de sangue da veia e um imuno-ensaio radioactivo para insulina de rato comercial foi usado para determinar os níveis do fármaco administrado no plasma. A área sob a curva para a glucose no sangue ao longo do tempo (mg*h/dl) foi calculada para cada animal individual e foi usada para uma regressão logística com quatro parâmetros para determinar o ED₅₀. Neste ensaio, o composto 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear com uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa, o composto 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 30 kDa e o composto 9(b) preparado usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 20 kDa têm uma potência (ED₅₀) de 241, 138 e 69 nmol/kg, respectivamente, a partir de uma curva de dose resposta típica. Ainda, os compostos que foram capazes de baixar a glucose do sangue em ratos tratados com STZ para um nível que é normal nesta estirpe

de ratos (100 mg/dl ou menos) durante pelo menos 36 horas com uma única injeção subcutânea de 568 nmol/kg. Por outro lado, a insulina detemir normaliza a glucose durante 5-6 horas no ensaio atrás referido com uma única dose de 568 nm/kg.

Para além da avaliação dos parâmetros farmacodinâmicos, os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos em ratos para os compostos a testar foram determinados usando a amostra de sangue em duplicado. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados usando métodos independentes de modelos (WinNonlin Pro). Os valores dos parâmetros farmacocinéticos resultantes não apresentam linearidade em função da dose. A gama de valores descrita corresponde a valores de parâmetros farmacocinéticos gerados entre a dose mais elevada testada (568 nmol/kg) e a dose mais baixa (5,6 nmol/kg).

Os resultados farmacocinéticos para o composto 9(b) preparados usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 20 kDa indicaram um tempo para uma concentração máxima (T_{max}) variando entre 6 e 12 h, uma velocidade de eliminação aparente (CL/F) variando entre 0,05 e 0,14 l/h/kg, um volume de distribuição aparente (V/F) variando entre 0,6 e 7,2 l/kg e uma semi-vida de eliminação ($t_{1/2}$) variando entre 8,5 e 34,5 h.

Os resultados de farmacocinética para o composto 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa

molecular média de aproximadamente 30 kDa indicaram um T_{max} de 12 horas, um CL/F variando entre 0,05 e 0,13 L/h/kg, um V/F variando entre 0,6 e 2,0 L/kg e um $t_{1/2}$ variando entre 8,3 e 11,0 h.

Os resultados de farmacocinética para o composto 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa indicaram um T_{max} variando entre 12 e 24 horas, um CL/F variando entre 0,06 e 0,02 L/h/kg, um V/F variando entre 1,0 e 7,5 L/kg e um $t_{1/2}$ variando entre 11,1 e 48,5 h.

Quando a insulina lispro foi administrada de forma idêntica a ratos machos tratados com STZ a 568 nmol/kg, foi medido um $t_{1/2}$ de aproximadamente 1 h e um CL/F de aproximadamente 1,2 L/h/kg.

Quando a insulina detemir foi administrada de forma idêntica a ratos machos tratados com STZ em doses que variaram entre 18,9-568 nmol/kg, foi observado um $t_{1/2}$ variando entre 1,9-3,1 h e um CL/F de aproximadamente 0,8-1,7 L/h/kg.

Devido à complexidade das farmacocinéticas, as taxas CL aparentes entre detemir e os compostos de insulina lispro peguilada exemplificados são diferentes dependendo da dose usada para a determinação. No entanto, os estudos descritos no Exemplo 5 indicam que os compostos de insulina lispro peguilada exemplificados e conjugados com PEG 20-40 kDa possuem uma eliminação aparente entre cerca de 5 a 30

vezes mais baixa que detemir no rato diabético induzido com STZ.

Exemplo 6: Avaliação da duração *in vivo* da acção e características farmacocinéticas de insulina lispro peguilada num modelo de rato de diabetes tipo 2

A actividade glucodinâmica do composto 9(a) com um PEG linear de 40 kDa foi avaliada em ratos ZDF fa/fa (n=4 ratos/grupo) após uma única injeção subcutânea de veículo controlo (PBS) ou 517 nmol/kg de 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa. Amostras seriadas foram colhidas para caracterização farmacocinética e farmacodinâmica. Uma única administração subcutânea de 517 nmol/kg de 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa a ratos machos fa/fa ZDF está associada a abaixamento da glucose estatisticamente significativo que é sustentado durante pelo menos sete dias (relativamente ao placebo; $p < 0,05$). O composto 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa é também verificável ao longo de sete dias.

Exemplo 7: Titulação com conservante fenólico de PEG-B28_(92,4%)A1_(7,6%)-insulina lispro ou de uma sua mistura de (70% PEG_{20kDa}-B28_(92,4%)A1_(7,6%)-insulina lispro: 30% insulina lispro) com fenol na presença de iões cobalto.

PEG_{20kDa}-B28_(92,4%)A1_(7,6%)-insulina lispro ou insulina

lispro foi dissolvida numa solução contendo KSCN 20 mM e TRIS-ClO4 50 mM a pH8,0. A concentração alvo para ambas as proteínas é de ~4mg/ml, baseado no teor proteico ($\epsilon_{280}=1,05$ (mg/ml)⁻¹cm⁻¹). Cloreto de cobalto (41,9 mg) foi dissolvido com 1 ml de água para dar uma solução stock com uma concentração do ião cobalto de 0,176 M. Uma alíquota da solução stock de cobalto (~2 µl dependendo da concentração proteica) foi adicionada a 0,8 ml de solução de proteína de forma que a proporção molar final de ião cobalto relativamente ao hexâmero de insulina fosse igual a 4. Para avaliar a hexamerização, as distorções na química de coordenação de cobalto foram monitorizadas a 574 nm em função da concentração do conservante fenólico. Especificamente, uma solução fenólica concentrada (0,564 M) foi titulada em 0,8 ml de solução de proteína usando alíquotas de microlitros de forma que o volume final no final da titulação não excedesse 0,84 ml. A solução final foi agitada durante um mínimo de 20 minutos após cada alíquota de fenol e o espectro visível da solução ser colhido entre 400 nm e 800 nm. A absorvância registada a 574 nm foi convertida em coeficiente de extinção molar dividindo a absorvância pela concentração molar de cobalto coordenado com His^{B10}, *i.e.*, a concentração de proteína hexamérica multiplicada por dois baseado no conhecimento de que os grupos His^{B10} dos hexâmeros de insulina coordenam dois iões metálicos divalentes. Para a preparação de formulações com misturas 70/30 (mole:mole) de PEG_{20kDa}-

B28_(92,4%)A1_(7,6%)-insulina lispro e insulina lispro, a proteína é primeiro misturada e depois o cobalto é adicionado seguido de titulação com conservante fenólico.

Na insulina lispro, a sequência natural da prolina na posição B28 e a lisina na posição B29 está invertida comparativamente à insulina humana selvagem. Esta inversão conduz a um desvio conformacional no extremo C-terminal da cadeia B que espacialmente inibe a capacidade dos monómeros de insulina lispro formarem dímeros. Assim, a constante de associação de dímeros está reduzida por um factor de 300 comparativamente com a da insulina humana selvagem. Os resultados, mostrados na Tabela 1, indicam que PEG_{20kDa}-B28_(92,4%)A1_(7,6%)-insulina lispro pode surpreendentemente e inesperadamente associar-se como complexo hexamérico na presença de iões metálicos divalentes e do conservante fenólico análogo às condições de formulação usadas em Humalog®, apesar da presença de seus grupos de PEG de 20 kDa conjugados perto do domínio de dimerização da insulina lispro, já enfraquecido face à insulina humana selvagem. Ainda, as misturas 70/30 de PEG_{20kDa}-B28_(92,4%)A1_(7,6%)-insulina lispro e de insulina lispro também demonstram a capacidade de formar complexos hexaméricos, os quais suportam a preparação de formulações estáveis extemporâneas e/ou pré-misturadas de uma insulina basal e de uma insulina de actuação rápida.

Tabela 1:

Fenol (mM)	ϵ 574nm insulina lispro	ϵ 574nm PEG _{20kDa} - B28 (92,4%)A1 (7,6%)- insulina lispro	ϵ 574nm mistura 70/30
0,0	0	0	0
0,1	181	5	
0,2			42
0,3	259		93
0,4	329		125
0,6	347	26	
0,7	391	45	182
0,9	468		
1,1	514	88	244
1,4	628	146	
1,8	744		399
2,1	765	220	462
2,5	760		
2,8	799	358	535
3,5	826	413	567
4,2	828		600
4,9		329	614
5,6			635
6,3		500	
7,0	812		656
7,7		582	
9,0		596	
10,4		610	676
11,7		630	
13,8	865	648	
17,1		662	707
20,4	886	696	
23,7			736
26,9	903	725	764

Exemplo 8: Análise do estado hexamérico de PEG_{20kDa}-B28_(92,4%)Al_(7,6%)-insulina lispro formulado com Zn, fenol e/ou cálcio

As estabilidades químicas da vida de prateleira e durante o uso da insulina e de alguns análogos de insulina beneficiam da capacidade para formar complexos hexaméricos discretos em solução. A capacidade de hexamerizar da insulina e da insulina lispro, na presença de iões metálicos divalentes (Zn^{+2} ou Co^{+2}) e dos conservantes fenólicos (fenol ou m-cresol), retarda a desamidação de AsnA21 e subsequentemente minimiza a formação de partículas de elevada massa molecular (HMWP).

Para avaliar a capacidade de PEG_{20kDa}-LysB28-insulina lispro para formar hexâmeros, PEG_{20kDa}-B28_(92,4%)Al_(7,6%)-insulina lispro, com uma concentração proteica de partida baseada em $A_{276nm} = 8,6$ mg insulina lispro/ml ou 38,2 mg conjugado de insulina lispro peguilada/ml, a pH 6,7 foi dialisado em água durante a noite. A proteína dialisada foi então diluída com água para ajustar a concentração proteica a 4,6 mg/ml ou 20,6 mg de conjugado de proteína peguilada/ml. Uma solução stock de tampão 4X foi preparada a pH 7,0 com as concentrações finais do tampão fosfato a 40 mM e m-cresol a 12,8 mg/ml. A solução de óxido de zinco foi preparada dissolvendo o óxido de zinco em 0,5 ml de HCl 1N, depois diluindo com água para uma concentração final de zinco de 0,097 M. As amostras em solução para análise de dicroísmo circular (CD) próximo de UV foram preparadas com concentrações variáveis de zinco (0

a 400 μM) através da mistura de 450 μl de $\text{PEG}_{20\text{kDa}}\text{-B28}_{(92,4\%)}\text{Al}_{(7,6\%)}\text{-insulina}$ a uma concentração proteica de 4,6 mg/ml com alíquotas de solução stock de zinco (o volume total máximo de solução stock de zinco adicionado = 2,5 μl ou equivalente a 4 iões zinco por hexâmero de $\text{PEG}_{20\text{kDa}}\text{-B28}_{(92,4\%)}\text{Al}_{(7,6\%)}\text{-insulina}$) e 150 μl da solução stock de tampão fosfato 4X. O pH final foi ajustado, se necessário, a pH $\sim 7,0$. A associação hexamérica da $\text{PEG}_{20\text{kDa}}\text{-B28}_{(92,4\%)}\text{Al}_{(7,6\%)}\text{-insulina}$ lispro foi monitorizada por dicroísmo circular perto de UV a 250 nm, uma região sensível a alterações dissulfureto, usando uma célula de 0,2 cm. A elipticidade média dos resíduos foi representada graficamente em função da proporção de moles de zinco relativamente a moles de hexâmero.

Os resultados, mostrados na Tabela II, ainda indicam que $\text{PEG}_{20\text{kDa}}\text{-B28}_{(92,4\%)}\text{Al}_{(7,6\%)}\text{-insulina}$ pode surpreendentemente e inesperadamente associar-se como um complexo hexamérico na presença de iões metálicos divalentes e do conservante fenólico nas condições de formulação análogas às de Humalog®, apesar da presença de seis grupos PEG de 20 kDa conjugados perto do já enfraquecido domínio de dimerização da insulina humana selvagem da insulina lispro.

O impacto da hexamerização e ligação do ligando na estabilidade térmica de $\text{PEG}_{20\text{kDa}}\text{-B28}_{(92,4\%)}\text{Al}_{(7,6\%)}\text{-insulina}$ nas formulações a testar que promovem os hexâmeros foi igualmente estudada com experiências de CD e desnaturação térmica. O comprimento de onda usado para os estudos de desnaturação térmica foi de 240 nm, devido a ter-se

encontrado que a alteração global do sinal era superior a 240 nm do que a 250 nm usado nos estudos de ligação de Zn^{2+} , ainda que a absorvância total da solução fosse suficientemente baixa para serem obtidos dados de CD de elevada qualidade. Os dados de varrimento térmico a 240 nm numa cuvete de 1 mm foram colhidos entre 5°C e aproximadamente 95°C (a temperatura final variou ligeiramente para cada amostra) com uma velocidade de varrimento e aquisição de dados de 1°C/minuto largura da banda de 1,5 nm e tempo de resposta de 8 segundos. Os dados de desnaturação térmica podem ser representados graficamente como o sinal bruto (mdeg a 240 nm) e a fracção de desnaturação aparente (F_{unf}), a qual é dada por: $F_{unf}(Y) = [Y_{obs}(T) - Y_{nat}(T)] / [Y_{unf}(T) - Y_{nat}(T)]$ em que $Y_{obs}(T)$ é o sinal observado em função da temperatura e $Y_{nat}(T)$ e $Y_{unf}(T)$ são extrapolações lineares das linhas de base nativa e desnaturada, respectivamente. A temperatura que estabelece a desnaturação é definida como a temperatura a que F_{unf} começa a aumentar a partir de linha de base nativa ($F_{unf}=0$) e temperatura do ponto médio é a temperatura a que $F_{unf}=0,5$.

As experiências de desnaturação térmica de CD realizadas essencialmente como atrás descrito indicaram que a estabilidade térmica dos hexâmeros de PEG_{20kDa}-B28_(92,4%)Al_(7,6%)-insulina é substancialmente reduzida comparativamente com os hexâmeros de insulina lispro quando ambos são formulados de forma semelhante em TRIS 16 mM, pH 7,2, 3,1 mg/ml de m-cresol e zinco. Ainda, os estudos de desnaturação térmica de CD detectaram um aumento significativo da temperatura de fusão, dependente da concentração

de íões cálcio e cloreto, para PEG_{20kDa}-B28_(92,4%)Al_(7,6%)-insulina lispro (dados não apresentados). Mais especificamente, a temperatura de desnaturação foi observada como sendo ~30°C em TRIS 16 mM, pH 7,2, 3,1 mg/ml de m-cresol e zinco, mas aumenta dramaticamente para ~50°C na mesma formulação tendo cloreto de cálcio 75 mM. Um efeito semelhante foi observado quando da adição de NaCl (25 mM para 150 mM de NaCl) em vez de cloreto de cálcio na formulação. Assim, o cálcio e/ou cloreto podem ser excipientes muito úteis na promoção de hexâmeros em composições farmacêuticas compreendendo os compostos de PEG_{20kDa}-B28-insulina lispro de forma a aumentar a estabilidade química e/ou física da composição farmacêutica quando do armazenamento.

Tabela II: A elipticidade média dos resíduos (MRE) altera-se em função da proporção de Zn/hexâmero

Zn por hexâmero (mol/mol)	MRE PEG _{20kDa} -B28 _(92,4%) Al _(7,6%) -insulina lispro (graus cm ² dmol ⁻¹ resíduo ⁻¹)	MRE Insulina lispro (graus cm ² dmol ⁻¹ resíduo ⁻¹)
0	-116,103	-172,545
0,5	-135,764	-209,347
1	-158,861	-268,082
1,5	-190,81	-351,972
2	-213,12	-378,179
3	-255,23	-426,872
4	-298,729	-471,587

Exemplo 9: Geração de PEG_{20kDa}-B28_(95%)A1_(~5%)-insulina lispro

Uma solução tampão contendo fosfato de sódio dibásico 150 mM e EDTA 50 mM foi misturada com fosfato de sódio tribásico 150 mM para dar uma solução tampão com um pH entre 10,85 e 11,10 a uma temperatura entre cerca de 4 e cerca de 6°C. A uma temperatura entre cerca de 4 e cerca de 6°C, os cristais de insulina lispro (30-60 mg/ml) foram adicionados lentamente ao tampão com agitação suave para evitar a formação de aglomerados durante a dissolução de cristais.

Monometoxipoli(etilenoglicol) p-nitrofenilcarbonato (mPEG-NPC), tendo PEG de uma massa molecular média de aproximadamente 20 kDa \pm cerca de 2 kDa, foi dissolvido a uma concentração entre 60-120 mg/ml em água gelada (4-6°C) colocando a quantidade necessária de água gelada num vaso, agitando para criar um vortex e lentamente vertendo o pó de mPEG-NPC no centro do vortex para assegurar dispersão adequada e rápida. O pó de mPEG-NPC é um pó fino e quando da dispersão são libertadas consideráveis bolhas de ar para o vaso. A solução de mPEG-NPC no vaso fica a perder ar entre 30 e 60 minutos, dependendo do volume.

A solução de insulina lispro atrás preparada foi transferida para um vaso com uma manta provido de agitação mecânica. O vaso está instrumentado para medição da temperatura e pH. A agitação é proporcionada por um propulsor

convencional que opera num número de Reynold no regime turbulento. A solução de mPEG-NPC (PEG) é introduzida no vaso a uma velocidade tal que origina um total de tempo de adição de PEG entre 3 e 5 horas. A temperatura da manta é mantida entre 4°C e 6°C e a mistura continua. O pH da reacção é mantido entre 10,85 e 11,10 pela adição da quantidade necessária do tampão de fosfato de sódio tribásico 150 mM. O PEG foi adicionado até a proporção molar final de PEG:insulina lispro se situar na gama entre 2,5 e 4,5.

No final da adição de PEG, a temperatura da manta foi aumentada, no espaço de 60 minutos, para 25°C a 30°C e a mistura de reacção foi incubada àquela temperatura durante cerca de 3 a 6 horas mantendo o pH entre cerca de 10,7 e cerca de 11,0. No final do período de incubação, a mistura de reacção foi parada pela adição de tampão 2X (ácido acídico/acetato de sódio 100 mM, pH 4,0) e diluída com o mesmo tampão 2X para ajustar a sua condutividade (2,5 mS/cm) e concentração (3-5 mg/ml).

A mistura de reacção foi purificada usando uma coluna de cromatografia de permuta catiónica (CEX) com a resina adequada (e.g., resina Fast Flow SP Sepharose). A coluna foi cheia com resina numa altura de leito entre cerca de 15 e cerca de 30 cm, equilibrada com tampão Na-Acetato 100 mM (tampão A) e aplicada a mistura de reacção diluída (5-8 m de Produto/l de resina) a pH baixo (cerca de 2,5 a cerca de 4,0) num fluxo adequado entre cerca de 50 e

cerca de 90 cm/h. O produto mono-peguilado e a proteína que não reagiu ligam-se preferencialmente à resina, enquanto os subprodutos multi-peguilados e os reagentes em excesso passam na sua maioria através da coluna. O tampão A, com concentração salina diluída (20-30 mM), foi usado para remover quaisquer subprodutos multi-peguilados com absorção fraca, seguido de eluição com gradiente usando um tampão (8-12 VC) com concentração crescente de sal (50 -70 mM) para remover preferencialmente o produto peguilado da resina, mantendo ao mesmo tempo qualquer proteína que não reagiu na coluna. O produto foi colhido (3-5 VC) e a coluna foi lavada com tampão A com concentração salina elevada (100 mM) para remover a proteína que não reagiu.

O fluxo da coluna CEX (3-5 VC) a 3-5 mg/ml foi sujeito a filtração tangencial para aumentar a sua concentração para 40-80 mg/ml usando uma membrana de folha plana (massa molecular de exclusão 3-5 kDa). O processo foi realizado através de uma concentração inicial seguida de troca de tampões e concentração final para a concentração necessária. O fluxo do processo é mantido entre 10-20 litros por metro quadrado de área do filtro por hora (LMH) e pressão transmembranar (TMP) entre cerca de 15 e cerca de 35 psi.

A solução final do ingrediente farmacêutico activo global concentrado foi congelada a uma temperatura adequada (-20°C a -70°C) e guardada a uma temperatura adequada (-20°C a -70°C).

Exemplo 10: Perfis farmacocinéticos de insulina lispro peguilada em cães

Cães Beagle fêmeas com dois a quatro anos de idade, 7-10 kg de peso de corpo, foram doseados subcutaneamente com 18,9 nmol/kg dos compostos a testar dos exemplos. Periodicamente, amostras de sangue foram retiradas da veia cefálica ou safena e colhidas para tubos contendo EDTA di-sódico. O plasma foi colhido das amostras de sangue venoso e usou-se o radio-imunoensaio para insulina comercial para determinar os níveis do fármaco administrado no plasma. Os perfis e parâmetros farmacocinéticos foram determinados para cada um dos compostos dos exemplos que se seguem preparados essencialmente como descrito no Exemplo 2: o composto 11 preparado usando um mPEG-NPC linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa, cerca de 30 kDa e cerca de 20 kDa.

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados usando os métodos independentes de modelo (WinNonlin Pro). O composto 11, preparado usando um mPEG-NPC linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 20 kDa, apresentou um tempo até à concentração máxima (T_{max}) de aproximadamente 12 horas, uma velocidade de eliminação (CL/F) aparente de aproximadamente 0,046 L/h/kg, uma concentração máxima (C_{max}) de aproximadamente 14 nM e uma semi-vida ($t_{1/2}$) de eliminação de aproximadamente 14 horas.

O composto 11, preparado usando um mPEG-NPC linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente

30 kDa, apresentou um T_{max} de aproximadamente 24 h, um CL/F de aproximadamente 0,027 L/h/kg, um C_{max} de aproximadamente 18 nM e uma $t_{1/2}$ de aproximadamente 23 horas.

O composto 11, preparado usando um mPEG-NPC linear tendo uma massa molecular média de aproximadamente 40 kDa, apresentou uma T_{max} de aproximadamente 24 h, um CL/F de aproximadamente 0,026 L/h/kg, um C_{max} de aproximadamente 15 nM e uma $t_{1/2}$ de aproximadamente 20 horas.

A insulina detemir foi administrada de forma semelhante a cães Beagle fêmeas numa dose de 18,9 nmol/kg e apresentou uma T_{max} de aproximadamente 1,3 hora, um CL/F de aproximadamente 0,12 L/h/kg, um C_{max} de aproximadamente 23 nM e um $t_{1/2}$ de aproximadamente 3,5 horas. A Tabela III apresenta os parâmetros comparáveis no cão. A RIA específica de insulina utilizada para estes estudos detecta a insulina lispro peguilada e a insulina endógena.

Tabela III. Parâmetros PK para insulina lispro peguilada no cão

Parâmetro	20 kDa PEG-composto 11	30 kDa PEG-composto 11	40 kDa PEG-composto 11	Insulina detemir
C_{max} (nM)	14±1	18±3	15±1	23±2
T_{max} (hr)	12±0	24±0	24±0	1,3±0,6
$T_{1/2}$ (hr)	14±3	23±6	20±1	3,5±0,7
AUC (nM hr)	419±43	727±118	729±86	161±20
CL/F (L/hr/kg)	0,046±0,005	0,0027±0,004	0,026±0,003	0,12±0,02
18,9 nmol/kg de dose subcutânea; n = 3/grupo				

**Exemplo 11: Projecção de constância ("flatness")
e da dose em seres humanos**

Um critério chave para uma terapia melhorada relativamente à insulina basal é a capacidade de conseguir um perfil verdadeiramente constante, susceptível de uma única dosagem diária dos doentes. A constância suficiente é definida como uma relação pico-vale <2 . Para fins de comparação, as relações PT calculadas a partir dos perfis PK variam entre $\sim 4-9$ para detemir e $\sim 1,2-2,6$ para glargina. Os dados de PK do rato e do cão (ver Exemplos 5 e 10, respectivamente) para a dose de $18,9$ nmol/kg dos compostos exemplificados e de insulina detemir ajustam-se a modelos PK 1-CMT, parametrizados em termos de k_a , CL/F e V/F . Cada um dos parâmetros PK (P) é calculado através de uma equação alométrica da forma $P = aBW^b$, em que b é fixado a $-0,25$, $0,75$ e 1 para k_a , CL/F e V/F , respectivamente, e a é um parâmetro ajustado. As estimativas da média humana foram obtidas para cada parâmetro PK e as simulações geraram perfis médios após dose diária em seres humanos. Devido às semelhanças entre os conjugados de insulina lispro peguilada de 30 kDa e 40 kDa, as simulações estão apresentadas apenas para insulina lispro peguilada, insulina lispro peguilada de 40 kDa e insulina detemir. As simulações geradas indicam que as relações pico-vale (PT) para os compostos de insulina lispro peguilada de 20 kDa e 40 kDa são dramaticamente mais constantes do que para insulina detemir. Os resultados de simulação estão apresentados na Figura 1.

Uma estratégia para estimar a dose humana de insulina lispro peguilada necessária para eficácia é usar um termo de comparação clínico conhecido (insulina detemir) como controlo interno no modelo de eficácia de rato, assumindo que a potência relativa entre insulina lispro peguilada e a insulina detemir no modelo de rato é semelhante à potência relativa na clínica. A dose diária necessária de insulina lispro peguilada na clínica pode ser obtida usando a seguinte equação:

$$\frac{Dose_{det}}{Dose_{PEG}} = \frac{EC_{50,det}}{EC_{50,PEG}} \times \frac{CL/F_{det}}{CL/F_{PEG}}$$

A relação de potência relativa para cada um dos conjugados de insulina lispro peguilada pode ser obtida na Tabela IV. As relações de eliminação aparente relativa para insulina lispro peguilada/detemir no rato, cão e ser humano (projectado) estão compiladas na Tabela V.

Tabela IV. Potência baseada na concentração relativa de conjugados de insulina lispro peguilada e de insulina detemir no rato

Composto 11	Relação de potências detemir/ insulina lispro peguilada
PEG-insulina lispro 20 kDa	1,34±0,68
PEG-insulina lispro 30 kDa	0,68±0,35
PEG-insulina lispro 40 kDa	0,65±0,36

Tabela V. Relações de CL/F relativa para insulina detemir/compostos de insulina lispro peguilada

Composto 11	CL/F Rato	CL/F Cão	CL/F humano (projectado)
PEG-insulina lispro 20 kDa	5,5	2,6	3,3
PEG-insulina lispro 40 kDa	4,8	4,6	4,1

Usando as estimativas de potência relativa da Tabela IV e as estimativas de CL/F relativas da Tabela V, as projecções da dose média para os conjugados de insulina lispro peguilada em seres humanos é 4,2 e 6,9 nmol/kg para os compostos de insulina lispro peguilada de 20 kDa e 40 kDa, respectivamente. Estas projecções são baseadas numa dose clínica diária média de 18,5 nmol/kg de insulina detemir como descrito para os doentes diabéticos Tipo 2 na marca detemir. Quando o tempo de actuação e a potência são considerados, a estimativa da dose clínica média máxima é de ~3 vezes mais baixa do que a de insulina detemir. No melhor dos casos, a estimativa da dose clínica média para o conjugado de insulina lispro peguilada de 20 kDa, 30 kDa e 40 kDa é cerca de 20 a 45 vezes mais baixa que a insulina detemir.

Exemplo 12: Velocidades de infusão de glucose após uma única administração a voluntários saudáveis: administração de PEG_{20kDa}-B28_(≥95%)A1_(≤5%)-insulina lispro e de Glargina

Um estudo em três partes da primeiro dose em

humanos foi conduzido usando uma única dose de PEG_{20kDa}-B28_(≥95%)A1_(≤5%)-insulina lispro /LY) preparada essencialmente como descrito no Exemplo 9. A parte A inclui três períodos de estudo, nos quais os indivíduos recebem uma injeção subcutânea (SC) da dose de LY no primeiro período, seguido de uma injeção de dose de insulina glargina (0,5 U/kg) no segundo período e depois seguido de uma injeção de uma outra dose de LY no terceiro período. A parte B foi um estudo aberto de dose única e duas repetições em que os indivíduos receberam uma única dose de LY em ambos os períodos usando "clamps" de glucose de 24 e 36 horas. A parte C foi um estudo controlado por comparador, aberto, em dois períodos, dose única, sequência fixada em que dois indivíduos receberam uma única dose SC de 0,5 mg/kg de LY num período e uma única dose de 9,8 U/kg da insulina glargina no outro período. Os indivíduos submeteram-se a um procedimento de "clamp" de glucose de 24 hr em cada período nas Partes A e C e a um procedimento de duração mais longa com "clamp" de glucose (até 36 hr) em cada período na Parte B. LY foi administrado subcutaneamente como dose única nas Partes A, B e C como se segue:

Parte A doses: 0,0025, 0,0125, 0,075, 0,325 mg/kg de peso do corpo

Parte B doses: 0,15, 0,225 mg/kg

Parte C dose: 0,5 mg/kg

Os indivíduos receberam uma única dose do composto insulina lispro peguilada ou uma única dose de

insulina glargina (0,5 U/kg) como comparador e uma outra dose única de LY no 3º período. Em todos os períodos de tratamento, os indivíduos foram sujeitos a um procedimento de "clamp" euglicémico até 24/36 horas após cada injeção do composto de insulina. As velocidades de infusão de glucose (GIR) foram ajustadas para manter euglicémia, com o GIR documentado ao longo do tempo proporcionando a medição de GD da acção da insulina. O objectivo do "clamp" euglicémico de glucose é manter euglicemia através de infusão de glucose após a administração de uma dose do composto de insulina. Assume-se que a secreção de insulina endógena e a produção de glucose hepática são mínimas e que qualquer glucose que seja transferida para fora do espaço da glucose (*i.e.*, glucose metabolizada) é a consequência directa da insulina exógena administrada. O GIR neste caso será a medida glucodinâmica (GD) da acção da insulina ao longo do tempo. Todos os estudos com "clamp" de glucose foram efectuados após um jejum nocturno de aproximadamente 8 horas. Na manhã do estudo, um cateter pequeno é colocado numa veia de um braço, idealmente na fossa ante-cubital, para administração de solução de dextrose a 20% (tamponado para perto de pH neutro) sob o controlo de uma bomba volumétrica. Um outro cateter foi colocado, idealmente no pulso ou mão para amostragem de glucose venosa. Esta área é aquecida com um dispositivo de aquecimento para aproximadamente 55-60°C para amostragem de sangue venoso arteria-lizado. As amostras de sangue foram obtidas à cabeceira para determinação imediata das concentrações de glucose no sangue total usando uma técnica de automatizada da glucose

oxidase. Após amostragem do sangue basal e de um período de estabilização de aproximadamente 30 minutos, cada indivíduo recebe uma dose do composto de insulina administrada subcutaneamente. O início da injeção subcutânea de um composto de insulina é definido como tempo zero. Após completada a dosagem, conjuntamente com amostragem frequente de sangue para medição de glucose do sangue, a glucose é infundida intravenosamente a uma velocidade variável de forma a manter euglicemia até 24 a 36 horas após administração de insulina.

A amostragem de sangue ocorreu aproximadamente cada 10 minutos, durante aproximadamente 30 minutos, antes da dosagem e continuou cada 5-10 minutos durante as primeiras 2 horas após dosagem (com a opção de retirar amostras cada 2,5 minutos) e depois foi reduzida para intervalos de 10-30 minutos até ao fim do "clamp".

Durante o "clamp" de glucose, a velocidade de infusão de glucose foi ajustada para manter uma determinada concentração alvo de glucose no sangue individualmente. De preferência, a concentração alvo é próxima da glucose no sangue em jejum. O objectivo do procedimento do "clamp" de glucose é manter as concentrações de glucose no sangue dentro de +5% do valor da pré-dose alvo, o qual é definido como 5 mg/dl abaixo da glucose média no sangue em jejum. Assim, as concentrações de glucose no sangue são mantidas constantes enquanto a GIT varia. Assim, a variação na infusão da glucose reflecte a actividade do composto de

insulina a testar. A variação dos níveis de glucose no sangue das amostragens e da velocidade de infusão ao longo do "clamp" foi registada.

Um estudo, conduzido essencialmente como descrito no Exemplo 12, demonstrou, nos seres humanos, que LY possui características de uma insulina "basal" ideal: uma longa duração de acção, uma semi-vida aparente variando entre 24-44 hrs e características basais, *i.e.*, uma relação pico-vale inferior a 2 (Figura 2). Ainda, a duração da acção para LY é maior que para a insulina glargina (Figura 2). A variabilidade intra-indivíduo na glucodinâmica foi inferior a 30% (dados não apresentados) que é semelhante ou melhor à de glargina. Finalmente, os dados glucodinâmicos da Parte C do estudo (0,5 mg/kg) resultou num perfil GIR para LY "sem picos", manteve GD durante mais de 36 horas e excedeu a resposta GIR de picos para glargina (0,5 U/kg; dados não apresentados).

Exemplo 13: Estabilidade química e física de composições farmacêuticas PEG_{20kDa}-B28_(≥95%)A1_(≤5%)-insulina lispro

Como descrito nos Exemplos 7 e 8 atrás, PEG_{20kDa}-B28_(≥95%)A1_(≤5%)-insulina lispro pode associar-se como um complexo hexamérico na presença de iões metálicos divalentes e conservante fenólico nas condições de formulação análogas às de Humalog®. Assim, foram realizados estudos de estabilidade química e física nas formulações de PEG_{20kDa}-B28_(≥95%)A1_(≤5%)-insulina lispro semelhantes às formulações de

solução comercial de insulina lispro (*i.e.*, formulações de solução de Humalog®). A estabilidade química de uma formulação farmacêutica a testar foi considerada aceitável se não foi detectada alteração significativa nas várias propriedades analíticas a partir do ponto inicial para o período de armazenamento indicado a diferentes temperaturas. A estabilidade física de uma formulação farmacêutica a testar foi considerada aceitável se, quando da avaliação visual, não forem observadas partículas e quando da avaliação por microscopia de fluorescência de Tioflavina T não for observada a formação de fibrilhas ou gel.

As formulações de PEG_{20kDa}-B28_(≥95%)A1_(≤5%)-insulina lispro contendo 0,5 mole de zinco por mole de PEG_{20kDa}-B28_(≥95%)A1_(≤5%)-insulina lispro, 16 mg/ml de glicerina, 3,15 mg/ml de m-cresol, tamponada com fosfato ou citrato a pH 7,0 ou pH 6,5, respectivamente, foram preparados e testadas relativamente a estabilidade química e física. Formulações semelhantes sem zinco foram testadas para avaliar o impacto do zinco na estabilidade. As amostras a 35°C formaram partículas de gel após aproximadamente 1 mês de armazenamento e amostras a 25°C mostraram formação de um número significativo de partículas/bolhas após aproximadamente dois meses de armazenamento. Tanto as formulações tampoadas com citrato como com fosfato assim como as formulações com ou sem zinco mostraram estabilidade química/física semelhante da condição acelerada a 35°C, ainda que as amostras de tampão citrato pareçam ser piores do que as amostras tampoadas com fosfato quando avaliadas visual-

mente. A formulação de controlo da insulina lispro manteve-se límpida. Tanto as formulações de citrato como de fosfato demonstraram uma estabilidade química aceitável a 5°C durante pelo menos 13 meses.

Investigações subsequentes indicaram que o conservante fenólico, m-cresol, promoveu a gelificação quando combinado com PEG_{20kDa}-B28-insulina lispro composta e exposta a temperatura elevada (>25°C). É interessante que quando m-cresol foi adicionado a mPEG sozinho (activado ou não activado) não resultou na formação de partículas de gel quando da exposição a temperatura elevada.

Quando as formulações protótipo de insulina lispro não conferiram estabilidade aceitável aos compostos de PEG_{20kDa}-B28-insulina lispro a temperaturas elevadas, foram desenvolvidas composições farmacêuticas compreendendo compostos PEG_{20kDa}-B28 (~95%)/A1 (~5%)-insulina lispro com estabilidade física e química melhorada e adequada para comercialização como formulação farmacêutica para administração parentérica.

As formulações que se seguem de PEG_{20kDa}-B28 (~95%)/A1 (~5%)-insulina lispro (15 mg/ml) demonstraram estabilidade química e física aceitável durante uma semana a 40°C, durante um mês a 30°C, durante três meses a 25°C e durante oito meses a 5°C:

- 1) Tampão TRIS 16 mM, pH 7,0-8,0, cloreto de

cálcio 10 mm, 20 mg/ml de açúcar (sucrose ou tre-halose), 3 mg/ml (28 mM) de m-cresol e 0,5 mole de zinco por 1,0 mole de PEG_{20kDa}-B28 (~95%)/A1 (~5%)-insulina lispro

2) Tampão TRIS 16 mM, pH 7,0-8,0, cloreto de cálcio 10 mm, 3 mg/ml de poloxâmero, 3 mg/ml (28 mM) de m-cresol e 0,5 mole de zinco por 1,0 mole de PEG_{20kDa}-B28 (~95%)/A1 (~5%)-insulina lispro

3) Tampão fosfato 5 mM, pH 7,0, glicerina 130 mM, 3 mg/ml (28 mM) de m-cresol, 3 mg/ml de poloxâmero, 0,3 mole de zinco por 1,0 mole de PEG_{20kDa}-B28 (~95%)/A1 (~5%)-insulina lispro.

As formulações de PEG_{20kDa}-B28 (~95%)/A1 (~5%)-insulina lispro contendo excipientes promotores de hexâmeros, e.g., zinco, m-cresol e cálcio, de um modo geral, apresentaram maior estabilidade física e química, especialmente a temperaturas elevadas. A adição de cálcio cloreto e/ou NaCl a formulações de PEG_{20kDa}-B28 (~95%)/A1 (~5%)-insulina lispro contendo zinco e m-cresol aumentaram mais a estabilidade física de formulações expostas a temperaturas de 40°C ou superiores. Ainda, as formulações tamponadas com fosfato e citrato, de um modo geral, apresentaram menos estabilidade física que as formulações tamponadas com TRIS.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Eli Lilly and Company

<120> COMPOSTOS DE INSULINA LISPRO PEGUILADA

<130> X-18199

<150> 61/061281

PE2288375

- 91 -

<151> 2008-06-13

<150> 61/121394

<151> 2008-06-13

<160> 6

<170> PatentIn versão 3.5

<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

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 3

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 Lys Pro Thr
20 25 30

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na posição 1 está ausente

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa na posição 22 está ausente, Gly, Ser, Ala ou Asn

<400> 4

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

Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Xaa
			20		

<210> 5

<211>33

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na posição 1 está ausente

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa na posição 4 é Asn ou Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa na posição 29 é Pro, Asp, Lys, Leu, Val, Glu ou Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa na posição 30 é Lys ou Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na posição 31 está ausente ou é Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa na posição 32 está ausente, é qualquer aminoácido, é qualquer aminoácido básico ou qualquer aminoácido codificado geneticamente

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa na posição 33 está ausente, é qualquer aminoácido, é qualquer aminoácido básico ou qualquer aminoácido codificado geneticamente

<400> 5

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

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

<210> 6

<211> 33

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na posição 1 está ausente ou é qualquer aminoácido codificado geneticamente

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa na posição 4 é Asn ou Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa na posição 29 é Pro, Asp, Lys, Leu, Val, Glu ou Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa na posição 30 é Lys ou Pro

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na posição 31 está ausente ou é Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa na posição 32 está ausente ou é qualquer aminoácido codificado geneticamente

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa na posição 33 está ausente ou é qualquer aminoácido codificado geneticamente

<400> 6

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

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

Xaa

Lisboa, 4 de Maio de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto de insulina lispro peguilada da fórmula:

P-[(A)-(B)] ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em que:

A é a cadeia A da insulina lispro e possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1;

B é a cadeia B da insulina lispro e tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3; e

P é um PEG com uma massa molecular de cerca de 17,5 kDa a cerca de 40 kDa e em que A e B estão adequadamente ligadas de forma cruzada e P está ligado através de uma ligação covalente uretano ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 de B.

2. O composto da reivindicação 1, em que o PEG tem uma massa molecular na gama entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 25 kDa.

3. O composto da reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que o PEG tem uma massa molecular na gama entre cerca de 20 kDa e cerca de 25 kDa.

4. O composto de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o PEG possui uma massa molecular de aproximadamente 20 kDa.

5. O composto de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ainda caracterizado por ser capaz de ter uma relação pico-vale inferior a 2 quando da administração parentérica a um doente de uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto.

6. Um composto de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 para usar em terapia.

7. Um composto de qualquer uma das reivindicações 1 a 6 para usar no tratamento de hiperglicemia ou diabetes.

8. Uma composição farmacêutica compreendendo um composto de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 e um ou mais excipientes, diluentes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis.

9. A composição farmacêutica da reivindicação 8, compreendendo ainda um tampão TRIS numa concentração na gama entre cerca de 10 mM e cerca de 25 mM, em que o pH da referida composição farmacêutica é de cerca pH 7,0 a cerca de pH 8,0 e pelo menos um agente de isotonicidade, em que a

composição possui uma isotonicidade entre cerca de 270 mOsm e cerca de 330 mOsm.

10. A composição farmacêutica da reivindicação 8, compreendendo ainda um tampão de fosfato numa concentração na gama entre cerca de 5 mM e cerca de 10 mM e em que o pH da referida composição farmacêutica é de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 7,5 e pelo menos um agente de isotonicidade, em que a composição possui uma isotonicidade entre cerca de 270 mOsm e cerca de 330 mOsm.

11. A composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações 8 a 10, compreendendo o composto de insulina lispro peguilada numa concentração entre cerca de 15 mg/ml e cerca de 40 mg/ml, zinco numa proporção de zinco para o composto de insulina lispro peguilada entre cerca de 0,33 e cerca de 0,83 e m-cresol numa concentração entre cerca de 10 mM e cerca de 40 mM a um pH entre cerca de 7,0 e cerca de 8,0.

12. A composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações 8 a 11, ainda compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de insulina lispro consistindo numa cadeia A e numa cadeia B, em que a cadeia A possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 e a cadeia B possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3; e em que a cadeia A e a cadeia B estão adequadamente ligadas de forma cruzada.

13. Um processo de preparação de um composto de insulina lispro peguilada da fórmula:

P-[(A)-(B)] ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, em que:

A é a cadeia A da insulina lispro e possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1;

B é a cadeia B da insulina lispro e tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3; e

P é um PEG com uma massa molecular de cerca de 20 kDa a cerca de 40 kDa e em que A e B estão adequadamente ligadas de forma cruzada e P está ligado através de uma ligação covalente uretano ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 de B, a qual se caracteriza pela reacção do grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 de B com monometoxipoli(etilenoglicol)-nitrofenilcarbonato (mPEG-NPC) tendo uma massa molecular média mássica entre cerca de 20 kDa e cerca de 40 kDa num solvente aquoso a um pH entre cerca de 8,5 e cerca de 11,5 e entre cerca de 25°C e cerca de 30°C durante um período de tempo entre cerca de 3 e cerca de 6 horas.

14. O processo da reivindicação 13 tendo uma proporção molar de PEG:insulina lispro entre cerca de 2,5 e cerca de 5,0.

15. O processo da reivindicação 13 ou 14, em que a massa molecular média mássica do mPEG-NPC é de aproximadamente 20 kDa.

16. O processo de qualquer uma das reivindicações 13 a 15 em que o pH da reacção é mantido entre cerca de 10,5 e cerca de 11,5.

17. O processo de qualquer uma das reivindicações 13 a 16 em que a reacção é conduzida entre cerca de 25°C e cerca de 30°C, durante cerca de 3 horas.

Lisboa, 4 de Maio de 2012

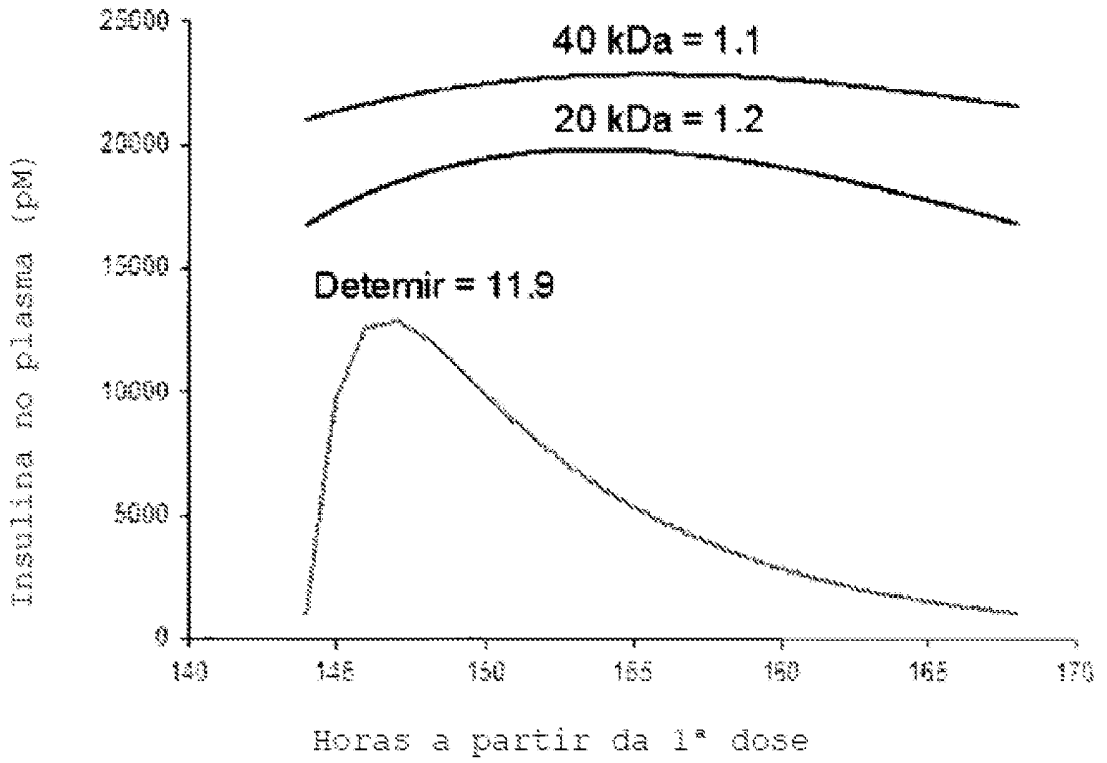


Figura 1

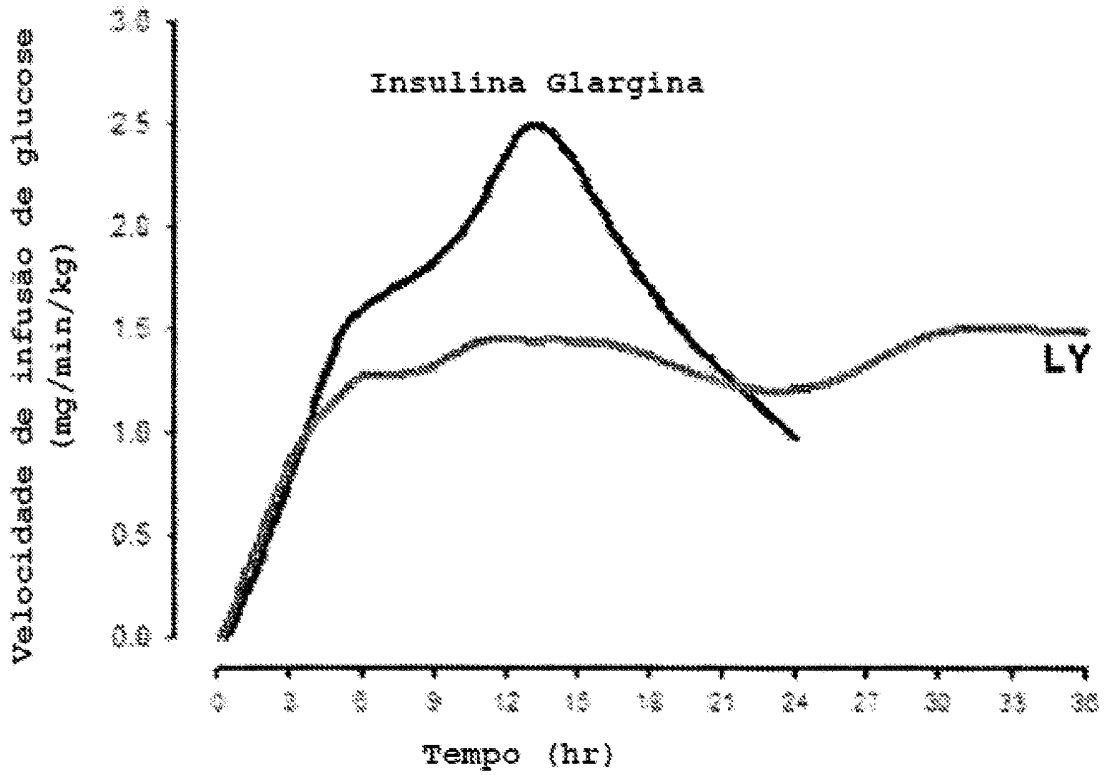


Figura 2

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 4179337 A
- WO 2008079841 PCT
- WO 2004091494 PCT
- WO 2008015099 PCT
- WO 2008084051 A
- WO 9615804 PCT
- WO 03053339 A
- US 3528980 A
- US 5514646 A
- US 5618913 A
- US 5750497 A
- US 6011007 A
- US 6251858 B
- EP 254516 A
- EP 280534 A
- US 5700882 A
- EP 214826 A
- WO 0162827 PCT
- WO 2006026745 A
- WO 2006096535 A
- WO 2006036825 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- KIM et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54, 505-530
- ZALIPSKY, S. *Bioconjugate Chem.*, 1995, vol. 6, 150-165
- VERONESE et al. *Applied Biochem. and Biotech.*, 1985, vol. 11, 141-152
- ROBERTS, M. et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54, 459-478
- JENS BRANGE. *Stability of insulin*. Kluwer Academic Publishers, 1994
- BIRNBAUM, D. T. et al. *Pharmaceutical Res.*, 1997, vol. 14, 25-36
- RAHUEL-CLERMONT, S. et al. *Biochemistry*, 1987, vol. 36, 5837-5845
- SOOS, M.A. et al. *Biochem J.* 1986, vol. 235, 199-208