(11) Número de Publicação: **PT 2476430 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 38/28 (2014.01) ***A61K 47/48*** (2014.01)

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

(22) Data de pedido: **2009.06.09**

(30) Prioridade(s): **2008.06.13 US 61281 P**
2008.12.10 US 121394 P

(43) Data de publicação do pedido: **2012.07.18**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.05.14**
141/2014

(73) Titular(es):
ELI LILLY AND COMPANY
LILLY CORPORATE CENTER, INDIANAPOLIS
INDIANA 46285 **US**

(72) Inventor(es):
JOHN MICHAEL BEALS **US**
BRANDON DOYLE **US**
RYAN JOHN HANSEN **US**
SHAHRIAR SHIRANI **US**
LIANSHAN ZHANG **US**

(74) Mandatário:
ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

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

(57) Resumo:
A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE AO CAMPO DA DIABETES. MAIS PARTICULARMENTE, A INVENÇÃO REFERE-SE A COMPOSTOS LISPRO DE INSULINA PEGUILADA QUE SÃO PEGUILADOS COM UM POLI(ETILENO GLICOL) DE ELEVADO PESO MOLECULAR, SÃO ALTAMENTE SOLÚVEIS A PH FISIOLÓGICO, TÊM UMA DURAÇÃO DE ACÇÃO PROLONGADA, E SÃO CARACTERIZADOS POR RAZÕES PICO-VALE FARMACOCINÉTICAS, FARMACODINÂMICAS E/OU DE ACTIVIDADE INFERIORES A 2. A INVENÇÃO TAMBÉM ESTÁ RELACIONADA COM MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE TAIS MOLÉCULAS, COM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO-AS E COM AS SUAS UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS.

RESUMO

"COMPOSTOS LISPRO DE INSULINA PEGUILADA"

A presente invenção refere-se ao campo da diabetes. Mais particularmente, a invenção refere-se a compostos lispro de insulina PEGuilada que são PEGuilados com um poli(etileno glicol) de elevado peso molecular, são altamente solúveis a pH fisiológico, têm uma duração de acção prolongada, e são caracterizados por razões pico-vale farmacocinéticas, farmacodinâmicas e/ou de actividade inferiores a 2. A invenção também está relacionada com métodos de obtenção de tais moléculas, com composições farmacêuticas contendo-as e com as suas utilizações terapêuticas.

DESCRIÇÃO

"COMPOSTOS LISPRO DE INSULINA PEGUILADA"

A presente invenção está relacionada com o campo da diabetes. Mais particularmente, a invenção está relacionada 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 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 requere um pulso de insulina para gerir o aumento repentino de glucose no sangue relacionado com a refeição e (b) a fase pós-absortiva que requer uma quantidade sustentada de insulina para regular a produção de glucose hepática para manutenção do nível óptimo de glucose no sangue em jejum. Deste modo, a terapia eficaz com insulina para diabéticos envolve geralmente a utilização combinada de dois tipos de formulações de insulina exógenas: uma insulina de acção rápida na altura das refeições, proporcionada por injecções de bolus e uma

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

As terapias de substituição de insulina actualmente disponíveis são deficientes num 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 o controlo da glucose basal durante um dia inteiro quando administradas 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-adsortiva, com uma única injecção diária. Além disso, a omissão de uma única injecção das terapias actuais pode conduzir ao aumento significativo nos níveis de "pico-vale" do fármaco, resultando em limitações no controlo da glucose. Ainda, a utilização de estratégias de insolubilidade para prolongar a libertação de insulina em formulações tradicionais de insulina de acção intermédia e prolongada, por exemplo, suspensões cristalinas de insulina protamina neutra Hagedorn (NHP) e ULTRALENTE®, ou a estratégia de precipitação *in vivo* da insulina glargina, aumenta a variabilidade intra-injecção resultando no aumento da variabilidade no perfil de dose-resposta. Mais especificamente, as suspensões NHP e ULTRALENTE® requerem a mistura mecânica para assegurar a uniformidade do produto, possuem

uma maior variabilidade intra-individuo e tendem a originar picos em vez 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 que adequado da glucose sanguínea e numa maior susceptibilidade a episódios de hipoglicemia que podem ser fatais. Adicionalmente, os análogos modernos da insulina basal não são facilmente misturáveis com formulações de acção rápida ou imediata. Assim, as terapêuticas actuais de substituição de insulina ainda deixam os doentes diabéticos susceptíveis a episódios hipoglicémicos que podem ser fatais, complicações médicas graves a longo prazo da diabetes e/ou impõem considerável inconveniência e desvantagens na qualidade de vida do doente.

A Patente U.S. No. 4,179,337 intitulada "Polipéptidos não imunogénicos" descreve insulina conjugada com moléculas de PEG lineares com um peso molecular entre cerca de 500 e cerca de 20,000 Da. Hinds e Kim divulgaram insulina conjugada com monometoxipoli(etilenoglicol) de baixo peso 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 afirmaram que restringiram o seu estudo a conjugados de insulina com mPEG de baixo peso molecular "dado que se verificou

[previamente] que a ligação de mPEG de peso molecular mais elevado (5000 Da) baixa consideravelmente a bioactividade do conjugado". A Publicação de Pedido de Patente Internacional PCT No. WO 2006/079641 descreve a conjugação de derivados de insulina, incluindo insulina lispro, com pequenos polímeros ramificados. O Pedido de Patente Internacional PCT Publicação No. WO 2004/091494 divulga, entre outras, moléculas de insulina conjugadas com moléculas de PEG lineares e ramificadas com um peso molecular total de PEG até cerca de 10 kDa e cerca de 20 kDa, respectivamente. As Publicações de Pedidos de Patente Internacional PCT Nos. WO 2008/015099 (publicada a 7 de Fevereiro de 2008) e WO 2008/084051 (publicada a 17 de Julho de 2008) divulgam, entre outros, vários análogos de insulina conjugados com moléculas de PEG com um peso molecular nominal na gama de 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 substituição de insulina. Em particular, são necessárias insulinas basais solúveis que possam ser misturadas com formulações de insulina prandial, que possuam perfis de acção prolongados no tempo (isto é, que sejam capazes de controlar adequadamente os níveis de glucose no sangue com uma dose diária ou injecções menos frequentes), actividade mais plana, perfis farmacocinéticos (isto é, relações "pico-vale" mais baixas), variabilidade intra-doente reduzida (isto é, perfil de tempo-acção mais

previsível traduzindo-se numa incidência reduzida de hipoglicemia e/ou aumento de peso) e/ou menor irritação no local de injecção ou dor aquando da injecção.

Descrevemos aqui a descoberta de que a insulina lispro pode ser PEGuilada com derivados do poli(etileno glicol) de elevado peso 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 podem ser misturados com outras formulações de insulina prandial de utilização comum.

De acordo com a presente invenção, proporciona-se uma composição farmacêutica compreendendo um composto de insulina lispro PEGuilada da Fórmula I: P-[(A)-(B)] ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em que P é um PEG com um peso molecular na gama entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 40 kDa; 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 em que A e B estão adequadamente reticuladas e P está ligado através de uma ligação covalente uretano ao grupo epsilon-amino da lisina na posição 28 de B; um ou mais excipientes, diluentes ou veículos farmaceuticamente aceitáveis; e uma quantidade terapeuticamente eficaz de insulina lispro.

Preferentemente, a composição farmacêutica compreende ainda uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 compreendendo ainda um conservante fenólico

farmaceuticamente aceitável e uma quantidade de zinco suficiente a para causar a hexamerização dos compostos de insulina lispro PEGuilada.

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

A presente invenção também proporciona composições compreendendo compostos de insulina mono-PEGuilados 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.

A presente invenção também proporciona composições farmacêuticas compreendendo uma insulina lispro PEGuilada da Fórmula I e um ou mais conservantes, agentes de isotonicidade, iões metálicos ou tampões farmaceuticamente aceitáveis. Nalgumas realizações da invenção, 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.

A presente invenção também proporciona métodos

para o tratamento de hiperglicemia, diabetes mellitus ou diabetes gestacional compreendendo a administração a um paciente ou uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um composto de insulina lispro PEGuilado da presente invenção.

A presente invenção inclui também uma composição farmacêutica compreendendo um composto de insulina lispro da presente invenção para utilização em terapia.

A presente invenção inclui também uma composição farmacêutica compreendendo um composto de insulina lispro da presente invenção para utilização no tratamento de hiperglicemia, 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}-$B28_{(\geq\sim95\%)}$/$A1_{(\leq\sim5\%)}$-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 de "alisador móvel de regressão LOESS" (Splus 2000, Professional Edition, MathSoft, Inc) desenvolvida nos Lilly Research Laboratories foi usada para ajustar os dados observados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As abreviaturas que se seguem foram aqui usadas: ACN: Acetonitrilo. Boc: *terc*-butoxicarbonilo. BSA: albumina sérica bovina. DCM: diclorometano, cloreto de metileno. DMF: *N*,*N*-dimetilformamida. DMSO: Dimetilsulfóxido. DTT: Ditiotreitol. EDTA: Ácido etilenodiaminatetracético. Et: Etilo. EtOH: Etanol. 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 liquida de alta eficiência em fase inversa. SEC: cromatografia de exclusão molecular. SEM: erro padrão da média. SPA: ensaio de proximidade de cintilação. TFA: ácido trifluoroacético. Todas as abreviaturas de aminoácidos usadas nesta divulgação são as aceites pelo 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 nativa de qualquer espécie incluindo, mas sem limitação, a insulina suína, insulina bovina e insulina humana. A insulina nativa ou nativa refere-se a insulina com uma

sequência de aminoácidos correspondente à sequência de aminoácidos da insulina natural. As sequências de polinucleótidos e de aminoácidos que codificam para a insulina de uma série de espécies diferentes são bem conhecidas dos peritos na técnica. 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 (isto é, isolada a partir de uma fonte natural), produzida por biossíntese ou por síntese química. Pretende-se que o termo "insulina" inclua qualquer derivado e/ou análogo de insulina.

Um "análogo de insulina" ou "derivado de inslina" é aqui definido como proteína com actividade de insulina e substancialmente a mesma sequência de aminoácidos que a 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 técnica. Ver, por exemplo, Publicações de Pedidos de Patente Internacionais PCT Nos. WO 96/15804 e WO 03/053339; Patentes U.S. Nos 3,528,960, 5,514,646, 5,618,913, 5,750,497, 6,011,007, 6,251,856 e Patentes EP Nos. 254,516 e 280,534. Uma lista exemplificativa mas não exaustiva de análogos de insulina, conhecidos dos peritos na técnica, inclui insulina aspart, insulina lispro, insulina glargina, insulina detemir e insulina glulisina. Além disso, o termo "insulina" também cobre aqui compostos que podem ser

considerados como sendo tanto um derivado de insulina como um análogo de insulina. Exemplos de tais compostos estão descritos nas Patentes U.S. Nos. 5,750,497 e 6,011,007. Um exemplo específico de tal composto conhecido na técnica é a insulina detemir.

Vários análogos e/ou derivados de insulina são conhecidos como sendo análogos de insulina de "acção rápida" e "acção imediata". Os termos "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 de acção mais curta 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 técnica. Ver, por exemplo, Patente U.S. No. 5,700,662 e Patente Europeia No. 214 826. A insulina lispro é um análogo monomérico da insulina de acção rápida em que a prolina na posição 28 da cadeia B da insulina nativa (SEQ ID NO:2) e a lisina na posição 29 da cadeia B nativa (SEQ ID NO:2) foram trocadas. Assim, a insulina lispro é conhecida na técnica por várias designações incluindo, mas sem limitação a insulina humana-$Lys^{B28}Pro^{B29}$, insulina humana-LysB28ProB29 e insulina humana B28Lys, B29Pro.

O termo "reticulado" significa ligações dissulfureto existentes entre os resíduos de cisteína. Por exemplo, a insulina humana adequadamente reticulada 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: 1.

Como aqui usado, "insulina lispro conjugada com PEG" ou "insulina lispro PEGuilada" refere-se à insulina humana lispro, ou a 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 da presente invenção pretende significar a capacidade de baixar significativamente os níveis de glucose do sangue em pelo menos um modelo animal *in vivo* geralmente aceite incluindo, mas sem limitação, os

modelos animais de diabetes do Tipo 1 e do Tipo 2 descritos abaixo no Exemplo 5 e no Exemplo 6, respectivamente. Deste modo, a actividade de insulina inclui a capacidade de um composto de insulina lispro PEGuilada em 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 cerca de 36 horas após uma única injecção subcutânea numa dose de 568 nmol/kg.

O termo "polietilenoglicol" ou "PEG" refere-se a um composto de polialquileno glicol ou seu derivado, com ou sem agentes de acoplamento ou derivatização com grupos de acoplamento ou de activação. Na sua forma típica, PEG é um polímero linear com grupos hidroxilo terminais e possui a fórmula $HO\text{-}CH_2CH_2\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}CH_2CH_2\text{-}OH$. O número de subunidades repetidas "*n*" no PEG é aproximadamente a massa molecular descrita em Dalton. 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 ($-(CH_2CH_2O)$) de PEG possui um peso molecular de aproximadamente 44 Dalton. Assim, a massa molecular do polímero de PEG depende do número (*n*). Os PEGs ligados aos compostos de insulina lispro PEGuilada da presente invenção terão *n* na gama entre cerca de 400 e cerca de 1000 subunidades. De preferência, os PEGs ligados aos compostos de insulina lispro PEGuilada da presente invenção possuirão *n* na gama entre cerca de 400 e cerca de 750. Mais preferentemente, os PEGs ligados aos

compostos de insulina lispro PEGuilada da presente invenção possuirão *n* na gama entre cerca de 400 e cerca de 550. Preferencialmente, os PEGs ligados aos compostos de insulina lispro PEGuilados da presente invenção possuirão *n* entre cerca de 400 e cerca de 500.

São conhecidos numerosos derivados de PEG e métodos para os preparar e conjugar a uma proteína, tal como insulina ou insulina lispro são conhecidos na técnica e são adequados para usar na presente invenção. Ver, por exemplo, Pedido de Patente Internacional PCT Pub. Nos. WO 01/6287, WO 2006/028745, WO 2006/096535, WO 200 6/036825; 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 na invenção é um PEG tendo uma extremidade do polímero que termina com um grupo relativamente inerte, tal como um grupo alcoxilo inferior C*1-6*. De preferência, o PEG é monometoxi-PEG (normalmente referido como mPEG), o qual é uma forma linear de PEG em que uma extremidade do polímero é um grupo metoxilo ($-OCH_3$). Ainda mais preferentemente, o PEG usado na invenção é um "mPEG activado" em que uma extremidade do PEG linear termina com um grupo metoxilo e a outra extremidade termina com um grupo reactivo, adequado para a ligação 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 peritos na técnica, 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, três são normalmente usadas: a média numérica, a média mássica e as massas moleculares médias z. Como aqui usado, a frase "massa molecular média" pretende referir-se à massa molecular média mássica que pode ser medida usando técnicas conhecidas incluindo, mas sem limitação, a espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo (MALDI-TOF), cromatografia de permeação em gel ou outras técnicas de cromatografia liquida, técnicas de dispersão da luz, ultracentrifugação e viscosimetria. A fórmula para calcular a massa molecular média mássica pode ser representada por $\Sigma(M_i^2 N_i)/\Sigma(M_i N_i)$ em que N_i é a fracção molar (ou fracção numérica) 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 polidispersão (PDI) e proporciona uma estimativa grosseira da amplitude da distribuição. Os reagentes PEG adequados para a preparação dos compostos de insulina lispro

PEGuilados da invenção são tipicamente polidispersos (isto é, a massa molecular média numérica e a massa molecular média mássica dos polímeros não são iguais). De preferência, a PDI para os reagentes PEG usados para preparar os compostos ou composições da presente invenção é inferior a cerca de 1,1. Mais preferentemente, a PDI para os reagentes PEG usados para preparar os compostos ou composições da presente invenção é inferior a cerca de 1,05.

Relativamente aos compostos de insulina lispro PEGuilada da presente invenção, o PEG ligado covalentemente a uma molécula de insulina lispro possui um peso 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 um peso molecular médio entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 40 kDa. De preferência, o PEG ligado covalentemente a uma molécula de insulina lispro possui um peso 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 um peso molecular médio entre cerca de 20 kDa e cerca de 30 kDa. Mais preferentemente, o PEG ligado covalentemente a uma molécula de insulina lispro possui um peso molecular na gama entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 25 kDa (n situa-se na gama entre cerca de 400 e cerca de 550) ou o PEG possui um peso molecular médio entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 25 kDa. Mais preferentemente, o PEG ligado covalentemente a uma molécula de insulina lispro possui um peso molecular na gama entre cerca de 17,5 kDa e

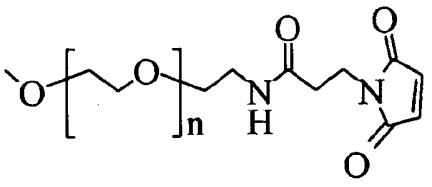
cerca de 20 kDa (n situa-se na gama entre cerca de 400 a cerca de 500) ou o PEG possui um peso molecular médio entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 20 kDa.

Nalgumas realizações, os compostos de insulina lispro PEGuilada da presente invenção são preparados pela ligação covalente de um mPEG activado com um peso molecular médio pretendido à insulina lispro. As condições de reacção para a PEGuilação de insulina lispro variarão dependendo do PEG particular utilizado, 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 peritos na técnica. As condições experimentais optimizadas para uma estratégia de PEGuilação particular podem ser facilmente determinadas, tipicamente usando experimentação de rotina, por alguém perito na técnica.

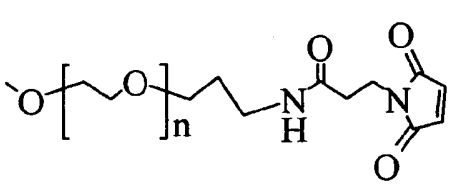
Descrevem-se aqui compostos de insulina lispro PEGuilados preparados por conjugação indirecta de um mPEG activado que seja relativamente selectivo para tióis, tal como mPEG-maleimida (mPEG-MAL) ou um mPEG-tiol (mPEG-SH) à insulina lispro através de conjugação do mPEG activado selectivo para tióis a uma funcionalidade tiol que tenha sido introduzida na insulina lispro usando modificadores de "amina para tiol", tais como N-succinimidil-S-acetiltio-proprionato (SATP) e N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA). Mais preferentemente, o mPEG activado empregue para ligar covalentemente um PEG a um grupo tiol (sulfidrilo) na

insulina lispro é uma mPEG-maleimida tal como (a), (b) ou (c) mostrado abaixo.

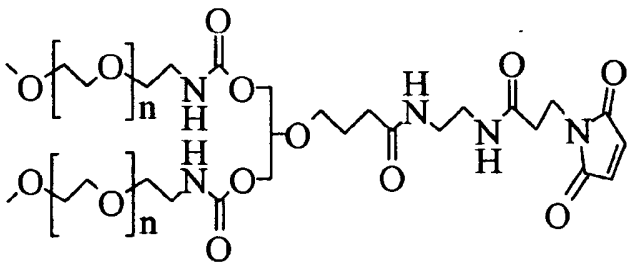
(a)



(b)



(c)



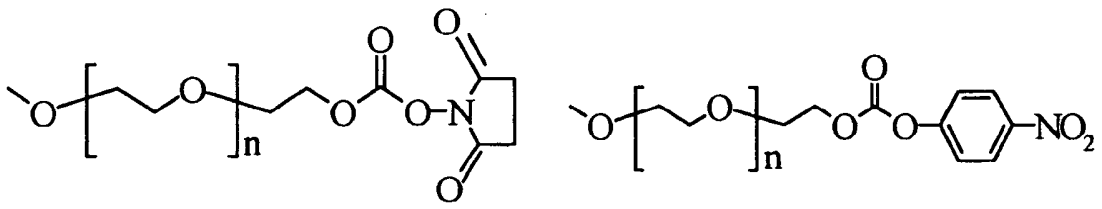
Um método preferido de preparação de compostos de insulina lispro PEGuilada utiliza adição de Michael para formar uma ligação tioéter estável. A reacção é altamente especifica e decorre em condições suaves na presença de outros grupos funcionais. Por exemplo, mPEG-maleimida é útil como um mPEG activado para a preparação de conjugados de insulina lispro PEGuilados da presente invenção. De preferência, o procedimento de PEGuilação usa um excesso molar de uma insulina lispro derivatizada com tiol relativamente a mPEG-maleimida para conduzir a reacção até à sua finalização completa. 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 pela conjugação de um mPEG activado que é relativamente especifico para aminas. mPEGs activados adequados, principalmente para PEGuilação especifica de aminas da insulina lispro, incluem propionato de mPEG-succinimidilo (mPEG-SPA), butanoato de mPEG succinimidilo (mPEG-SBA), α-metilbutanoato mPEG-succinimidilo (mPEG-SMB), carbonato de mPEG-succinimidilo (mPEG-SC), carbonato de mPEG-benzotriazole e carbonato de mPEG-p-nitrofenilo (mPEG-NPC).

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

mPEG-SC: mPEG-NPC:



Os compostos de insulina lispro PEGuilada da invenção são tipicamente purificados usando uma ou mais técnicas de purificação, tais como cromatografia de troca iónica, cromatografia de exclusão molecular, 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 RMN.

A insulina lispro, usada para preparar os compostos de insulina lispro PEGuilada da presente invenção, 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 ADN recombinante. Por exemplo, a Patente U.S. No. 5,700,662 (Chance et al.) e a Patente Europeia No. 214,826 (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 pro-insulina usando técnicas de ADN recombinante. Em realizações preferidas, um precursor do tipo pro-insulina é usado para preparar a insulina lispro usada para preparar a insulina lispro PEGuilada da presente invenção.

A presente invenção proporciona um composto da Fórmula I:

P-[(A)-(B)] ou um seu sal farmaceuticamente 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 um peso molecular na gama entre cerca de 17,5 kDa e cerca de 40 kDa e em que A e B estão adequadamente reticuladas 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 à insulina lispro através de uma ligação uretano ou tioéter; e (b) o composto caracteriza-se por ter um Ki 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 meia-vida de eliminação superior a cerca de 6 horas, cerca de 8 horas, cerca de 10 horas, cerca de 12 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 inferior 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 injecção subcutânea do composto numa dose de cerca de 568 nmol/kg. Compostos preferidos são aqueles em que: (a) P está ligado covalentemente à insulina lispro através de uma ligação uretano; (b) o composto caracteriza-se por ter um Ki para o receptor da insulina humana de aproximadamente 10 nM ou inferior; (c) o composto caracteriza-se por ter uma meia-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 injecção subcutânea do composto numa dose de cerca de 568 nmol/kg. Os compostos mais preferidos são aqueles em que: (a) P está ligado covalentemente à insulina lispro através de uma ligação uretano; (b) o composto é caracterizado por ter um Ki para o receptor da insulina humana de aproximadamente 10 nM ou menos; (c) o composto caracteriza-se por ter uma meia-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 injecção subcutânea do composto a uma dose de cerca de 568 nmol/kg e (e) o composto caracteriza-se por ter uma meia-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 a invenção, uma realização da invenção proporciona um composto de insulina lispro mono-PEGuilada, compreendendo um PEG tendo um peso molecular médio 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 (insulina lispro PEG-LysB28). É aqui descrita insulina lispro mono-PEGuilada compreendendo PEG com um peso molecular médio 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 preferentemente, a insulina lispro mono-PEGuilada compreende um PEG tendo um peso molecular médio de aproxi-

madamente 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 preferentemente, a insulina lispro mono-PEGuilada compreende um PEG tendo um peso molecular médio 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 (insulina lispro PEG-LysB28 20 kDa). Preferivelmente, a insulina lispro mono-PEGuilada compreende um PEG tendo um peso molecular médio de aproximadamente 20 kDa ligado ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B da insulina lispro (isto é, insulina lispro $PEG_{20\ kDa}$-LysB28).

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 um peso 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 preferentemente, a insulina lispro mono-PEGuilada compreende um PEG tendo um peso 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. Preferencialmente, a insulina lispro mono-PEGuilada compreende um PEG tendo um peso molecular de aproximadamente 20 kDa ligado ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 da cadeia B da insulina lispro e a insulina lispro PEG-LysB28 caracteriza-se por ter uma meia-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 uma mistura de compostos de insulina lispro 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 aquelas 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 preferentemente, 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 compostos de insulina lispro mono-PEGuilados da Fórmula I. Ainda mais preferentemente, 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 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 preferentemente, 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 preferentemente, 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 preferentemente, 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. Ainda mais preferentemente, 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 preferentemente, 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 preferentemente, 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 meia-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. Preferivelmente, 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 meia-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.

A presente invenção também inclui um processo de preparação de um composto de insulina lispro PEGuilada da fórmula:

P-[(A)-(B)] ou um seu sal farmaceuticamente 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 um peso molecular na gama entre cerca de 20 kDa e cerca de 40 kDa e em que A e B estão adequadamente reticuladas e P está ligado através de uma ligação covalente de uretano ao grupo épsilon-amina 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 p-nitrofenil carbonato de monometoxipoli(etileno glicol) (mPEG-NPC) tendo uma média mássica de peso molecular 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 preferentemente, 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. Ainda mais preferentemente, 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. Preferencialmente 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 da presente invenção com diferentes massas moleculares podem ser isolados usando várias técnicas conhecidas pelos peritos na técnica incluindo, sem limitação, a cromatografia de filtração em gel e/ou cromatografia de permuta iónica. 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, numa

reacção exemplificativa em que uma insulina lispro é conjugada com um mPEG activado tendo um peso molecular médio de aproximadamente 20 kDa, a mistura de reacção resultante pode conter insulina lispro não modificada tendo um peso molecular de aproximadamente 5808 Dalton, insulina lispro mono-PEGuilada tendo um peso molecular médio de aproximadamente 25808 Dalton, insulina lispro di-PEGuilada tendo um peso molecular médio de aproximadamente 45808 Dalton e insulina lispro tri-PEGuilada tendo um peso molecular médio de cerca de 65808 Dalton. No entanto, dado que as técnicas de filtração em gel separam os compostos com base no tamanho hidrodinâmico, a insulina lispro mono-PEGuilada conjugada com um mPEG com um peso molecular médio de cerca de 20 kDa migrará durante a filtração em gel como uma proteína de aproximadamente 82 kDa apesar de ter um peso molecular médio de cerca de 25808 Dalton. Os peritos na técnica esperariam que uma espécie di- e tri-PEGuilada com um mPEG de massa molecular média de cerca de 20 kDa tivesse tempos de migração ou de retenção muito diferentes permitindo a sua purificação e/ou quantificação.

A frase "meia-vida no plasma" refere-se ao tempo que leva para a concentração no plasma do fármaco no corpo cair para metade. Um termo usado em alternativa é "meia-vida de eliminação", o qual corresponde à velocidade log-linear terminal de eliminação. Os peritos na técnica saberão que a meia-vida é um parâmetro derivado que muda em função da eliminação e do volume de distribuição. Os termos "prolongada", "mais longa" ou "aumentada" usados no

contexto de meia-vida no plasma ou meia-vida de eliminação são usados indiferenciadamente e destinam-se a significar que existe um aumento estatisticamente significativo na meia-vida de um composto a testar (por exemplo, uma insulina lispro PEGuilada) relativamente à da molécula de referência (por exemplo, insulina lispro) conforme determinado em condições comparáveis .

A 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, esperar-se-ia que a sua meia-vida aumentasse. No entanto, esta relação reciproca é exacta apenas quando não existe alteração no volume de distribuição. Uma relação aproximada útil entre a meia-vida log-linear terminal ($t_{1/2}$), eliminação (CL) e volume de distribuição (V) é dada pela equação: $t_{1/2}$~0,693 (V/CL). A eliminação não indica quanto fármaco é removido mas antes o volume de fluido biológico, tal como sangue ou plasma, que teria de ser completamente removido de fármaco 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 a administração de compostos

ou composições da presente invenção 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 usada na presente invenção são eficazes no tratamento de hiperglicemia através da administração a um doente necessitado de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais compostos da Fórmula I. Como aqui usada, a frase "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se à quantidade de um composto de insulina lispro PEGuilado da Fórmula I ou sias composições 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 preferentemente, uma quantidade terapeuticamente eficaz situa-se entre 0,01 nmol/kg e cerca de 50 nmol/kg. Ainda mais preferentemente, uma quantidade terapeuticamente eficaz situa-se entre 0,01 nmol/kg e cerca de 20 nmol/kg. Ainda mais preferentemente, uma quantidade terapeuticamente eficaz situa-se entre 0,01 nmol/kg e cerca de 10 nmol/kg. Ainda mais preferentemente, uma quantidade terapeuticamente eficaz situa-se entre 0,1 nmol/kg e cerca de 7,5 nmol/kg. Ainda mais preferentemente, uma quantidade terapeuticamente eficaz situa-se entre 0,1 nmol/kg e cerca de 5 nmol/kg. Preferivelmente, uma quantidade terapeuticamente eficaz situa-se entre 0,5 nmol/kg e cerca de 5

nmol/kg. No entanto, deve entender-se 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 (isto é, 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 da invenção 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 normal 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 peso molecular mais elevado (por exemplo, dímeros, oligómeros, polímeros).

Um estudo exaustivo da estabilidade química da insulina é apresentado por Jens Brange em "Stability of Insulin", Kluwer Academic Publishers, 1994. O prazo de validade dos produtos de insulina está principalmente condicionado pela formação de agregados solúveis (dímeros, oligómeros e polímeros) ao longo do tempo, apesar do facto das composições de insulina serem tipicamente armazenadas a baixa temperatura de não mais de 2-8°C, o que melhora consideravelmente o prazo de validade comparativamente com o armazenamento, por exemplo, à temperatura ambiente. Por outro, os produtos de insulina são sujeitos à formação de agregados insolúveis (fibrilhas) como resultado de agitação, por exemplo, quando transportados 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 apresentar características de estabilidade química e física aceitáveis de modo a serem usadas terapeuticamente.

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 da invenção, 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 da invenção, 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 da invenção pode ser medida de através da determinação de atributos analíticos em condições especificas, 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 molecular, por exemplo. Os resultados podem ser então monitorizados e comparados com parâmetros especificados previamente.

O termo "estabilidade física" como aqui usado refere-se à tendência de uma composição de insulina lispro PEGuilada em formar agregados de proteína insolúvel como resultado de uma acção física, tal como agitação de uma composição de insulina lispro PEGuilada. A estabilidade física dos compostos de insulina lispro PEGuilada da invenção aquando do armazenamento durante um período de tempo definido a várias temperaturas e em várias formulações farmacêuticas pode ser avaliada por métodos conhecidos na técnica, 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 pela agregação ou precipitação de proteínas ou complexos na formulação. Outros métodos para a 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 da invenção proporcionam composições farmacêuticas adequadas para administração a um doente, particularmente a um ser humano, compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos um composto de insulina lispro PEGuilada da Fórmula I e um ou mais excipientes, diluentes, tampões, iões metálicos ou veículos farmaceuticamente 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, iões metálicos ou veículos convencionais para produtos parentéricos que são conhecidos na técnica.

Devido ao facto dos compostos de insulina lispro PEGuilados da presente invenção serem muito solúveis em água, uma composição farmacêutica da presente invenção 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 farmaceuticamente aceitável em que a composição farmacêutica possui um pH entre cerca de 4,0 e cerca de 8,5. De preferência, uma composição farmacêutica da presente invenção possui um pH entre cerca de 6,0 e cerca de 8,5. Mais preferentemente, uma composição farmacêutica da invenção 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 preferentemente, uma composição farmacêutica da invenção 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 preferentemente, uma composição farmacêutica da invenção 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 preferentemente, uma composição farmacêutica da invenção 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. Ainda mais preferentemente, uma composição farmacêutica da invenção ainda compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma insulina. Ainda mais preferentemente, a insulina é um análogo de insulina. Ainda mais preferentemente, o análogo da insulina é um análogo de insulina de actuação rápida. Preferivelmente, 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 farmaceuticamente aceitáveis. A frase "tampão farmaceuticamente aceitável" refere-se a uma solução que é segura para utilização em formulações de insulina e que tem o efeito de controlar o pH da composição farmacêutica ao pH pretendido. Em realizações preferidas, o tampão tem um pH

na gama entre cerca de 6,0 e cerca de 8,5. Mais preferentemente, o tampão tem um pH na gama entre cerca de 7,0 e cerca de 8,0. Tampões farmaceuticamente aceitáveis para o controlo do pH das composições da presente invenção nesta gama incluem, mas não estão limitados a agentes tais como tampões de fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS e histidina, assim como uma combinação destes. "TRIS" refere-se a 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol e qualquer sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. A base livre e a forma de hidrocloreto (isto é, 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 da presente invenção compreende tampão fosfato ou TRIS entre cerca de 2,5 mM e cerca de 50 mM. Mais preferentemente, as composições farmacêuticas da presente invenção compreendem tampão de fosfatos ou TRIS entre cerca de 5 mM e cerca de 20 mM. Ainda mais preferentemente, uma composição farmacêutica da presente invenção compreende tampão de fosfatos entre cerca de 5 mM e cerca de 10 mM. Ainda mais preferentemente, uma composição farmacêutica da presente invenção compreende aproximadamente 5 mM de tampão de fosfatos. Ainda mais preferentemente, uma composição farmacêutica da presente invenção compreende tampão TRIS entre cerca de 7,5 mM e 50 mM. Ainda mais preferentemente uma composição farmacêutica da presente invenção compreende tampão TRIS entre cerca de 10 mM e 25 mM. Ainda mais preferentemente, uma composição farmacêutica da presente invenção compreende tampão TRIS entre cerca de 15 mM e 20

mM. Preferivelmente, uma composição farmacêutica da presente invenção compreende tampão com aproximadamente 16 mM de TRIS.

Os compostos e composições de insulina lispro PEGuilada da invenção podem ser formulados de forma análoga com formulações conhecidas de insulina que são administradas aos doentes por via parentérica. Tais formulações são conhecidas dos peritos na técnica. 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 da presente invenção pode compreender água, um composto de insulina lispro PEGuilada da Fórmula I, um agente de isotonicidade e um tampão farmaceuticamente aceitável. De preferência, uma composição farmacêutica da invenção ainda compreende um conservante farmaceuticamente aceitável. Mais preferentemente, uma composição farmacêutica da invenção ainda compreende um catião divalente como seja zinco e/ou cobalto, o que pode facilitar a hexamerização da insulina. Ainda mais preferentemente, uma composição farmacêutica da invenção ainda compreende pelo menos um agente estabilizador de hexâmeros. Além disso, pode-se adicionar ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio 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 compo-

sição farmacêutica administrada. O glicerol, também conhecido como glicerina, é frequentemente usado como agente de isotonicidade. Outros agentes de isotonicidade incluem i) outros álcoois de açúcares como sejam, mas sem limitação, o manitol e o sorbitol, ii) sais tais como, mas sem limitação, NaCl, iii) monossacáridos incluindo, mas sem limitação, dextrose, e iv) dissacáridos incluindo, mas sem limitação, lactose, sacarose e trealose. As composições farmacêuticas da presente invenção podem incluir um ou mais agentes de isotonicidade. De preferência, as formulações farmacêuticas da presente invenção 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 preferentemente, o ou os agentes de isotonicidade são glicerol, sorbitol, sacarose, NaCl, trealose e/ou manitol. Ainda mais preferentemente, o agente de isotonicidade é glicerol, sorbitol, sacarose, NaCl e/ou trealose. Ainda mais preferentemente glicerol, sorbitol, sacarose, NaCl ou trealose numa concentração entre cerca de 100 e cerca de 200 mM está presente nas composições farmacêuticas da presente invenção. Ainda mais preferentemente, nas composições farmacêuticas da presente invenção está presente glicerol entre cerca de 100 e cerca de 200 mM. Ainda mais preferentemente, nas composições farmacêuticas da presente invenção o glicerol está presente numa concentração entre cerca de 150 e cerca de 180 mM. Ainda mais preferentemente, nas composições farmacêuticas da

presente invenção o glicerol está presente numa concentração entre cerca de 130 e cerca de 175 mM. Ainda mais preferentemente, nas composições farmacêuticas da presente invenção NaCl está presente numa concentração entre cerca de 50 e cerca de 300 mM. Ainda mais preferentemente, nas composições farmacêuticas da presente invenção NaCl está presente numa concentração entre cerca de 100 e cerca de 200 mM. Preferivelmente, nas composições farmacêuticas da presente invenção NaCl está presente numa concentração de aproximadamente 150 mM.

As composições farmacêuticas da presente invenção 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 da presente invenção 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-hidroxinaftaleno, são compostos estabilizadores de hexâmeros para 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 preferentemente, o composto estabilizador de hexâmeros é fenol, m-

cresol, cálcio, cloreto ou uma combinação destes. De preferência, uma composição farmacêutica da invenção 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 preferentemente, uma composição farmacêutica da invenção compreende cálcio entre cerca de 2,5 mM e 10 mM.

Formulações multiusos das composições farmacêuticas da presente invenção 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 técnica 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 destes. Determinados conservantes fenólicos, tais como metilparabeno, fenol e m-cresol são conhecidos por se ligarem a moléculas de insulina e semelhantes à insulina e assim induzem alterações conformacionais que aumentam a estabilidade física ou química, ou ambas (Ver, por exemplo, Birnbaum, D.T., *et al.*, *Pharmaceutical Res.* 14: 25-36 (1997); Rahuel-Clermont, S., *et al.*, *Biochemistry* 36: 5837-5845 (1997)).

"Conservante fenólico" inclui os compostos fenol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, metilparabeno e suas misturas. O conservante usado nas formulações dos compostos de insulina lispro PEGuilados da presente invenção 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 preferentemente, uma composição farmacêutica da presente invenção 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. Ainda mais preferentemente, uma composição farmacêutica da presente invenção 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 preferentemente, uma composição farmacêutica da presente invenção compreende fenol e/ou m-cresol numa concentração de entre cerca de 10 e cerca de 40 mM como conservante, a um pH entre cerca de 7,0 e cerca de 8,0. Ainda mais preferentemente, uma composição farmacêutica da presente invenção 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. Preferivelmente, uma composição farmacêutica da presente invenção 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 acima, as composições farmacêuticas da presente invenção 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 o ião ou iões que 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 preferentemente, 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 da presente invenção é facilitar a formação de hexâmeros dos compostos de insulina lispro PEGuilados da presente invenção e/ou quaisquer outras insulinas ou análogos de insulina numa composição farmacêutica compreendendo um composto de insulina lispro PEGuilado da presente invenção. Na presença de um conservante fenólico, a formação dos hexâmeros pode ser facilitada levando o pH de uma solução compreendendo composições farmacêuticas da presente invenção 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 está limitado ao 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 preferentemente, 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, tal como citrato ou fosfato, estiver presente. Excesso de zinco acima da quantidade necessária para a hexamerização pode ser desejável para conduzir mais fortemente a hexamerização, por exemplo, 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 excesso de zinco acima da quantidade necessária para a hexamerização pode estar presente numa composição farmacêutica da presente invenção 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 a presente invenção, 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 preferentemente, o zinco está presente nas composições farmacêuticas da presente invenção 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 preferentemente, o zinco está presente nas composições farmacêuticas da presente invenção 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. Preferivelmente, o zinco está presente nas composições farmacêuticas da presente invenção 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 a presente invenção pode ser qualquer composto de zinco farmaceuticamente aceitável. A adição de zinco a preparações de insulina é conhecida na técnica, tal como o são fontes farmaceuticamente aceitáveis de zinco. De preferência, o zinco é proporcionado como um sal, tal como sulfato de zinco, cloreto de zinco, acetato de zinco, citrato de zinco, óxido de zinco ou nitrato de zinco.

Ainda noutra realização da invenção a composição farmacêutica da presente invenção compreende ainda um ou mais surfactantes. O termo "surfactante" como aqui usado inclui agentes que reduzem a tensão superficial de um líquido por adsorção na interface ar-líquido. Exemplos de surfactantes incluem, sem limitação, surfactantes não

iónicos, tais como polissorbatos (por exemplo, polissorbato 80 ou polissorbato 20): poloxâmeros (por exemplo, poloxâmero 188); Triton™ (por exemplo Triton™ X-100); polietil glicol; polipropil glicol; e copolímeros de etileno e propileno glicol (por exemplo, pluronics, PF68). Por exemplo, o surfactante pode estar presente numa composição farmacêutica da presente invenção numa quantidade a partir de aproximadamente de 0,001-0,5%, por exemplo, a partir de aproximadamente 0,05-0,3%. De preferência, o surfactante usado na composição farmacêutica da presente invenção é poloxâmero 188. Mais preferentemente, o surfactante 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.

A invenção proporciona igualmente um composto de insulina lispro PEGuilada da presente invenção para utilização no tratamento de hiperglicemia e/ou diabetes, de preferência, em seres humanos.

A invenção proporciona igualmente uma composição compreendendo um composto de insulina lispro PEGuilado da presente invenção para utilização 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 a presente invenção podem ser administrados parentericamente a doentes que necessitem de tal tratamento. A administração parentérica pode ser realizada por injecção subcutânea, intramuscular ou intravenosa por meio de uma seringa, opcionalmente uma seringa semelhante a uma caneta ou um injector de actuação mecânica. Alternativamente, a administração parentérica pode ser realizada por meio de uma bomba de infusão.

Preparação 1

GlyA1-HSCH$_2$CH$_2$CO-insulina lispro (3) e LysB28-HSCH$_2$CH$_2$CO-insulina lispro (4)

Mistura-se uma mmol de cada um de Trt-SCH$_2$CH$_2$CO-OH, N-hidroxisuccinimida (NHS) e di-isopropilcarbodi-imida (DIC) em 2 mL de DMF durante 30 minutos para preparar o éster de Trt-SCH$_2$CH$_2$CO-NHS. Um décimo de mmol de insulina lispro é dissolvido em 10 mL de 5% de trietilamina (TEA) em DMSO. À solução adicionou-se 0,2 mmol de Trt-SCH$_2$CH$_2$CO-NHS activado. Após 2 horas à temperatura ambiente, adiciona-se 0,2 mL de etanolamina para terminar a reacção. A mistura reaccional é então diluída com 90 mL de H$_2$O e aplicada numa coluna de RP-C18 para purificação. As fracções pretendidas de LysB28-Trt-SCH$_2$CH$_2$CO-insulina lispro (2) foram reunidas e liofilizadas. Separadamente, as fracções pretendidas de GlyA1-HSCH$_2$CH$_2$CO-insulina lispro (1) foram reunidas e

liofilizadas. Dissolve-se um décimo de mmol de (1) ou (2) 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 é tomado em 50 ml de 10% ACN em H_2O. 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-$HSCH_2CH_2CO$-insulina lispro (7)

Um décimo de mmol de insulina lispro foi dissolvido em 10 mL de 5% TEA em DMSO. À solução foi adicionado 0,2 mmol de di-terc-butilcarbonato em DMSO. Após 1 hora à temperatura ambiente, adicionou-se 0,2 ml de etanolamina para terminar a reacção. A mistura reaccional foi então diluída com 90 mL de H_2O 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 mmol de (5) foi dissolvido em 10 mL de 5% TEA em DMSO. À solução foi adicionado 0,2 mmol de Trt-SCH_2CH_2CO-NHS. Após 2 horas à temperatura ambiente, 0,2 mL de etanolamina foi adicionado para terminar a reacção. A mistura reaccional foi então diluída com 90 ml de H_2O e aplicada numa coluna de RP-C18 para purificação. As fracções pretendidas foram reunidas e liofilizadas para dar Trt-SCH_2CH_2CO-PheB1, Boc-GlyA1, Boc-

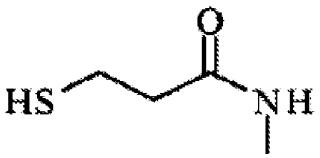
LysB28-insulina lispro (6). Um décimo de mmol de (6) foi dissolvido em 5 mL de TFA contendo 0,2 ml de tioanisole e 0,4 mL de tri-isopropilsilano. Após 30 min, TFA foi removido por evaporação e o péptido residual foi tomado em 50 mL de 10% ACN em H_2O. A solução resultante foi aplicada numa coluna RP-C18 para purificação. As fracções pretendidas foram reunidas e liofilizadas para dar (7).

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

Dissolveu-se monometoxi-PEG-MAL com um peso molecular médio de aproximadamente 20 kDa (b), 30 kDa (a), 40 kDa (a) ou 60 kDa (c) numa mistura de 1:1 de tampão NH_2Ac 100 mM (pH 4,69) e ACN. Um pó liofilizado de uma insulina lispro derivatizada com tiol, por exemplo, 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 H_2O 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 PEGuilada 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 terão *n* na gama entre cerca de 400 e cerca de 1000. Mais preferen-

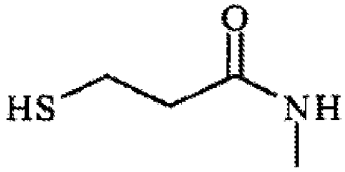
temente, estes compostos de insulina PEGuilada terão *n* na gama entre cerca de 500 e cerca de 750. Mais preferentemente, estes compostos de insulina lispro PEGuilada terão *n* na gama entre cerca de 400 e cerca de 550. Ainda mais preferentemente, estes compostos de insulina lispro PEGuilada terão *n* entre cerca de 400 e cerca de 500. Ainda mais preferentemente, estes compostos de insulina lispro PEGuilada terão *n* entre cerca de 450 e cerca de 500. Preferivelmente, estes compostos de insulina lispro PEGuilada terão *n* de aproximadamente 450.

(3)



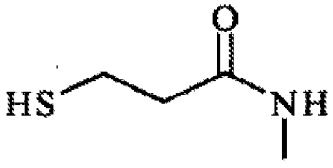
GlyA1[N(alfa)] insulina lispro

(4)



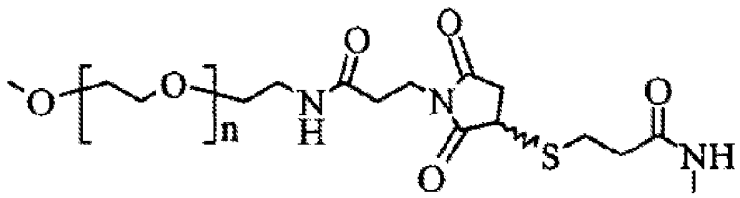
LysB28[N(epsilon)]insulina lispro

(7)



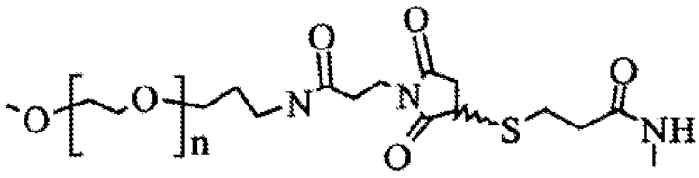
PheB1[N(alfa)] insulina lispro

(8(a))



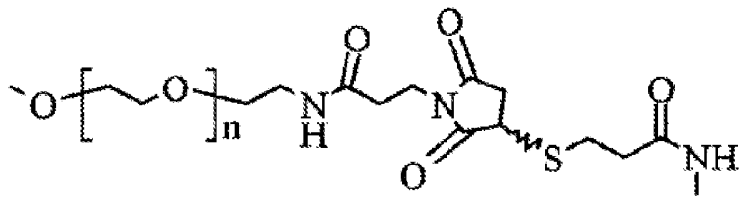
GlyA1[N(alfa)] insulina lispro

(8(b))



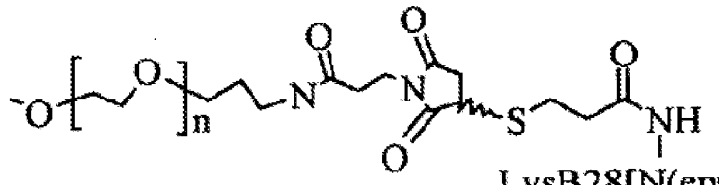
GlyA1[N(alfa)] insulina lispro

(9(a))



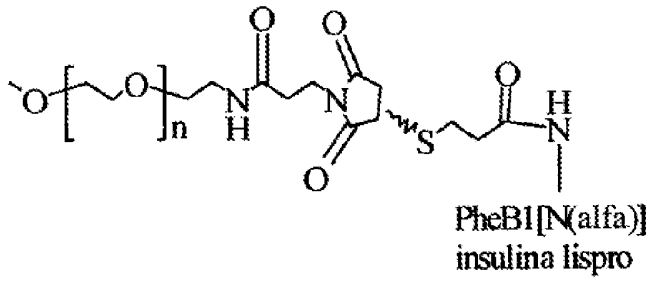
LysB28[N(epsilon)]insulina lispro

(9(b))

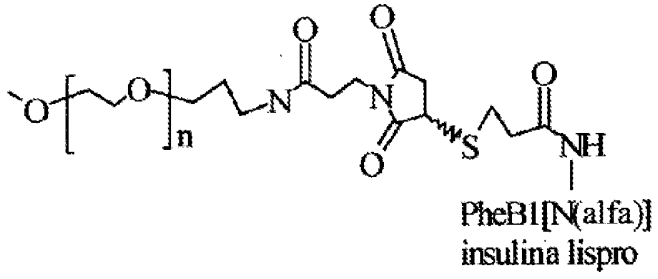


LysB28[N(epsilon)] insulina lispro

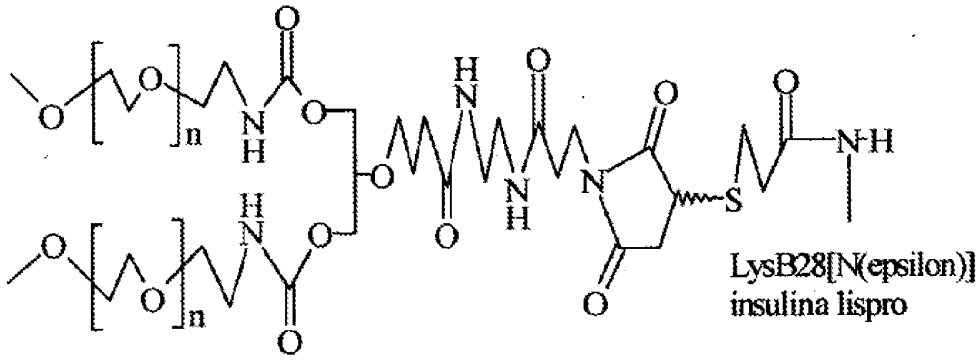
(10(a))



(10(b))



(15(c))



Exemplo 2: PEGuilação de insulina lispro utilizando p-nitro-fenil carbonato de monometoxipoli(etilenoglicol) (mPEG-NPC)

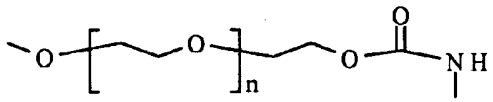
Um décimo de mmol de insulina lispro foi dissolvido em 20 mL de tampão borato a 0,2 M, pH 10,5 e 1,98 g de mPEG-NPC tendo um massa molecular média de aproximadamente 20 kDa em 20 mL de ACN foi adicionado à

solução com agitação vigorosa. A reacção foi monitorizada por RP-HPLC e SEC. Após aproximadamente 4 horas, a mistura reaccional 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 são confirmadas por RP-HPLC, SEC e MALDI-MS. A proporção de mPEG ligado na cadeia A ou na cadeia B foi determinada pelas integrações das áreas de cadeia A e cadeia B livre libertadas 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 um peso molecular médio 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 reaccional pela adição contínua de NaOH a 0,2 M. Quando conduzida numa solução aquosa não tamponada usando mPEG-NPC tendo um peso molecular médio 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

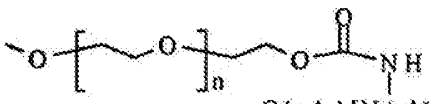
aproximadamente 92:8. De preferência, o composto (11) terá *n* na gama entre cerca de 400 e cerca de 1000. Mais preferentemente, o composto (11) terá *n* na gama entre cerca de 400 e cerca de 750. Ainda mais preferentemente, o composto (11) terá *n* na gama entre cerca de 400 e cerca de 550. Ainda mais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

(11)



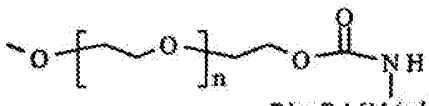
LysB28[N(epsilon)] insulina lispro

(12)



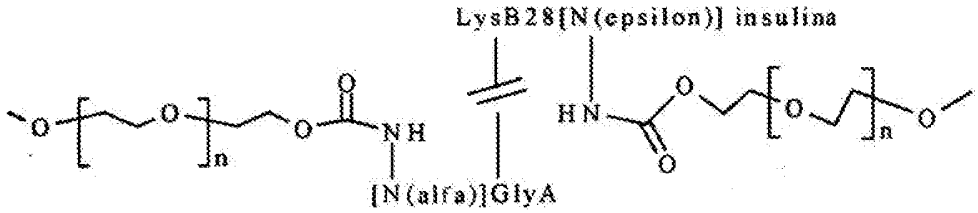
GlyA1[N(alfa)] insulina lispro

(13)



PheB1[N(alfa)] insulina lispro

(14)



Exemplo 3: Afinidade para o receptor *in vitro*

Os ensaios de ligação a receptores são realizados em membranas P1 preparadas a partir de células HEK EBNA 293 estavelmente transfectadas que sobre-expressam 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 competitiva de ligando radioactivo usando (3-[^{125}I]iodotirosil A^{14})-insulina recombinante humana (2000 Ci/mmol) ou Factor de Crescimento 1 Semelhante à Insulina [^{125}I] recombinante humano (2000 Ci/mmol). O ensaio foi realizado com um método SPA usando esferas 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. Preparam-se três séries de diluições de compostos (100 nM a 2 pM) em tampão de ensaio usando um robot Freedom/Evo (Tecan) e adicionaram-se a microplacas de 96 poços 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 experiência como controlos positivo e negativo, respectivamente. Os valores de IC_{50} foram determinados a

partir da análise de regressão logística não linear com 4 parâmetros. A constante de afinidade (Ki) é calculada a partir do valor de IC_{50} baseado na equação Ki = IC50/(1 + D/Kd) em que D é igual à concentração de ligando radioactivo usada na experiência e Kd igual à constante de afinidade de ligação em equilíbrio do ligando radioactivo determinada a partir da análise de ligação de saturação (Kd para hIR e hIGF-1R é 0,124 e 0,130 nM, respectivamente). A média geométrica Ki reportada abaixo é 10^{a}(Média Log Ki) em que Média Log Ki = Média (Ki1+ Ki2 + Ki3 ... Ki*n*) e o número de experiências independentes (*n*) é superior a dois. No entanto, quando notado 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 uma média geométrica de Ki inferior a 30 nM no ensaio de ligação de hIR descrito acima: o composto 10(a) preparado usando mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 40 kDa, o composto 8(a) preparado usando mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 40 kDa, o composto 15(c) preparado usando mPEG-MAL bifurcado tendo um peso molecular médio de aproximadamente 60 kDa, o composto 9(a) preparado usando mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 30 kDa, o composto 9(a) preparado usando mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 40 kDa e o composto 9(b) preparado usando mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 20 kDa. Nos ensaios de ligação de

hIR e de hIGFR, o composto 9(a) preparado usando mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 40 kDa tem uma média geométrica de Ki de 3,07 nM ± 0,32 nM (±E.P.M.; n=6) e superior a 84,3 nM (EPM = não determinado; n=6), respectivamente. Adicionalmente, os produtos heterogéneos de insulina lispro PEGuilada, gerados como descrito no Exemplo 2 usando um mPEG-NPC linear de 40, 30 ou 20 kDa também possuem uma média geométrica de Ki inferior a 30 nM no ensaio de ligação de hIR descrito acima. No ensaio de ligação de hIR descrito acima, insulina lispro possui uma média geométrica de Ki de 0,22±0,072 nM (±EPM; n=4). No ensaio de ligação de hIGFR descrito acima, todos os compostos atrás referidos possuem uma média geométrica de Ki superior a 75 nM e IGF-1 humano possui uma média geométrica de Ki de 1,51±0,23 nM (±EPM; 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 PEGuilada também não possuem propriedades de ligação a IGFR-1 mensuráveis neste ensaio nestas condições.

Exemplo 4: Avaliação da Potência de Insulina Lispro PEGuilada usando um Ensaio de Células Inteiras de Fosforilação do Receptor da Insulina

Os compostos de insulina lispro PEGuilada da presente invenção podem ser avaliados relativamente à

actividade funcional usando DELFIA®, um método de ensaio comercial fluorimétrico de resolução temporal heterogénea (Perkin-Elmer). Resumidamente, células HEK293 sobre-expressando o receptor da insulina humana foram tripsinizadas e plaqueadas a 60000 células/poço em placas de cultura de tecidos de 96 poços Costar de metade da área, revestidas com poli-D-lisina, em meio sem soro (SFM), (DMEM com 0,1% BSA isenta de ácidos gordos). As placas de culturas celulares foram incubadas durante a noite a 37°C numa incubadora de CO_2. As placas de captura com o mAb 8314 anti-cadeia A do receptor da insulina foram também preparadas na noite anterior usando microplacas Costar de 96 poços 1/2 área, pretas, 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 a partir da Abeam, Inc., Cambridge, MA), diluído a 1 µg/mL em carbonato de sódio a 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 do incubador e equilibradas até à temperatura ambiente. Os compostos a testar foram diluídos em série em SFM. Para estimular a auto-fosforilação do receptor de insulina, adicionou-se 50 µl do agente a testar diluído à monocamada celular. Após 30

minutos à temperatura ambiente, a reacção foi parada removendo por aspiração os compostos 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 PY20 anti-fosfotirosina-N1-Európio, 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 seguindo-se 6 lavagens com TBST para remover Eu-N1-PY20 não ligado e lisado celular. Após a incubação com 50 µl de Solução Intensificadora (Perkin Elmer) durante 10 minutos com agitação intermitente à medida que se revelou o sinal. O receptor da insulina fosforilado é quantificado usando um Wallac Victor utilizando parâmetros para fluorescência de Európio resolvida no tempo. O nível de fosforilação 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 ajuste de quatro parâmetros da resposta à dose. 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 com um peso molecular médio de aproximadamente 40 kDa, 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 40 kDa, 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 30 kDa e 9(b) preparado

usando mPEG-MAL tendo um peso molecular médio de aproximadamente 20 kDa. No ensaio descrito no Exemplo 4, o composto 9(a) preparado usando mPEG-MAL linear possui um EC50 de 10,88 nM. Os produtos heterogéneos de insulina lispro PEGuilada gerados como descrito no Exemplo 2 usando um mPEG-NPC linear com um peso molecular médio de aproximadamente 40, cerca de 30 ou cerca de 20 kDa também possuem um EC50 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 com um peso molecular de aproximadamente 40 kDa e o composto 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 40 kDa também possuem um EC50 inferior a 15 nM no ensaio descrito no Exemplo 4. No mesmo ensaio, a insulina humana e a insulina lispro possuem um EC50 de 2,3 e 0,7 nM, respectivamente.

Os dados mostram que a posição de PEGuilação 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 macho Sprague-Dawley Harlan com dez semanas de idade (Harlan, Indianapolis) 250-280g de peso corporal,

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 corporal 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 injecção subcutânea do composto a testar a uma de várias doses predeterminadas. Periodicamente, recolheram-se amostras de sangue em duplicado da veia da cauda para tubos contendo EDTA dissódico. Os níveis de glucose no sangue foram medidos com um glucómetro. Igualmente, o plasma foi colhido da amostra de sangue da veia e um radioimunoensaio para insulina de rato disponível comercialmente 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 ED_{50}. Neste ensaio, o composto 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 40 kDa, o composto 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 30 kDa e o composto 9(b) preparado usando um mPEG-MAL linear com um peso molecular médio 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, aqueles compostos 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 injecção 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 com um peso molecular médio 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 meia-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 com um peso

molecular médio 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 com um peso molecular médio 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 similar a ratos machos tratados com STZ a 568 nmol/kg, foi medido um $t_{1/2}$ de aproximadamente 1 h um CL/F de aproximadamente 1,2 L/h/kg.

Quando a insulina detemir foi administrada de forma semelhante 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 a complexidades nas farmacocinética, as razões 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 conjugados com

PEG 20-40 kDa possuem uma eliminação aparente entre cerca de 5 a 30 vezes mais lenta do que detemir no rato diabético induzido com STZ.

Exemplo 6: Avaliação da Duração *in vivo* da Acção e Características Farmacocinéticas da Insulina lispro PEGuilada num Modelo de Rato de Diabetes do 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 injecção subcutânea de controlo veículo (PBS) ou 517 nmol/kg de 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 40 kDa. Amostras em série foram colhidas para caracterização farmacocinética e farmacodinâmica. Uma única administração subcutânea de 517 nmol/kg de 9(a) preparada usando um mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 40 kDa a ratos machos fa/fa ZDF está associada a um abaixamento da glucose estatisticamente significativo que é sustentado durante pelo menos sete dias (relativamente ao placebo; $p<0,05$). A exposição ao composto 9(a) preparado usando um mPEG-MAL linear com um peso molecular médio de aproximadamente 40 kDa é também verificável ao longo de sete dias.

Exemplo 7: Titulação com conservante fenólico de insulina lispro-PEG-B28$_{(92,4\%)}$A1$_{(7,6\%)}$, insulina lispro, ou uma mistura destas (70% insulina lispro-PEG$_{20kDa}$~B28$_{(92,4\%)}$A1$_{(7,6\%)}$: 30% insulina lispro) com fenol na presença de iões cobalto.

Dissolve-se insulina lispro-PEG_{20kDa}~$B28_{(92,4\%)}A1_{(7/6\%)}$ ou insulina lispro numa solução contendo 20 mM de KSCN e 50 mM de TRIS-ClO_4 a pH 8,0. A concentração alvo para ambas as proteínas é de ~4mg/mL, baseado no teor proteico (ε_{283} = 1,05 $(mg/mL)^{-1}cm^{-1}$). Dissolveu-se cloreto de cobalto (41,9 mg) com 1 ml de água para dar uma solução mãe com uma concentração do ião cobalto de 0,176 M. Uma alíquota da solução mãe de cobalto (~2 µL dependendo da concentração proteica) foi adicionada a 0,8 mL de solução de proteína de modo 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 recolhe-se o espectro visível da solução 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}, isto é, a concentração de proteína hexamérica multiplicada por dois baseado no conhecimento de que as porções His^{B10} dos hexâmeros de insulina coordenam dois iões metálicos divalentes. Para a preparação de formulações com misturas 70/30

(mole:mole) de insulina lispro-PEG_{20kDa}~$B28_{(92,4\%)}A1_{(7,6\%)}$ e insulina lispro, a proteína é primeiro misturada e depois o cobalto é adicionado seguindo-se a titulação com conservante fenólico.

Na insulina lispro, a sequência natural da prolina na posição B28 e da lisina na posição B29 está invertida comparativamente à insulina humana nativa. Esta inversão conduz a um desvio conformacional na extremidade C-terminal da cadeia B que bloqueia estericamente 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 nativa. Os resultados, mostrados na Tabela I, indicam que a insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(92,4\%)}A1_{(7,6\%)}$ 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 relativamente à insulina humana selvagem. Ainda, as misturas 70/30 de insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(92,4\%)}A1_{(7,6\%)}$ e de insulina lispro também demonstram a capacidade de formar complexos hexaméricos, os quais suportam a preparação de formulações pré-misturadas extemporâneas e/ou estáveis de uma insulina basal e de uma insulina de actuação rápida.

Tabela I:

Fenol (mM)	**ε_{574nm} insulina lispro**	**ε_{574nm} insulina lispro-PEG_{20kDa}-B28$_{(92,4\%)}$A1$_{(7,6\%)}$**	**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 insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(92,4\%)}$/$A1_{(7,6\%)}$ Formulada com Zn, Fenol e/ou Cálcio

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

Para avaliar a capacidade de insulina lispro-PEG20kDa-LysB28 para formar hexâmeros, dialisa-se em água durante a noite a pH 6,7 insulina lispro-PEG_{20kDa}~$B28_{(92,4\%)}$/$A1_{(7,6\%)}$, com uma concentração de proteína de partida baseada em A_{276nm} = 8,6 mg insulina lispro/mL ou 38,2 mg conjugado de insulina lispro PEGuilada/mL. A proteína dialisada foi então diluída com água para ajustar a concentração de proteína a 4,6 mg/mL ou 20,6 mg de conjugado de proteína PEGuilada/mL. Uma solução mãe 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 1 N, depois diluindo com água para uma concentração final de zinco de 0,097 M. As amostras em solução para análise de dicroísmo circular (CD) de UV próximo foram preparadas com concentrações variáveis de zinco (0 a 400 µM) através da mistura de 450 µL de

insulina- PEG_{20kDa}~$B28_{(92,4\%)}$/$A1_{(7,6\%)}$, a uma concentração de proteína de 4,6 mg/mL com alíquotas de solução mãe de zinco (o volume total máximo de solução mãe de zinco adicionado = 2,5 µl ou equivalente a 4 iões zinco por hexâmero de insulina-PEG_{20kDa}~$B28_{(92,4\%)}$/$A1_{(7,6\%)}$) e 150 µL da solução mãe de tampão fosfato 4x. O pH final foi ajustado, se necessário, a pH ~7,0. A associação hexamérica da insulina lispro-PEG_{20kDa}~$B28_{(92,4\%)}$/$A1_{(7,6\%)}$ ou da insulina lispro foi monitorizada por dicroísmo circular no UV próximo 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, indicam ainda que a insulina-PEG_{20kDa}~$B28_{(92,4\%)}$/$A1_{(7,6\%)}$ 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 porções PEG de 20 kDa conjugadas perto do já enfraquecido, relativamente à insulina humana nativa, domínio de dimerização da insulina lispro.

O impacto da hexamerização e ligação do ligando na estabilidade térmica da insulina- PEG_{20kDa}~$B28_{(92,4\%)}$/$A1_{(7,6\%)}$ nas formulações a testar que promovem os hexâmeros foi igualmente investigada com experiências de desnaturação térmica por CD. O comprimento de onda usado para os estudos de desnaturação térmica foi de 240 nm, devido a

ter-se verificado que a alteração global do sinal era superior a 240 nm do que os 250 nm usados nos estudos de ligação de Zn^{2+}, ainda que a absorvância total da solução fosse suficientemente baixa para se obterem 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 em bruto (mdeg a 240 nm) e a fracção de desnaturação aparente (Funf), a qual é dada por: $F_{unf}(T)=[Y_{obs}(T) - Y_{nat}(T)]/[Y_{unf}(T) - Y_{nat}(T)]$ 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 de início do desenrolamento 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 por CD realizadas essencialmente como descrito acima indicaram que a estabilidade térmica dos hexâmeros de insulina-PEG_{20kDa}~$B28_{(92,4\%)}/A1_{(7,6\%)}$ 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. Além disso, os estudos de desnaturação térmica de CD detectaram um aumento significativo da temperatura de fusão, dependente da

concentração de iões cálcio e cloreto, para a insulina lispro-PEG_{20kDa}~$B28_{(92,4\%)}$/$A1_{(7,6\%)}$ (dados não apresentados). Mais especificamente, a temperatura de início do desenrolamento foi observada ser ~30°C em TRIS 16 mM, pH 7,2, 3,1 mg/mL de m-cresol e zinco, mas aumenta drasticamente para ~50°C na mesma formulação com cloreto de cálcio a 75 mM. Um efeito semelhante foi observado aquando da adição de NaCl (25 mM para 150 mM de NaCl) em vez de cloreto de cálcio à formulação. Assim, o cálcio e/ou cloreto podem ser excipientes muito úteis na promoção de hexâmeros em composições farmacêuticas compreendendo os compostos de insulina lispro-PEG_{20kDa}~$B28_{(92,4\%)}$/$A1_{(7,6\%)}$ de forma a aumentar a estabilidade química e/ou física da composição farmacêutica aquando do armazenamento.

Tabela II: Alterações na elipticidade média dos resíduos (MRE) em função da razão de Zn/hexâmero

Zn por hexâmero (mol/mol)	MRE Insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(96\%)}$/$A1_{(4\%)}$ (graus $cm^2dmol^{-1}resíduo^{-1}$)	MRE Insulina lispro (graus $cm^2dmol^{-1}resíduo^{-1}$)
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 insulina lispro-PEG$_{20kDa}$-B28$_{(\sim 95\%)}$/A1$_{(\sim 5\%)}$

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.

Dissolve-se p-nitrofenil carbonato de monometoxipoli(etilenoglicol) (mPEG-NPC) com PEG de um peso molecular médio de aproximadamente 20 kDa ± cerca de 2 kDa 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 vórtex e lentamente vertendo o pó de mPEG-NPC no centro do vórtex para assegurar dispersão adequada e rápida. O pó de mPEG-NPC é um pó fino e aquando da dispersão são libertadas consideráveis bolhas de ar para o vaso. Deixa-se a solução de mPEG-NPC no vaso perder ar entre 30 e 60 minutos, dependendo do volume.

A solução de insulina lispro preparada acima foi transferida para um vaso com agitação mecânica e com camisa. O vaso possui instrumentação para medição da

temperatura e pH. A agitação é proporcionada por um agitador convencional que opera num número de Reynolds no regime turbulento. A solução de mPEG-NPC (PEG) é adicionada ao vaso a uma velocidade tal que origina um total de tempo de adição de PEG entre 3 e 5 horas. A temperatura da camisa é mantida entre 4°C e 6°C e a mistura é continuada. 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 camisa foi aumentada, no espaço de 60 minutos, para entre 25°C a 30°C e a mistura reaccional 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, reacção na mistura 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 reaccional foi purificada usando uma coluna de cromatografia de permuta catiónica (CEX) com a resina adequada (por exemplo, resina Fast Flow SP Sepharose). A coluna foi empacotada com resina até uma 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 reaccional diluída (5-8 m de Produto/L de resina) a pH baixo (cerca de 2,5 a cerca de 4,0) num caudal 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 nM), foi usado para remover quaisquer subprodutos multi-PEGuilados com adsorção 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 recolhido (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 efluente 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 convencional (massa molecular de exclusão 3-5 kDa). O processo foi realizado através de uma concentração inicial seguida de troca de tampões e concentração final até 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 fêmea 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 recolhidas para tubos contendo EDTA dissódico. O plasma foi recolhido das amostras de sangue venoso e usou-se o radioimunoensaio para insulina disponível comercialmente para determinar os níveis do fármaco administrado no plasma. Os perfis e parâmetros farmacocinéticos foram determinados para cada um dos compostos exemplificativos que se seguem preparados essencialmente como descrito no Exemplo 2: o composto 11 preparado usando um mPEG-NPC linear com um peso molecular médio 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 com um peso molecular médio 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 meia-vida ($t_{1/2}$) de eliminação de aproximadamente 14 horas.

O composto 11, preparado usando um mPEG-NPC linear com um peso molecular médio 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 um $t_{1/2}$ de aproximadamente 23 horas.

O composto 11, preparado usando um mPEG-NPC linear com um peso molecular médio 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 um $t_{1/2}$ de aproximadamente 20 horas.

A insulina detemir foi administrada de forma semelhante a cães Beagle fêmea 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 especifica para insulina utilizada para estes estudos detecta tanto a insulina lispro PEGuilada como 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	0,027±0,004	0,026±0,003	0,12±0,02

18,9 nmol/kg de dose subcutânea; n = 3/grupo

Exemplo 11: Projecção da média de constância 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 ~4-9 para detemir e ~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 ka, CL/F e V/F. Cada um dos parâmetros PK (P) é ajustado a uma equação alométrica da forma $P = aBW^b$, em que *b* é fixado a -0,25, 0,75 e 1 para ka, 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 drasticamente 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 clinica. 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
insulina lispro-PEG 20 kDa	1,34±0,68
insulina lispro-PEG 30 kDa	0,68±0,35
insulina lispro-PEG 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)
insulina lispro-PEG 20 kDa	5,5	2,6	3,3
insulina lispro-PEG 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 clinica 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 clinica média máxima é de ~3 vezes mais baixa do que a de insulina detemir. No melhor dos casos, a estimativa da dose clinica 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 Glargina e insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(\geq 95\%)}A1_{(\leq \sim 5\%)}$

Um estudo em três partes da primeiro dose em humanos foi conduzido usando uma única dose de insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(\geq 95\%)}A1_{(\leq \sim 5\%)}$ (LY) preparada essencialmente como descrito no Exemplo 9. A parte A incluiu três períodos de estudo, nos quais os indivíduos recebem uma injecção subcutânea (SC) da dose de LY no primeiro período, seguido de uma injecção de dose de insulina glargina (0,5 U/kg) no segundo período e depois seguido de uma injecção de uma outra dose de LY no terceiro período. A parte B foi um estudo aberto de dose única e duas réplicas 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 aberto, com dois períodos, de dose única, sequência fixa, controlado por comparador em que indivíduos receberam uma única dose SC de 0,5 mg/kg de LY num período e uma única dose de 0,8 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 administrada 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 corporal

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 3° período. Em todos os períodos de tratamento, os indivíduos foram submetidos a um procedimento de "clamp" euglicémico até 24/36 horas após cada injecção do composto de insulina. As velocidades de infusão de glucose (GIR) foram ajustadas para manter euglicémia, com a GIR documentado ao longo do tempo proporcionando a medição de GD da acção da insulina. O objectivo do "clamp" euglicémico de glucose é manter euglicémia 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 (isto é, 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 na 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 arterializado. 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 injecção 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 euglicémia 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 GIR 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 documentada.

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 meia-vida aparente variando entre 24-44 hrs e características basais, isto é, uma relação pico-vale inferior a 2 (Figura 2). Adicionalmente, 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 do que de glargina. Finalmente, os dados glucodinâmicos da Parte C do estudo (0,5 mg/kg) resultaram

num perfil GIR para LY "sem picos", manteve GD durante mais de 36 horas e excedeu a resposta GIR de picos para a glargina (0,5 U/kg; dados não apresentados).

Exemplo 13: Estabilidade química e física de composições farmacêuticas de insulina lispro-PEG$_{20kDa}$-B28$_{(\sim 95\%)}$A1$_{(\sim 5\%)}$

Como descrito nos Exemplos 7 e 8 atrás, a insulina lispro-PEG$_{20kDa}$-B28$_{(\sim 95\%)}$A1$_{(\sim 5\%)}$ pode associar-se como um complexo hexamérico na presença de iões metálicos divalentes e de um conservante fenólico nas condições de formulação análogas às de Humalog®. Assim, foram realizados estudos de estabilidade química e física nas formulações de insulina lispro-PEG$_{20kDa}$-B28$_{(\sim 95\%)}$A1$_{(\sim 5\%)}$ semelhantes às formulações de solução comercial de insulina lispro (isto é, formulações de solução de Humalog®). A estabilidade química de uma formulação farmacêutica a testar foi considerada aceitável se não for 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, aquando da avaliação visual, não forem observadas partículas e aquando da avaliação por microscopia de fluorescência de Tioflavina T não for observada a formação de fibrilhas ou de gel.

As formulações de insulina lispro- insulina lispro-PEG$_{20kDa}$-B28 contendo 0,5 mole de zinco por mole de

insulina lispro-PEG_{20kDa}-B28, 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 preparadas 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 tamponadas 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 tamponadas com fosfato quando avaliadas visualmente. 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 insulina lispro-PEG_{20kDa}-B28 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 aquando da exposição a temperatura elevada.

Quando as formulações protótipo de insulina

lispro não conferiram estabilidade aceitável aos compostos de insulina lispro-PEG_{20kDa}-B28 a temperaturas elevadas, foram desenvolvidas composições farmacêuticas compreendendo compostos insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(\sim 95\%)}$/$A1_{(\sim 5\%)}$ com estabilidade física e química melhorada e adequada para comercialização como uma formulação farmacêutica para administração parentérica.

As formulações que se seguem de insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(\sim 95\%)}$/$A1_{(\sim 5\%)}$ (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 a 10 mM, 20 mg/mL de açúcar (sucrose ou trealose), 3 mg/mL (28 mM) de m-cresol e 0,5 mole de zinco por 1,0 mole de insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(\sim 95\%)}$/$A1_{(\sim 5\%)}$

2) Tampão TRIS 16 mM, pH 7,0-8,0, cloreto de cálcio a 10 mM, 3 mg/mL de poloxâmero, 3 mg/mL (28 mM) de tri-cresol e 0,5 mole de zinco por 1,0 mole de insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(\sim 95\%)}$/$A1_{(\sim 5\%)}$

3) Tampão fosfato 5 mM, pH 7,0, glicerina a 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 insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(\sim 95\%)}$/$A1_{(\sim 5\%)}$.

As formulações de insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(\sim 95\%)}$/$A1_{(\sim 5\%)}$ contendo excipientes promotores de hexâmeros, por exemplo, 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 insulina lispro-PEG_{20kDa}-$B28_{(\sim 95\%)}/A1_{(\sim 5\%)}$ contendo zinco e m-cresol aumentaram mais a estabilidade física de formulações expostas a temperaturas de 40°C ou superiores. Além disso, as formulações tamponadas com fosfato e citrato, de um modo geral, apresentaram menor estabilidade física que as formulações tamponadas com TRIS.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Eli Lily and Company

<120> COMPOSTOS DE INSULINA LISPRO PEGUILADA

<130> X-18199.nationalphaseseqlist.20-Oct-2010

<140> PCT/UC2009/046704
<141> 2009-06-09

<150> 61/061,281
<151> 2008-06-13

<150> 61/121,394
<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, qualquer aminoácido ácido, ou qualquer aminoácido geneticamente codificável

<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, qualquer aminoácido básico, ou qualquer aminoácido codificável geneticamente

<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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (33)..(33)
<223> Xaa na posição 33 está ausente

<400> 5
Xaa Phe Val Asn 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

<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 codificável geneticamente

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> Xaa na posição 29 é Pro, Asp, Lys, Leu, Vai, 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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (33)..(33)
<223> Xaa na posição 33 está ausente

<400> 6

Xaa Phe Val Asn 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, 16 de julho de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição farmacêutica compreendendo um composto de insulina lispro PEGuilada da fórmula:
P-[(A)-(B)] ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em que:
P é um PEG com um peso molecular de cerca de 17,5 kDa a cerca de 40 kDa
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
em que A e B estão adequadamente reticuladas e P está ligado através de uma ligação covalente uretano ao grupo épsilon-amino da lisina na posição 28 de B;
um ou mais excipientes, diluentes ou veículos farmaceuticamente aceitáveis; e uma quantidade terapeuticamente eficaz de insulina lispro.

2. Uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda um conservante fenólico farmaceuticamente aceitável e uma quantidade de zinco suficiente para causar a hexamerização de compostos de insulina lispro PEGuilados.

3. Uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2 para utilização em terapia.

4. Uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2 para utilização no tratamento de hiperglicemia ou diabetes mellitus ou diabetes gestacional.

Lisboa, 16 de julho de 2014

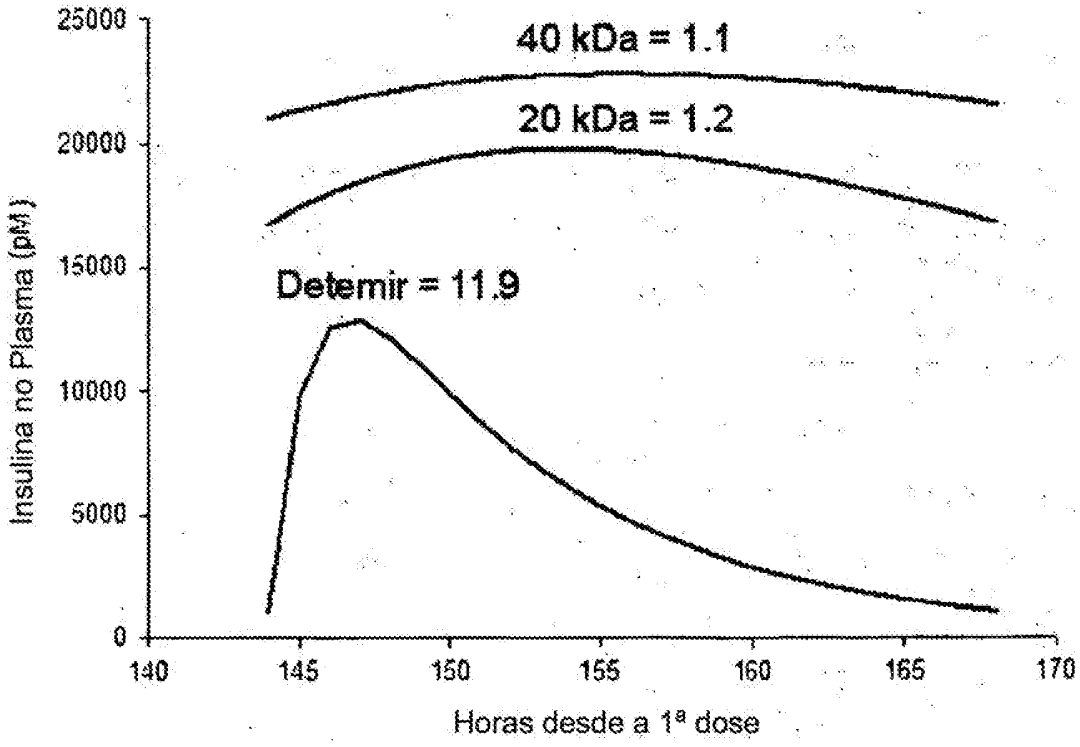

25000
20000
15000
10000
5000
0
Insulina no Plasma (pM)
40 kDa = 1.1
20 kDa = 1.2
Determir = 11.9
140
145
150
155
160
165
170
Horas desde a 1ª dose

Figura 1

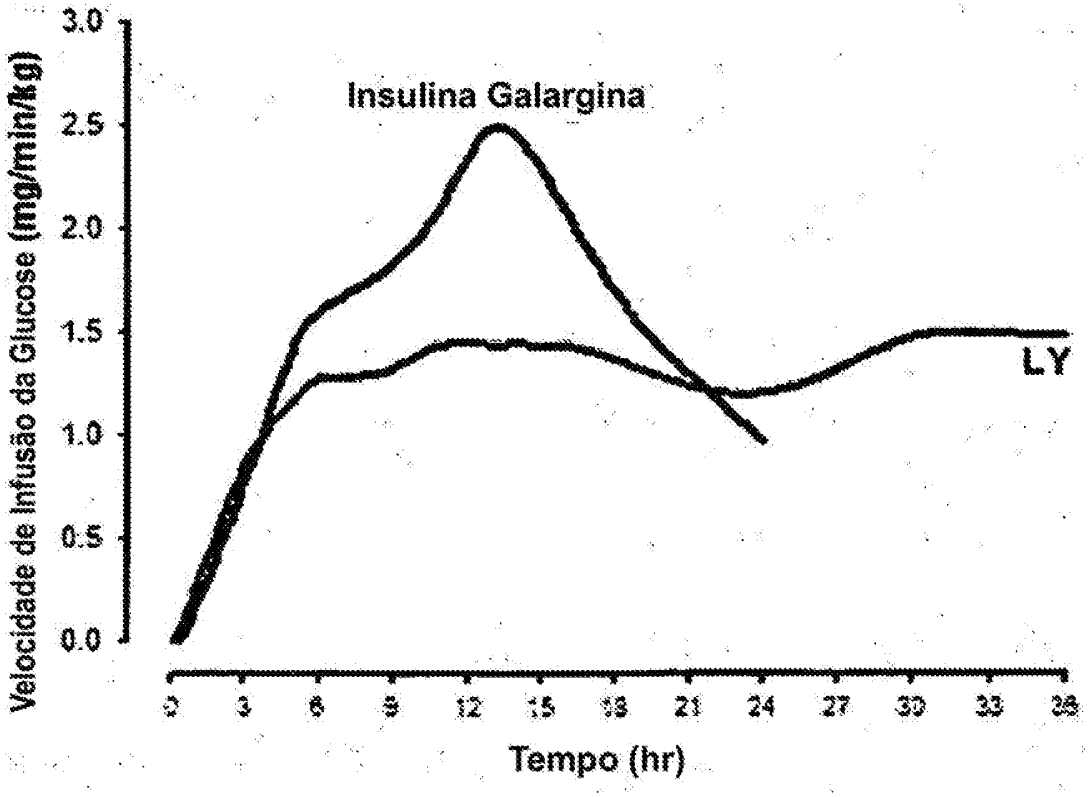

Insulina Galargina
LY
Velocidade de Infusão da Glucose (mg/min/kg)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
33
36
Tempo (hr)

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 2006079641 A
- WO 2004091494 A
- WO 2008015099 A
- WO 2008084051 A
- WO 9615804 A
- WO 03053339 A
- US 3528960 A
- US 5514646 A
- US 5618913 A
- US 5750497 A
- US 6011007 A
- US 6251856 B
- EP 254516 A
- EP 280534 A
- US 5700662 A
- EP 214826 A
- WO 0162827 A
- WO 2006028745 A
- WO 2006096535 A
- WO 2006036825 A
- US 2009046704 W
- US 61061281 B
- US 61121394 B

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, 459-476
- **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*, 1997, vol. 36, 5837-5845
- **SOOS, M.A. et al.** *Biochem J.*, 1986, vol. 235, 199-208