



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0409322-4 B1

(22) Data do Depósito: 08/04/2004

(45) Data de Concessão: 07/02/2017



(54) Título: MÉTODO PARA PREPARAR UM CONJUGADO DE INSULINA-POLÍMERO

(51) Int.Cl.: A61K 38/28; A61K 47/48; A61K 9/50; C07K 14/62; A61P 3/10

(30) Prioridade Unionista: 11/04/2003 US 60/462,364

(73) Titular(es): ANTRIABIO, INC.

(72) Inventor(es): KENNETH HINDS; DANNY LEWIS; PAUL SCHMIDT; KATHLEEN M. CAMPBELL

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MÉTODO PARA PREPARAR UM CONJUGADO DE INSULINA-
POLÍMERO"**.

Pedidos Relacionados

[001] Este pedido reivindica prioridade para o Pedido de Patente Provisória U.S. Nº de Série 60/462,364, depositado em 11 de abril de 2003, cujo teor integral está incorporado ao presente por referência.

Campo da Invenção

[002] A presente invenção refere-se a conjugados de proteína quimicamente modificados, que possuem propriedades superiores às, de proteína não-conjugada. Especificamente, a presente invenção refere-se a um método grandemente simplificado, de baixo custo e graduável em processo para a modificação de proteínas com polímeros hidrofílicos. Mais especificamente, a presente invenção refere-se à modificação específica de local de proteínas selecionadas, tal como insulina, com poli(etilenoglicol). A presente invenção também refere-se a formulações de distribuição de drogas baseadas em polímeros biodegradáveis, que compreendem proteínas com modificações específicas de local com proteínas hidrofílicas.

Descrição da Técnica Relacionada

[003] Uma pluralidade de métodos para produzir derivados de insulina PEGuiladas é conhecida. Davis et al. (Patente U.S. 4.179.337) descreveu a síntese de um constructo de PEG-insulina usando tricloro-s-triazina (cloreto cianúrico) como ligante entre PEG e proteína. Eles seguiram um esquema sintético, no qual um grande excesso (50X) de PEG (200 Da) ativado com cloreto cianúrico foi reagido com insulina em tampão de borato (pH 9,2) por 2 horas. Os inventores foram capazes de produzir conjugados parcialmente ativos (~50%) de PEG-insulina, que eram não imunogênicos e não antigênicos. Obermeier et al. (Patente Canadense Nº 1.156.217) constataram que a preparação

de conjugados de PEG-insulina de acordo com o Exemplo X da patente de Davis, acima referida, produziu uma mistura não uniforme de conjugados que continham, aproximadamente, 50% de tri-PEG-insulina, e as outras combinações possíveis de derivados de PEG-insulina (mono- e di-PEG-insulinas) não eram substituídas no resíduo PheB1.

[004] Obermeier et al. (Patente Canadense N° 1,156,217) descrevem uma síntese de conjugados de PEG-insulina especificamente modificados no resíduo PheB1. A base da invenção envolve a proteção das aminas reativas nos resíduos GlyA1 e LysB29 com grupos terc-butiloxicarbonila(t-boc) ou metilsulfoniletiloxicarbonila (Msc) em solventes orgânicos (por exemplo, DMF, DMSO, piridina etc.) sob condições alcalinas. Da mistura de complexo de insulinas (mono-, di- e tri-) protegidas, a espécie de insulinas $N^{\alpha A1}$, N^{EB29} -bis protegida foi isolada por técnicas cromatográficas convencionais. Após a isolamento, a insulina $N^{\alpha A1}$, N^{EB29} -bis protegida foi reagida com um derivado de PEG ativado (por exemplo, cloreto de ácido ou isocianato), com subsequente remoção dos grupos protetores usando técnicas comuns na química de peptídeos. Os inventores observaram que os grupos amina de GlyA1 e LysB29 eram mais reativos do que o grupo amina de PheB1, sob condições de reação alcalinas. Eles determinaram que seus conjugados de mPEG(1500)-B1-insulina específicos de local tinham um efeito de insulina de 100% (calculado em uma base molar) sobre a readução dos níveis de açúcar no sangue em coelhos.

[005] Geiger et al. (em D. Branderburg e A. Wollmer (eds.), Insulin: Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormones, Walter de Gruyter & Co., New York, pp. 406-415, 1980) e Ehrat et al. (Biopolymers, 22, 569-573, 1983) descreve produtos de adição de PEG-insulina especificamente modificados no resíduo

PheB1, preparados utilizando um esquema de proteção/conjugação/desproteção semelhante ao método de etapas múltiplas descrito por Obermeier et al. Geiger et al. e Ehrat et al. observaram que o conjugado de PEG(1500)-B1-insulina era muito menos antigênico e muito mais estável (a enzimas hepáticas) do que insulina nativa. Outras preparações de PEG-insulina (Caliceti et al., STP Pharma Sci, 9, 107-113, 1999; Uchio et al., Advanced Drug Delivery Reviews, 35, 289-306, 1999; Hinds et al., Bioconj. Chem. 11, 195-201, 2000; Hinds et al., Advanced Drug Delivery Reviews, 54:505-530, 2002) estão: 1) ou centralizadas nos esquemas básicos de três etapas de proteção/conjugação/desproteção descritos acima, 2) ou resultam na modificação não-específica da molécula de insulina, ou 3) não produzem os conjugados mais eficazes, a saber, PEG-B1-insulinas.

[006] Liu et al. (Patente US N° 6.323.311 B1) descrevem um método útil para a síntese de conjugados de PEG-B1-insulina. Esse método é uma ampliação do esquema de três etapas de proteção/conjugação/desproteção de Obermeier, mas não requer a isolamento de intermediários de reação entre as etapas (isto é, síntese em um recipiente). Desse modo, a insulina é protegida nos resíduos Gly/a1 e LysB29, imediatamente reagida com PEG, subseqüentemente desprotegida, antes de qualquer isolamento de espécies. Os inventores reivindicam que sua reação de um recipiente pode dar até 50% do isômero posicional correto (isto é, PEG-B1-insulina) e 30% de insulina não-reagida, que pode ser reciclada para derivatização subseqüente. Supondo que a preparação dessas construções seja realizada rapidamente, levaria pelo menos cinco dias para ser completada. Além disso, a invenção exige grandes excessos de reagente de PEG para obter resultados aceitáveis. Embora os produtos dessa invenção possam ser eficazes, sua preparação ainda

requer que a proteína passe por três etapas de reação em ambientes adversos para proteína (pH alto e baixo) por períodos de tempo prolongados.

[007] A presente invenção está voltada para as deficiências dos métodos da técnica anterior para PEGuilar insulinas, pondo à disposição um método para a preparação simples de derivados de insulina de alta pureza, especificamente PEGuiladas no terminal N da cadeia B de insulina (PheB1) em uma etapa. Em contraste com a experiência anterior (por exemplo, Caliceti et al., 1999, supra) indicando que a PEGuilação em PhB1 é o produto de reação menos provável, o presente método usa condições específicas de controle de PH, uso de um quelador de íons metálicos e adição de solvente orgânico, para aumentar a reatividade relativa do terminal amina de PheB1 para onde ele se torna o local predominante de PEGuilação. Considerando as numerosas propriedades vantajosas conferidas à insulina (por exemplo, imunogenicidade/antigenicidade diminuída, estabilidade proteolítica, química e física aumentada; meia-vida de circulação aumentada; solubilidade aquosa/orgânica aumentada; plena atividade biológica) por meio da PEGuilação específica de local no resíduo PheB1, um processo simples, de custo econômico e facilmente graduável para obter esse resultado seria um avanço significativo na técnica.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008] A presente invenção está baseada na descoberta de um método de etapa única para preparar conjugados de proteína-polímeros. A invenção também se refere a formulações de distribuição de drogas baseadas em polímeros, biodegradáveis, que compreendem proteínas com modificações específicas de local com proteínas hidrofílicas. Em uma modalidade específica, a presente invenção põe à disposição um método de etapa única para a síntese

de derivados de insulina PEGuilados, no qual o local de substituição é, predominantemente, o resíduo PheB1 (terminal N da cadeia B). É bem-conhecido na técnica que esses derivados são física e enzimaticamente mais estáveis do que insulina nativa. Além disso, os derivados são mais solúveis em sistemas aquosos/orgânicos do que insulina. Além disso, esses derivados mostraram ser menos imunogênicos e ter meias-vidas de circulação prolongadas.

[009] Uma vantagem significativa da presente invenção é que a reação ocorre em condições praticamente neutras, nas quais reações colaterais indesejáveis (por exemplo, desamidação, transamidação, oxidação etc.) são desprezíveis. Outra vantagem é o uso de quantidades relativamente baixas de polímero (por exemplo, reagente PEG), reduzindo assim custos. O conjugado de proteínas – polímero resultante (por exemplo, insulina PEGuilada) pode ser usado sozinho, por exemplo, em terapia humana, ou pode ser encapsulado em um veículo de distribuição de liberação controlada tal como aquele descrito no Pedido de Patente US 2002/0155158.

[0010] Consequentemente, em uma modalidade a presente invenção provê um método para meparar o conjugado de proteían – polímero pelo contato de uma proteína de insulina com um polímero hidrofílico na presença de pelo menos um solvente orgânico e pelo menos um quelador metálico, sob condições pelas quais um conjugado de proteína e polímero é formado. O conjugado pode depois ser isolado usando uma pluralidade de técnicas usuais, tal como cromatografia de coluna.

[0011] Em uma modalidade específica da invenção, o polímero hidrofílico é escolhido do grupo que consiste em polietilenoglicol, copolímeros de polietilenoglicol/polipropilenoglicol, glicerol polioxetilado, e derivados lineares, ramificados ou reativos amina dos mesmos. Derivados reativos a amina apropriados incluem, por

exemplo, aldeídos, éster de N-hidróxi succinimida de ácidos carboxílicos de PEG, carbonatos de PNP e derivados de polímeros hidrofílicos terminados em benzotriazol. Tipicamente, o polímero hidrofílico e a proteína de insulina estão presentes em uma relação molar de aproximadamente 10:1-1:1.

[0012] Solventes orgânicos apropriados para uso na invenção incluem uma ampla variedade de solventes conhecidos, que incluem, mas não estão limitados a, solventes orgânicos miscíveis com água, tal como etanol, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), dioxano, dimetilformamida (DMF) e N-metil-2-pirrolidona (NMP). Tipicamente, o solvente orgânico está presente em uma concentração de aproximadamente 0,1 a 10%.

[0013] Queladores metálicos apropriados para uso na invenção também incluem uma ampla variedade de compostos conhecidos, que incluem, mas não estão limitados a, queladores de íons metálicos polivalentes (por exemplo, divalentes), tal como EDTA, deferoxamina (DEF), dietilenotriamina ácido pentaacético (DTPA) e bis(aminoetil)glicoléter N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA). Em geral, o quelador está presente em uma concentração de aproximadamente 0,1-10 mM.

[0014] Em uma modalidade específica da invenção, a proteína de insulina e o polímero hidrofílico (por exemplo, PEG) são postos em contato (isto é, reagidos ou conjugados) em uma solução aquosa, a uma concentração de proteína de aproximadamente 0,1-5% em peso. Em outra modalidade da invenção, a proteína de insulina e o polímero hidrofílico são postos em contato em uma solução aquosa a um pH de aproximadamente 5,0-7,5, preferivelmente, aproximadamente 7,0. Isso resulta em um rendimento de até 50% do isômero posicional correto de conjugado de insulina-polímero. Em outra modalidade específica, o polímero hidrofílico e a proteína de insulina são postos em contato a

uma temperatura de aproximadamente 4°C a 50°C, preferivelmente, aproximadamente 15°C a 25°C.

[0015] Uma vez formado, o conjugado de proteína-polímero é depois separado de produtos de reação colaterais indesejáveis e proteína de insulina não-reagida. Isso pode ser obtido usando uma pluralidade de técnicas conhecidas, tal como cromatografia. Em uma modalidade específica, é usada cromatografia de troca de íons.

[0016] Em ainda outra modalidade, o método da presente invenção compreende ainda a etapa de suprimir a reação (isto é, conjugação) de proteína de insulina e polímero hidrofílico, antes de isolar o produto de conjugação. Em uma modalidade específica, isso é obtido reduzindo o pH da reação para aproximadamente 1-4.

[0017] Conjugados de proteína-polímeros específicos produzidos pelos métodos da presente invenção incluem, por exemplo, conjugados de insulina-polímero, preferivelmente, conjugados de insulina-PEG (insulina PEGuilada). Isso pode incluir qualquer insulina ou proteína correspondente à insulina, tal como insulina humana com a sequência mostrada em SEQ ID no:1 e membros da família relacionados. Em uma modalidade específica, a insulina é reagida especificamente (PEGuilada) no resíduo PheB1, sem reação significativa nos resíduos GlyA1 ou LysB29. A insulina PEGuilada correspondente pode ser administrada terapêuticamente em qualquer formulação apropriada, tal como é conhecido na técnica. Em uma modalidade específica, o conjugado é administrado em uma formulação de liberação contínua, por exemplo, encapsulando o conjugado em um polímero biodegradável, antes da administração.

[0018] Outras modalidades da presente invenção evidenciam-se da Descrição Detalhada e Exemplos abaixo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0019] As Figuras 1A e 1B são gráficos que mostram os efeitos da

substituição de local (Figura 1A) ou peso molecular do polímero (Figura 1B) na farmacodinâmica *in vivo* de conjugados de PEG-insulina, após a injeção intravenosa em ratos normais.

[0020] A Figuras 2A e 2B são gráficos que mostram a perda de insulina solúvel devido à agregação física para conjugados de insulina-PEG de peso molecular diferente com o mesmo local de ligação de polímero (Figura 2A) e locais diferentes de ligação de polímeros com o mesmo peso molecular PEGF (Figura 2B).

[0021] A Figura 3 é um gráfico que mostra a estabilidade química de dois isômeros posicionais de mPEG(5000 Da)-insulina.

[0022] A Figura 4 é um gráfico que mostra a liberação cumulativa *in vitro* de F5000 (PEG-insulina) de microesferas de PGLA.

[0023] A Figura 5 é um gráfico que mostra a farmacodinâmica *in vivo* de microesferas de F5000 (PEG-insulina), após a administração subcutânea a ratos diabéticos.

[0024] A Figura 6 é um gráfico que mostra a farmacocinética *in vivo* de microesferas de F5000 (PEG-insulina), após a administração subcutânea a ratos diabéticos.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0025] A presente invenção está voltada para um método de etapa única para preparar rápida e eficientemente conjugados de proteína-insulina. O método inclui reagir uma proteína e um polímero hidrofílico na presença de pelo menos um solvente orgânico e pelo menos um quelador metálico, sob condições praticamente neutras. Conjugados de proteína-polímero específicos da invenção incluem insulina, PEGuilada no terminal amina de PheB1 usando o mínimo de reagente de PEG e condições moderadas. Enquanto trabalhos anteriores mostraram que PheB1 é, normalmente, o grupo amina menos reativo de insulina em relação a reagentes macromoleculares estericamente "volumosos" (veja, por exemplo, Caliceti et al., 1999, supra),

surpreendentemente, os métodos da presente invenção produzem condições nas quais PheB1 é o grupo mais reativo disponível para modificação com polímeros hidrofílicos. Isso possibilita uma reação simples, de uma etapa, na qual insulina PEGuilada em PheB1 é o produto de rendimento mais alto, e pode ser separado dos outros conjugados e insulina não-reagida. Esta última pode ser reciclada para conjugação adicional, caso desejado. O conjugado de insulina PHeB1 PEGuilado conserva plena atividade, tal como medido por controle de glicose no sangue e a estrutura de proteína nativa é preservada.

Polímeros Hidrofílicos

[0026] O termo "polímero hidrofílico" refere-se a qualquer polímero solúvel em água, linear, ramificado, bifurcado, ramificado-bifurcado, dendrimétrico, multi-armado ou em formado de estrela, que inclui, mas não está limitado a, polietileno glicol e copolímeros de polietilenoglicol/polipropilenoglicol, glicerol polioxietilado e polímeros similares. Preferivelmente, o peso molecular do polímero varia de aproximadamente 500 dáltons a aproximadamente 50.000 dáltons. Polímeros hidrofílicos para uso na invenção têm, tipicamente, pelo menos um grupo reativo incorporado para ligação à molécula bioativa de interesse através de funções amina, carboxila, sulfidril, fosfato ou hidroxila. Polímeros hidrofílicos usados na presente invenção, tal como polietilenoglicol, podem ser preparados de acordo com protocolos usuais, com uma extremidade coberta, tal como com um grupo metóxi, e a outra extremidade ativada para fácil conjugação a grupos ativos em moléculas bioativas. Por exemplo, a Patente U.S. N° 6.113.906 descreve o uso de grupos reativos a succinato de succinimidila ou carbonato de succinimidila em uma forma em "formado de U" (isto é, ramificada) de polietileno glicol, para reação com os grupos amina das proteínas. A Patente U.S. N° 5.650.234 descreve o uso de derivados de carbonato de N-hidroxibenzotriazol, carbono de 2-hidroxipirimidina

e carbonato de N-hidróxi-2-pirrolidinona de polietilenoglicol, para reação com os grupos amina de proteínas, para formar uma ligação de uretano estável. A Patente U.S. N° 5.672.662 descreve o uso de ésteres de succinimidila de polietilenoglicóis substituídos com ácido propiônico e butanóico, para reação com os grupos amina de proteínas, para formar uma ligação de amida estável. A Patente U.S. N° 5.446.090 descreve o uso de derivados de vinil-sulfona de polietileno glicol, para formar ligações de tioéter estáveis com os grupos sulfidrilas das proteínas. A Patente U.S. N° 5.880.255 descreve o uso de derivados de tresila (2,2,2-trifluoretano-sulfonila) de polietilenoglicol, para reação com os grupos amina de proteínas, para formar uma ligação simples, estável de amina secundária. A Patente U.S. N° 5.252.714 descreve o uso de derivados de propionaldeído de polietileno glicol, para reação com os grupos amina de proteínas, resultando em uma ligação estável de amina secundária. As ligações que resultam na ligação desses polímeros hidrofílicos em moléculas bioativas podem ser propositadamente planejados para serem estáveis ou instáveis (isto é, reversíveis). Além disso, polímeros hidrofílicos usados na presente invenção podem ser preparados de acordo com protocolos usuais com dois grupos funcionais semelhantes (por exemplo, homobifuncionais) ou dessemelhantes (por exemplo, heterobifuncionais) disponíveis para facilitar a conjugação a grupos ativos ou moléculas bioativas. Por exemplo, o documento WO 126692A1 descreve o uso de derivados de polietilenoglicol heterobifuncionais para modificação de proteínas. O teor integral dessas patentes está incorporado ao presente por referência.

[0027] Em uma modalidade, o polímero hidrofílico é poli(etilenoglicol) (PEG). PEG refere-se a um poliéter neutro, linear ou ramificado, com a fórmula química $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}$. PEG é altamente solúvel em água e em muitos solventes orgânicos (por

exemplo, cloreto de metileno, etanol, tolueno, acetona e clorofórmio) e é facilmente obténível em diversos tamanhos (pesos moleculares) e arquiteturas funcionalizadas (por exemplo, terminados em amina, carboxila e sulfidril). Constatou-se que PEG é não tóxico e está aprovado pela FDA para uso em drogas (parenterais, tópicas, supositórios, sprays nasais), alimentos e cosméticos. Em solução, PEG é um polímero altamente hidratado, em que cada monômero (unidade de óxido de etileno) pode ligar até três moléculas de água. Além disso, acredita-se que PEG tenha a capacidade de influenciar a estrutura de diversas camadas moleculares de moléculas de água hidratantes, associadas mais frouxamente. Simulações moleculares do comportamento de cadeias ligadas a uma superfície em água mostram que o polímero apresenta um alto grau de flexibilidade segmental. Desse modo, presume-se que o polímero ocupe um grande volume hidrodinâmico em ambientes aquosos. Essas conclusões servem para explicar porque PEG é notavelmente eficaz em excluir outros polímeros (naturais e sintéticos) de sua presença. A exclusão de outros polímeros é a principal força motriz por trás da capacidade de PEG para rejeitar proteínas, formar sistemas de duas fases com outros polímeros sintéticos e tornar esse polímero tanto não imunogênico como não antigênico. Quando PEG está ligado de modo covalente a uma proteína, ele tipicamente transfere muitas das características favoráveis do polímero ao conjugado resultante. Devido às muitas propriedades vantajosas acima mencionadas, PEG é bem apropriado para modificação de proteínas.

[0028] Tal como usado no presente, o termo "PEG" inclui qualquer polímero de PEG, inclusive derivados reativos a amina de PEG ("reagentes de PEG"). É conhecida uma pluralidade de reagentes de PEG para conjugação de proteínas. Um reagente de PEG típico é um polímero de PEG linear, com uma extremidade terminada em uma

ligação de éter (por exemplo, O-metila) e a outra funcionalizada com um grupo reativo. Outros reagentes de PEG são ramificados ou dendrimétricos, novamente com uma combinação de terminais não reativos e grupos funcionais reativos, para ligação às proteínas. Alternativamente, podem ser usados reagentes de PEG homo- ou hetero-bifuncionais, com uma combinação de grupos funcionais reativos semelhantes ou dessemelhantes, para ligação a proteínas. Exemplos de reagentes de PEG incluem, mas não estão limitados a, espécies terminadas em um aldeído, um carbonato de N-hidróxi succinimidila, um propionato de N-hidróxi succinimidila, um carbonato de p-nitrofenila ou um carbonato de benzotriazol ou outras espécies ativadas de PEG reativas a amina.

[0029] O polímero de PEG pode ter um peso molecular no âmbito de, por exemplo, 500 a 50.000 Da. Os grupos funcionais reativos podem ser separados da cadeia de PEG por grupos de ligantes. Opcionalmente, os polímeros têm ligações internas degradáveis entre o PEG e os ligantes. Conseqüentemente, em uma modalidade da invenção, grupos reativos no polímero de PEG podem ser eletrofilicamente ativados para reação com nucleófilos de proteína. Exemplos de grupos eletrofilicos são funcionalidades de carbonato de n-hidróxi succinimidila, tresila e aldeído. Os reagentes de PEG com essas funcionalidades reagem para formar ligações covalentes em grupos amina de proteínas. Um reagente de PEG preferido para conjugação de PEG a grupos amina de proteína é o éster ativo de mPEG succinimidila de um ligante de ácido propiônico, mPEG-SPA. Outro reagente de PEG preferido é monometóxi PEG-aldeído (mPEG-Ald).

Conjugados de Polímero de Insulina

[0030] A administração parenteral de formulações de insulina continua sendo a principal terapia utilizada para o tratamento de

diabetes mellitus dependente de insulina (IDDM), desde a descoberta de insulina há mais de 75 anos atrás. Muitos dos fatores que tornam as atuais terapias inadequadas são deficiências inerentes, intrínsecas à molécula de insulina. Especificamente, a insulina apresenta muitos problemas típicos de agentes farmacêuticos de proteína, incluindo pouca estabilidade física e química, suscetibilidade à proteólise, imunogenicidade e antigenicidade, e uma meia-vida no plasma relativamente curta.

[0031] A PEGuilação de proteína tem sido usada para aperfeiçoar a eficácia terapêutica de proteínas humanas recombinantes. A maioria das proteínas administradas parenteralmente é rapidamente liberada do corpo pelo sistema reticuloendotelial (RES), rim, baço e fígado. Além disso, a liberação depende do tamanho molecular, carga e da presença de receptores celulares específicos para as proteínas de interesse. A ligação de PEG a uma proteína afeta seu tamanho molecular, carga e capacidade de ligação ao receptor, que pode servir para reduzir a velocidade total de liberação do conjugado.

[0032] Além disso, o metabolismo de proteínas por enzimas leva à perda rápida de atividade biológica de proteínas terapêuticas. Protegendo estericamente os domínios de proteínas suscetíveis ao ataque proteolítico, PEG diminui a degradação da proteína, que a torna biologicamente inativa.

[0033] Além disso, mesmo proteínas humanas recombinantes provocam respostas imunológicas após uso repetido. Por mascarar estericamente os determinantes imunogênicos/antigênicos de proteínas terapêuticas, a ligação de PEG normalmente resulta em conjugados não imunogênicos e não antigênicos. Conseqüentemente, no total, o resultado de mudanças nas características das proteínas de origem por PEGuilação aumenta a meia-vida no plasma e resistência à degradação proteolítica e diminui a imunogenicidade e antigenicidade

do constructo de PEG-proteína resultante.

Proteína de Insulina

[0034] O termo "proteína de insulina", tal como usado no presente, refere-se a qualquer proteína de insulina de ocorrência natural ou recombinante ou proteína correspondente, capaz de ser conjugada, por exemplo, no resíduo PheB1. Conseqüentemente, as proteínas de insulina para uso na invenção incluem, por exemplo, análogos, homólogos e derivados de insulina. Pode ser usada a insulina de qualquer espécie apropriada, tal como humana, de porco, vaca, cão, rato, camundongo, carneiro ou macaco. Em uma modalidade preferida, a insulina é insulina humana.

[0035] A insulina humana é uma proteína bem-conhecida, que é facilmente obtível comercialmente de diversas fontes, que incluem, mas não estão limitadas a, Sigma Chemical Company e Novo Nordisk. Insulina humana de ocorrência natural é uma proteína com um peso molecular de aproximadamente 5.500 dáltons e inclui, aproximadamente, 51 aminoácidos. Dependendo do fabricante, a insulina pode ter uma atividade ligeiramente diferente, com base no peso, porém, a atividade de insulina definida em unidades é o padrão. Insulina com diversos graus de atividade biológica está comercialmente disponível. Por exemplo, é possível comprar formas de insulina de ação baixa, intermediária e rápida. Agentes hipoglicêmicos não de insulina, que têm atividades semelhantes à insulina ou que aumentam os receptores de insulina incluem, mas não estão limitados a, sulfoniluréias (por exemplo, glibenclamida, gliclazida, glipizida, bliburida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, acetexamida e glimoprida); dionas de tiazolidina (por exemplo, troglitazona e ploglitazona); inibidores de alfa-glucosidase (por exemplo, acarbose e miglitol); e agentes de liberação de insulina de terceira geração (por exemplo, KAD 1220, etoxomir e repaglinida).

[0036] A molécula de insulina consiste em duas cadeias de polipeptídeos, a cadeia A e a cadeia B. A seqüência de aminoácidos para insulina humana está apresentada no presente como SEQ ID NO:1. A cadeia A está composta de 21 aminoácidos (indicados por A1-A21), e a cadeia B mais longa consiste em 30 aminoácidos (B1-B30). Essas duas cadeias são mantidas unidas por duas ligações de dissulfeto intercadeias entre os resíduos A7 e B7, bem como entre A20 e B19, enquanto outra ligação de dissulfeto intracadeia liga os resíduos A6 e A11. Há também numerosas interações não-covalentes entre os resíduos de aminoácido das duas cadeias que ajudam a estabilizar a insulina em sua estrutura tridimensional.

[0037] Existem três grupos amina reativos disponíveis para modificação (por exemplo, por PEG), a saber, os localizados nos terminais N das cadeias A e B (A1 e B1, respectivamente) e uma lisina localizada de modo adjacente ao terminal C da cadeia B (B29).

[0038] As proteínas de insulina também incluem proteínas relacionadas, tal como os fatores de crescimento semelhantes à insulina (I e II) e proteínas da família de hormônio de crescimento/prolactina.

Conjugação de Proteína de Insulina ao Polímero Hidrofílico

[0039] De acordo com a presente invenção, a proteína de insulina e o polímero hidrofílico são postos em contato (isto é, reagidos ou conjugados) na presença de pelo menos um solvente orgânico e pelo menos um quelador metálico, sob condições que promovem a formação de um conjugado da proteína e do polímero. Em uma modalidade específica, a proteína de insulina é PEGuilada no terminal de amina de PheB1 usando um mínimo de reagente de PEG e condições moderadas. O grupo amina de PheB1 normalmente é o menos reativo das 3 funções de amina disponível na insulina (Caliceti et al., 1999, supra). Na presente invenção, foram encontradas

condições que tornam o grupo amina de PheB1 o mais reativo a reagentes de PEG. Essas condições de reação, desse modo, produzem PEGuilação simples no PheB1 como o produto de reação predominante.

[0040] Em uma modalidade específica da presente invenção, a proteína de insulina e o polímero hidrofílico são postos em contato em uma solução aquosa, a uma concentração de proteína de aproximadamente 0,1 a 5% (p/p), preferivelmente, de 0,5 – 1,5%, ajustada para um pH no âmbito de 5,0 a 7,5, preferivelmente, um pH de 6,5 a 7,2. O pH pode ser controlado por inclusão de sais tampões, adição de ácidos/bases orgânicos, ou adição de ácidos/bases inorgânicos comuns. A solução aquosa compreende, ainda, pelo menos um solvente orgânico miscível com água, que pode ser escolhido do grupo que inclui etanol, metanol, DMSO, dioxano, DMF, NMP etc. Em outro aspecto, o solvente orgânico, preferivelmente dioxano, está incluído a uma concentração (v/v) de 0 a 25%, preferivelmente, de 2-20%, mais preferivelmente, de 5 – 15%.

[0041] Queladores metálicos apropriados para uso na invenção incluem uma ampla variedade de queladores conhecidos, incluindo, por exemplo, ácidos aminopolicarboxílicos, tal como, ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), ácido dietilenotriamina pentaacético (DTPA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido N-2-acetamido-2-iminodiacético (ADA), bis(aminoetil)glicoléter, ácido N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido trans-diaminociclohexano tetraacético (DCTA), ácido glutâmico e ácido aspártico; e ácidos hidroxiaminocarboxílicos, tal como, por exemplo, ácido N-hidroxi-etiliminodiacético (HIMDA), N,N-bis-hidroxi-etilglicina (bicina) e N-(tris-hidroximetilmetila)glicina (tricina); e glicinas substituídas em N, tal como glicilglicina. Outros queladores apropriados incluem ácido 2-(2-amino-2-ocetoila)aminoetanossulfônico (BES) e deferoxamina

(DEF). Queladores apropriados usados nos métodos da presente invenção incluem, por exemplo, aqueles que se ligam em íons metálicos em solução para tornar os mesmos incapazes de reagir com O_2 disponível, desse modo minimizando ou evitando a geração de resíduos OH, que são livres para reagir com proteína e degradar a mesma. Esses queladores podem reduzir ou evitar a degradação de uma proteína que é formulada sem a proteção de um agente de quelação.

[0042] Agentes de quelação usados na invenção podem estar presentes em sua forma de sal, por exemplo, funcionalidades de carboxila ou outras funcionalidades ácidas dos queladores precedentes. Exemplos desses sais incluem sais formados com sódio, potássio, cálcio e outros íons metálicos fracamente ligados. Tal como é conhecido na técnica, a natureza do sal e o número de cargas a serem neutralizadas depende do número de grupos carboxila presentes e do pH ao qual o quelador estabilizador é fornecido. Tal como também é conhecido na técnica, os agentes de quelação têm forças variáveis com as quais íons de alvo específicos são ligados. Em geral, íons de metais pesados são ligados mais fortemente do que de suas contrapartes de peso molecular mais baixo, carregadas de modo similar.

[0043] O quelador usado nos métodos da presente invenção também pode ser escolhido de EDTA, EGTA e outros queladores de cátions multivalentes conhecidos na técnica. De acordo com os métodos da invenção, um quelador metálico, preferivelmente, EDTA, está presente a uma concentração de 0,1 a 10 mM, preferivelmente, de 1 – 5 mM, mais preferivelmente, de 1-3 mM.

[0044] Polímeros hidrofílicos apropriados para uso na presente invenção incluem uma ampla variedade de polímeros conhecidos, incluindo, por exemplo, polietilenoglicol, polipropilenoglicol e derivados

lineares, ramificados e reativos a amina dos mesmos. Em um aspecto da invenção, o derivado reativo a amina é escolhido do grupo que consiste em um derivado de polímero hidrofílico terminado em um aldeído, uma N-hidróxi succinimida, um carbonato de PNP e em um benzotriazol. Em uma modalidade específica da invenção, o polímero hidrofílico, por exemplo, um reagente de PEG, preferivelmente, um éster de succinimidila de PEG, mas preferivelmente, mPEG-SPA, é posto em contato com insulina a uma relação molar (PEG:insulina) de aproximadamente 10:1 a 1:1, preferivelmente, 3:1 a 1,2:1, mais preferivelmente, 1,7:1 a 1,5:1. Em outra modalidade específica, o polímero hidrofílico e a proteína de insulina são postos em contato a uma temperatura de aproximadamente 4°C a 50°C, preferivelmente, aproximadamente, 15°C a 25°C.

[0045] Em outra modalidade, a invenção compreende, ainda, a etapa de suprimir a reação de conjugação antes de isolar o conjugado. Isso pode ser obtido, por exemplo, reduzindo o pH para aproximadamente 1-4, preferivelmente, 2 – 3, mais preferivelmente, aproximadamente, 2,4 a 2,6. A isolamento do conjugado pode ser obtida usando técnicas usuais, tal como cromatografia de troca de íons (por exemplo, troca de cátions) e o conjugado desejado pode ser coletado, concentrado, dessalinizado e secado.

Uso de Agentes Bioativos Conjugados em Formulações de Distribuição de Liberação Controlada

[0046] Agentes bioativos conjugados, tais como proteínas de insulina PEGuiladas, podem ser vantajosamente encapsulados em formulações de distribuição de drogas baseadas em polímeros biodegradáveis. Agentes bioativos PEGuilados são encapsulados a concentração mais alta na formulação de distribuição de droga do que os agentes bioativos não-PEGuilados correspondentes. A liberação de agentes bioativos PEGuilados de formulações de distribuição de

drogas de polímeros biodegradáveis mostra menos descarga do que para os agentes bioativos não-PEGuilados correspondentes. A estabilidade física e química de agentes bioativos PEGuilados em formulações de distribuição de drogas em polímeros biodegradáveis é maior e a antigenicidade e imunogenicidade são mais baixas do que para os agentes bioativos não-PEGuilados correspondentes.

[0047] Polímeros biodegradáveis para essa aplicação incluem, mas não estão limitados a, poli(lactídeo)s, poli(glicolídeo)s, poli(d,l-lactídeo-co-glicolídeo)s, poli(caprolactona)s, poli(ortoéster)es, copolímeros de poli(ésteres) e poli(éteres), copolímeros de poli(lactídeo) e poli(etilenoglicol) e similar.

[0048] Conseqüentemente, conjugados de proteína-polímero (por exemplo, insulina PEGuilada) da presente invenção podem ser vantajosamente incorporados em formulações de distribuição de drogas em polímeros biodegradáveis, incluindo, por exemplo, micropartículas de poli(d,l-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA). Isso obtém um encapsulamento mais alto do conjugado de proteína em comparação com uma proteína não-conjugado e também reduz a descarga (liberação nas primeiras 24 horas). Além disso, a conjugação com polímeros hidrofílicos, tal como PEG, torna o conjugado solúvel em determinados solventes orgânicos, simplificando o processo de formação de microesferas de PLGA.

EXEMPLOS

1. PREPARAÇÃO E CRACTERIZAÇÃO DE PEG-INSULINA ESPECÍFICA DE LOCAL PELO MÉTODO DE UMA ETAPA

EXEMPLO 1

Preparação de conjugados de N^αB¹-metoxipoli(etilenoglicol)-insulina

[0049] Um grama (172 μmoles) de insulina (insulina Zn²⁺, Intergen Co.) foi dissolvido em 100 ml de água com 2 mM de EDTA à temperatura ambiente, e o pH_{app} da solução foi ajustado para 7 usando

HCl diluído. Em outro recipiente, 1,4 g (equivalentes de 1,6 mol em relação à insulina de um derivado de PEG ativado propionato de [monometoxipoli(etilenoglicol) succinimidila, mPEG-SPA, Shearwater Corp.] foram dissolvidos em 10 ml de dioxano à temperatura ambiente. A solução de mPEG-SPA foi depois adicionada à solução de insulina por injeção direta e a reação foi deixada prosseguir por 2 h à temperatura ambiente. A reação foi depois suprimida por acidificação com HCl (pH_{app} 2,5) e a mistura foi diafiltrada [Aparelho de ultrafiltração Amiconn 8200 ajustado com uma membrana YM3 (3000 MWCO)] contra 0,02% de bicarbonato de amônio. Então a mistura de reação foi diafiltrada contra 1M de ácido acético/7M de uréia/0,01M de NaCl e concentrada para 10 ml, antes da purificação. O derivado de mPEG-PheB1-insulina foi isolado dos outros produtos colaterais da reação (insulina de mPEG-GlyA1, insulina de mPEG-LysB29, insulinas de di-mPEG e insulinas de tri-mPEG) usando um sistema de FPLC equipado com uma coluna de troca de cátions SP Sepharose (Amersham Biosciences). A coluna foi equilibrada com 1M de ácido acético/7M de uréia contendo 0,04 M de NaCl, a uma velocidade de corrente de 5 ml/min e as proteínas ligadas foram eluídas usando um gradiente de NaCl (0,04M-0,12M) ao longo de 80 min. O produto de eluição correspondente aos picos maiores detectados a 280 nm foi coletado e diafiltrado contra 0,02% de NH_4HCO_3 para remover quaisquer impurezas de baixo peso molecular, depois liofilizado e armazenado a -20°C , antes da caracterização.

[0050] Esse mesmo método também foi usado para preparar um conjugado com um polímero linear de peso molecular mais baixo (isto é, mPEG-SPA, $M_r = 2000$ Da) e dois polímeros ramificados de peso molecular mais alto (isto é, mPEG₂-SPA, $M_r = 10.000$ Da) ligados ao grupo amina de PheB1, e esses dois conjugados diferentes também foram caracterizados de acordo com as técnicas descritas abaixo. Os

resultados confirmam que esse método pode ser usado com sucesso para preparar uma ampla variedade de conjugados de PEG-PheB1-insulina, que diferem apenas na estrutura (isto é, lineares ou ramificados) ou tamanho (isto é, peso molecular) do polímero ligado a PheB1.

EXEMPLO 2

Determinação por FPLC/HPLC da pureza do conjugado

[0051] A pureza do mPEG-PheB1-insulina foi analisada usando uma coluna de troca de cátions analítica (Mono S 5/5, Amersham Biosciences), sob condições idênticas às usadas no procedimento de isolamento descrito acima, exceto que foi usada uma velocidade de corrente de 1,0 ml/min. Uma técnica ortogonal (HPLC de fase inversa) também foi usada para verificar a pureza final dos conjugados. Um sistema de HPLC de Waters Alliance foi equipado com um detector de disposição de fotodiodos (PDA) Waters 996 e uma coluna de fase inversa Symmetry 300 (C18, tamanho de partículas de 5 µm, 4,6x250 mm). A fase A móvel consistiu em 0,1% de TFA (ácido trifluoracético) em água de qualidade MilliQ e a fase B móvel consistiu em 95/5 de ACN (acetonitrila)/H₂O, também contendo 0,1% de TFA. Um gradiente linear de 30-60% de B ao longo de 15 min (2%B/min) foi utilizado e a eluição dos compostos foi seguida de detecção a 276 nm. A pureza de mPEG-insulina é >95%.

EXEMPLO 3

Confirmação da identidade do conjugado por seqüenciação da proteína de terminal N (degradação de Edman)

[0052] A análise da seqüência da proteína de terminal N foi utilizada para determinar o local da conjugação de pEG, com o conhecimento de que a reação de degradação de Edman não se dá em nenhum grupo amina de terminal N que esteja ligado de modo covalente a PEG. Todas as amostras foram analisadas usando um

Seqüenciador de Proteína Applied Biosystems 477A (Pasadena, CA), através de três ciclos de degradação. Uma relação molar de aminoácido de terminal N de [GlyA1/PheB1] \approx 1 é indicativo de conjugação ao resíduo LysB29 (ou a nenhum), um [GlyA1/PheB1] \approx 0 é indicativo de conjugação ao resíduo GlyA1, e [GlyA1/PheB1] \approx 30 é indicativo de conjugação ao resíduo PheB1. O resultado confirmou que o local de substituição foi de, aproximadamente, 95% de PheB1.

EXEMPLO 4

Identificação do peso molecular do conjugado por ionização de desorção de laser assistida por matriz (MALDI)

[0053] A técnica de caracterização analítica foi escolhida por ser um método de "ionização suave", significando que o mesmo não irá fazer com que o conjugado de PEG-insulina se desfaça durante a análise. Os resultados do instrumento fornecem uma medida quantitativa da relação de massa/carga de cada amostra; portanto, o número de cadeias de PEG ligadas à insulina é facilmente determinado da diferença total nos pesos moleculares dos conjugados e insulina não-modificada. Todas as amostras foram examinadas em um espectrômetro de massa Perceptive Biosystems, modelo DERP MALDI/TOF, operado no modo linear e íons positivos foram monitorados. A matriz para todas as amostras foi ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e a linha de 337 nm de um laser de nitrogênio foi usada com a média de pelo menos 64 tomadas para o espectro final. A insulina monomérica tinha um peso molecular de 5807,2 Da, e o peso molecular em média numérica de mPEG(5000)-SPA usado na reação de conjugação foi de 5129 Da. Os espectros de massa de mPEG(5000)-insulina foram coerentes com a conclusão de que apenas uma cadeia de mPEG estava ligada à insulina. Além disso, os picos de íons individuais diferiram uniformemente em 44 Da (o peso molecular de uma unidade de monômero de oxido de etileno). Esses

resultados confirmam que apenas uma cadeia de mPEG estava ligada à insulina em todos os conjugados preparados e que sua polidispersidade deve-se exclusivamente à polidispersidade intrínseca de PEG.

EXEMPLO 5

Formação de Amina Secundária na Conjugação de PEG ao Terminal Amina de Insulina B1

[0054] F5000 PEG-insulina foi preparado por reação da proteína com um mPEG ativado, que possuía um grupo aldeído terminal. Essa reação dá-se através de um intermediário de base de Schiff, que é subsequentemente reduzido por cianoboro hidreto de sódio formando uma ligação de amina secundária estável entre o polímero e a proteína. A reação foi executada tal como se segue: foi feito um tampão de 2 mM de EDTA/25 mM de fosfato e o pH ajustado para 6,0 com ácido fosfórico. Insulina a 5,5 mg/ml (2 ml de volume total) foi dissolvida no tampão de fosfato com a adição de 440 µl de dioxano. Quando a insulina estava em solução, foram adicionados 2 ml de uma solução de 10 mM de NaCNBH₃ em água e, depois, um excesso molar de 5x de mPEG(5000)-aldeído (como pó seco, Shearwater Corporation, Huntsville, Alabama) foi adicionado. No total, a mistura de reação continha aproximadamente 12,5 mM de fosfato (pH 6), 1 mM de EDTA, 10% de dioxano, 5 mM de NaCNBH₃, 2,5 mg/ml de insulina e 10 mg/ml de mPEG-aldeído. A reação foi deixada continuar durante a noite e o pH foi encontrado como sendo aproximadamente 5,5 no dia seguinte. A reação foi suprimida com a adição de ácido acético para um pH de aproximadamente 2. Uma alíquota pequena foi analisada usando RP-HPLC. As espécies principais da reação foram determinadas tal como se segue: aproximadamente 70% dos produtos de reação são monoPEGuilados (t.a. 12,5 min), com aproximadamente 10% de insulina não-reagida (t.a. 9,8 min) e 9% de insulina di-

PEGuilada (t.a. 13,8 min) remanescente. As frações monoPEGuiladas foram combinadas e dialisadas contra 0,02% de NH_4HCO_3 e liofilizadas. A análise de MALDI-TOF mostrou uma massa molecular única correspondente à adição de uma cadeia de PEG-5000 à insulina. A análise de degradação de Edman mostrou que aproximadamente 95% das espécies monoPEGuiladas foram substituídos no resíduo PheB1 e as espécies monoPEGuiladas remanescentes (~5%) provavelmente foram substituídas no resíduo GlyA1, porque o grupo amina de LysB29 é protonizado em 99,99% (portanto, não reativo) sob as condições de reação aqui usadas.

II. MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA A PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS DE PEG-INSULINA ESPECÍFICOS DE LOCAL

EXEMPLO 6

PEG-5000 ligado ao terminal amina da cadeia B (F5000) usando o método tradicional de etapas múltiplas

[0055] Insulina humana recombinante (Intergen Co.) foi PEGuilada na posição PheB1 utilizando um intermediário protegido com di-boc. Di- $\text{N}^{\alpha\text{A1}}$, $\text{N}^{\alpha\text{B29}}$ -t-boc-insulina (diboc-insulina) foi sintetizada de acordo com Liu et al. 1997 (Liu et al., Bioconj. Chem. 8(5):664-672, 1997). O conjugado de mPEG(5000)-PheB1-insulina foi preparado pelo protocolo de Hinds et al., 2000, supra.

[0056] A fração desejada isolada por FPLC era >98% pura, com base em áreas de pico cromatográficas em HPLC de fase inversa e FPLC de troca de íons. O produto purificado foi caracterizado adicionalmente por espectrometria de massa de MALDI-TOF e análise de seqüência de aminoácidos e mostrou ser PEG monossustituído no terminal amina da cadeia B, PheB1. O conjugado de mPEG(5000)-PheB1-insulina (F5000) preparado e purificado por esse método era equivalente ao mesmo conjugado feito pelo método mais simples e menos dispendioso em tempo da presente invenção (Exemplo 1).

EXEMPLO 7

PEG-5000 ligado a Lys29 da cadeia B (K5000)

[0057] Insulina humana recombinante (Intergen Co.) foi PEGuilada especificamente em Lys29 da cadeia B pelo método de Hinds et al., 2000, supra. A fração de FPLC desejada era >98% pura, com base em áreas de pico cromatográficas em HPLC de fase inversa e FPLC de troca de íons. O produto purificado foi caracterizado adicionalmente por espectrometria de massa de MALDI-TOF e análise de seqüência de aminoácidos e mostrou ser PEG monossustituído no penúltimo aminoácido da cadeia B, LysB29. O mesmo método também foi usado para preparar um conjugado com um polímero linear de peso molecular mais baixo (isto é, mPEG-SPA, $M_r = 2000$ Da) e dois polímeros ramificados de peso molecular mais alto (isto é, mPEG₂-SPA, $M_r = 10.000$ ou 20.000 Da) ligados ao grupo amina de LysB29, e esses três conjugados diferentes foram caracterizados de acordo com as técnicas descritas acima. Os resultados confirmam que esse método pode ser usado com sucesso para preparar uma ampla variedade de conjugados de PEG-LysB29-insulina, que diferem apenas na estrutura (isto é, linear ou ramificada) ou tamanho (isto é, peso molecular) do polímero ligado a LysB29.

III. CARACTERIZAÇÃO DE CONFORMAÇÃO, ATIVIDADE E ESTABILIDADE DE PEG-INSULINA ESPECÍFICO DE LOCAL

EXEMPLO 8

Determinação de integridade conformacional de insulina após a PEGuilação específica de local

[0058] Espectroscopia de dicroísmo circular no âmbito ultravioleta distante foi usada para examinar a conformação de insulina. Normalmente, são avaliadas as magnitudes de duas mínimas negativas: 208 nm (hélice α) e 223 nm (folha β) na análise da conformação de insulina em ambientes aquosos. A banda de CD de

ultravioleta distante a 208 nm se origina principalmente de hélices α formadas de resíduos entre B10-B19, A2-A6 e A13-19, enquanto a estrutura β é o componente principal da banda de CD de ultravioleta distante a 223 nm. As características espectrais de CD das amostras confirmam que a ligação de mPEG à insulina em qualquer um dos resíduos PheB1 ou LysB29, não altera a conformação geral (secundária) dos conjugados, em comparação com insulina de Zn^{2+} .

EXEMPLO 9

Farmacodinâmica de conjugados de PEG-insulina

[0059] Os efeitos de PEGuilação sobre a farmacodinâmica de insulina foram investigados. Esses estudos foram realizados para avaliar a atividade biológica *in vivo* (capacidade para baixar a glicose no soro) de formulações conjugadas contendo PEG-insulinas diferindo no local de substituição (isômeros posicionais) ou peso molecular de PEG, em relação a uma formulação de insulina disponível comercialmente (Humulin R, Lilly). Níveis de glicose no sangue foram medidos para ratos Sprague-Dawley em jejum, após a administração intravenosa de F5000, K2000, K5000, K10000 ou HumulinR®. O equivalente de 0,3 IU/kg (baseado em concentração de proteína e corrigido para o peso de PEG, conforme apropriado; presume 25 iU/mg de proteína) foi dissolvido em solução salina normal e administrado por injeção na veia da cauda; N=6 por grupo. O sangue foi retirado antes da injeção do artigo de teste e a intervalos por um período de 6 h após a injeção. O soro foi isolado por procedimento padrão e níveis de glicose foram medidos usando um medidor de glicose Accucheck Advantage (Boehringer Ingelheim).

[0060] Os resultados mostrados nas Figuras 1A e 1B revelam que F5000, K2000 e K5000 são todos tão eficazes em suprimir os níveis de glicose em ratos normais como doses de insulina humana normal. Surpreendentemente, O conjugado K10000 não reduziu os níveis de

glicose na mesma extensão como os outros artigos de teste, mas observou-se que a duração de ação do conjugado excedeu 6 horas. Portanto, o conjugado K10000 poderia ser desenvolvido como uma alternativa solúvel às suspensões de insulina basais, convencionais, para fornecer uma supressão de glicose prolongada a pacientes diabéticos.

EXEMPLO 10

Estabilidade física de conjugados de PEG-insulina representativos

[0061] Um método de teste de trepidação acelerada foi usado para investigar a estabilidade física de sete conjugados de PEG-insulina (F2000, F5000, F10000, K2000, K5000, K10000 e K20000) e insulina de zinco. Esse teste usualmente é descrito na literatura como fornecedor de uma medida precisa da estabilidade física de uma preparação de insulina de um modo acelerado. Para esse teste, soluções aquosas da proteína (conjugados) foram preparadas em quadruplicata (1 mg/ml de solução salina tamponada com fosfato, pH 7,3, 0,02% de azida de sódio) e submetidas à trepidação horizontal (frequência de 100/min) a 37°C. As amostras foram retiradas em pontos de tempo predeterminados, filtradas (para remover agregados insolúveis) e analisadas por RP-HPLC, para quantificar a fração de proteína (conjugado) remanescente em solução. A Figura 2 mostra o declínio de proteína solúvel como função do tempo para cada derivado de insulina.

[0062] Esses dados corroboram informes prévios de que derivados de insulina substituídos no grupo amina de PheB1 possuem estabilidades físicas substancialmente mais altas (36-40x) e as insulinas de LysB29 eram um pouco mais estáveis (4-8x) do que peptídeo nativo. Pesquisas anteriores mostraram que a maior resistência à fibrilação de insulinas de PheB1 deve-se a dois efeitos complementares. O primeiro efeito é o bloqueamento estérico

específico do terminal N na cadeia B pela conjugação de mPEG, impedindo, como resultado, que essa superfície participe das interações hidrofóbicas necessária para o crescimento de fibrilas de insulina. O segundo efeito que contribui para a maior estabilidade física da insulina de PheB1 é não-específico e estérico em natureza, e aumenta proporcionalmente com o peso molecular do polímero. Todas as insulinas de LysB29 apresentaram estabilidade física aumentada em relação ao peptídeo nativo, mas não na mesma extensão como os conjugados substituídos em PheB1, até que o peso molecular do polímero excedesse 10kDa. Isso pode ser explicado pela falta de participação de LysB29 em reações de fibrilação, com quaisquer efeitos estabilizadores causados pelo impedimento estérico não-específico das interações intermoleculares envolvidas na fibrilação.

EXEMPLO 11

Estabilidade química de conjugados de PEG-insulina representativos

[0063] Está bem documentado que insulina (ou análogos de insulina) sofre diversas reações de decomposição química em soluções aquosas. Por exemplo, a asparagina de terminal C da cadeia A de insulina decompõe-se de acordo com um mecanismo de desamidação facilitado por um intermediário cíclico sob condições ácidas. Esse intermediário cíclico altamente reativo também pode decompor-se por reação com um dos grupos amina de terminal N de uma molécula de insulina diferente por meio de um mecanismo de reação de transaminação.

[0064] Os conjugados de insulina, F5000 e K5000, foram incubados com trepidação horizontal em PBS e 0,02% de azida de sódio a 37°C. Em pontos de tempo predeterminados (0, 6, 12, 28 e 36 dias), amostras individuais foram retiradas e depois analisadas por RP-HPLC, para determinar a extensão da desamidação e por cromatografia de exclusão de tamanho, para determinar a extensão de

dimerização covalente.

IV. PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E FARMACOCINÉTICA DE FORMULAÇÕES DE DISTRIBUIÇÃO CONTÍNUA DE POLÍMERO BIODEGRADÁVEL DE PEG-INSULINA

EXEMPLO 12

Encapsulamento de PEG-insulina em microesferas de PLGA

[0065] PEG-insulina F5000 (50 mg) foi dissolvido em 1 ml de cloreto de metileno. A solução foi adicionada a um volume de 1 ml de cloreto de metileno contendo 150 mg de PLGA de 45:55 (lac:gly), 0,15 dl/g de IV com grupos terminais ácidos. A solução de cloreto de metileno foi adicionada a 5 ml de água contendo 1% de poli(vinil álcool) em um tubo centrífugo de 15 ml e misturada por vórtice para formar uma emulsão. A emulsão foi adicionada a 100 ml de água contendo 0,3% de poli(vinil álcool) e agitada por 3 h para evaporar o cloreto de metileno. As microesferas endurecidas foram coletadas por filtração a vácuo em um papel de filtro nº 1 de Whatman e secadas.

EXEMPLO 13

Caracterização de microesferas de PLGA de PEG-insulina

[0066] A morfologia da superfície das microesferas de PEG-insulina e a distribuição de tamanho das partículas foram examinadas por microscópio de elétrons de escaneamento e análise de tamanhos de partículas por dispersão de luz de laser, respectivamente. HPLC de fase inversa analítico foi usado para quantificar a quantidade de conjugado de PEG-insulina encapsulada dentro das microesferas de polímero. Antes da análise de HPLC uma quantidade medida de microesferas foi dissolvida em um volume de acetonitrila, e um volume equivalente de TFA de 0,1% em água foi adicionado para precipitar o polímero e extrair o conjugado em solução aquosa. K2000, K5000, K10000, K20000 e F5000-A também foram encapsulados usando esse método. Os resultados desses testes estão resumidos na Tabela 1,

que relaciona o conteúdo de PEG-insulina em % (p/p) da microesfera total e a eficiência de encapsulamento, definida como peso de PEG-insulina encapsulado/peso de PEG-insulina adicionado inicialmente. Foram obtidos um conteúdo de droga relativamente alto, de até 28,3%, e eficiência de encapsulamento, de até 100%, tornando o produto clinicamente útil, devido à dose total reduzida necessária, e comercialmente atraente, devido às baixas perdas de material de partida. Além disso, foram preparadas microesferas usando polímeros com relações de lactídeo:glicolídeo (50:50 e 72:25), pesos moleculares (6,5-24 kDa), viscosidades intrínsecas (0,09-027dL/g), ou grupos éster terminais (metila e laurila) variáveis, com um amplo âmbito de cargas de droga (5-35% em peso).

TABELA 1

Características de preparações de microesferas de PEG-insulina representativas

Conjugado	Carga do núcleo (% em peso)	Eficiência de encapsulamento (% em peso)	Liberação <i>in vitro</i> (%)	
			Descarga inicial	Total
K2000	24	96	6	
K5000	24	96	2	
K10000	19	76	80	
K20000	14	56	80	
F5000	24	96	2	
F5000-A	21	85	20	97

[0067] As microesferas foram preparadas com PLGA (44:55 L:G, 0,15 dL/g, grupo terminal ácido), para uma carga de núcleo nominal de 25% em peso.

EXEMPLO 14

Liberação *in vitro* da formulação de microesferas de PEG-insulina usada em experiências com animais

[0068] Uma amostra de 15 mg de microesferas de PEG-insulina F5000 (conteúdo de droga 14,1%, PLGA 45:55, 0,15 dl/g IV, grupos terminais ácidos) foi suspensa em 1,5 ml de solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4, 0,02% de azida de sódio e 0,02% de Tween20) e incubada a 37°C. O material flutuante foi retirado a intervalos e analisado por RP-HPLC para PEG-insulina liberada. O tampão foi substituído com PBS novo e a incubação foi continuada. Os dados foram analisados para a liberação cumulativa, como função do tempo de incubação (Figura 4). Menos de 1,0% de PEG-insulina é liberado no primeiro dia e mais de 95% é liberado dentro de 18 dias. A liberação de "descarga" baixa, a liberação total alta e a duração sobre um período de aproximadamente duas semanas são características altamente desejadas de uma formulação de insulina de liberação contínua.

[0069] Outras preparações feitas pelo método do Exemplo 12, usando F5000 com polímeros biodegradáveis diferentes e também usando conjugados de PEG-insulina K5000 e F5000-A também deram valores de liberação de um dia de entre 0 e 7,5% e durações de liberação contínua de até 60 dias.

EXEMPLO 15

Farmacodinâmica e farmacocinética *in vivo* para microesferas de PLGA de PEG-insulina F5000

[0070] PEG-insulina F5000 em microesferas composta de PLGA 45:55 0,15 dl/g IV, grupos terminais ácidos (14,1% de carga de núcleo) foram testados para supressão de glicose para farmacocinética de F5000 em ratos diabéticos. Ratos SD machos (~250 g) foram tornados diabéticos por administração subcutânea de 40 mg/kg de estreptozotocina (Sigma, St. Louis, MO), dissolvida em tampão de citrato isotônico (10 mM, pH 4,5) um dia antes da administração do artigo de teste (Junod, A. et al., J. Clin. Invest., 48: 2129-2139, 1969).

Os animais depois foram tratados com microesferas de PEG-insulina (~11 mg/rato, correspondente a 3 mg de equivalente de insulina/kg de peso corporal), suspensos em 2,5% de carboximetilcelulose estéril (CMC) ou solução salina (controle negativo) e sangue foi retirado em pontos de tempo predeterminados para isolamento e soro e subsequente análise de níveis de glicose (PD) e F5000 (PK). As Figuras 5 e 6 mostram os níveis de glicose no soro e níveis de PEG-insulina no soro sobre um período de 13 dias (os dados são médias +/- SE). A Figura 5 mostra que os níveis de glicose no sangue são de 100% ou acima (dentro do erro de medição) para o controle de ratos diabéticos ao longo da experiência, tal como era esperado. Para os ratos diabéticos tratados com microesferas de PEG-insulina, o nível de glicose no sangue cai para níveis abaixo de 60% dos níveis pré-tratamento, depois de 3 dias, e permanecem suprimidos por mais 7 dias.

[0071] A Figura 6 mostra uma liberação de descarga inicial desprezível ($C_{max}=0,62$ ng/mL) de PEG-insulina, detectada pouco depois ($t = 1$ h) da injeção de microesferas. Depois, a partir de 24 horas pós-injeção, os níveis de PEG-insulina do grupo tratado subiram continuamente ao longo de 2 dias para níveis terapêuticos (~1-3,5 ng/ml), que foram mantidos por aproximadamente 7 dias, enquanto os níveis no soro de F5000 do grupo de controle estavam abaixo dos limites de detecção em todos os momentos. Esses dados, tomados em conjunto, indicam que a atividade biológica do conjugado foi mantida durante o processo de fabricação das microesferas e mantida durante o período de liberação de uma semana após a injeção de microesferas. Significativamente, quantidades similares de liberação de descarga inicial de PEG-insulina foram encontradas nas experiências *in vitro* (Figura 4, <0,5% liberado no primeiro dia) e *in vivo* (Figura 6, $AUC_{0-1d}/AUC_{0-13d}=0,7\%$ de experimentos). Além disso, a avaliação dos dados ilustrados nas Figuras 5 e 6 sugere que existe

uma correlação farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) para esse exemplo.

Equivalentes

[0072] Os que têm experiência na técnica podem reconhecer ou são capazes de determinar, usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes das modalidades específicas da invenção descritas no presente. Pretende-se que esses equivalentes sejam abrangidos e cobertos pelas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar um conjugado de insulina-polímero, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) pôr insulina em contato com um polímero hidrofílico em uma etapa única, na presença de pelo menos um solvente orgânico e pelo menos um quelador metálico em um pH de 5,0 a 7,5, sob condições que promovam a formação de um conjugado da insulina e do polímero, onde a conjugação ocorre predominantemente no resíduo PheB1; e

(b) isolar o conjugado.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína de insulina compreende insulina humana.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o polímero hidrofílico é selecionado do grupo que consiste em polietilenoglicol (PEG), copolímeros de polietilenoglicol/ polipropilenoglicol, glicerol polietoxilado, e derivados lineares, ramificados e reativos a amina dos mesmos.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o conjugado de insulina - polímero é um conjugado de insulina - PEG e o polímero hidrofílico é PEG ou um derivado de PEG linear, ramificado ou reativo a amina.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o derivado reativo a amina é selecionado de um grupo que consiste em um aldeído, uma N-hidróxi succinimida, um carbonato de PNP e um polímero hidrofílico terminado em benzotriazol.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o polímero hidrofílico e a insulina são postos em contato a uma razão molar de 10:1 - 1:1.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o solvente orgânico é

selecionado do grupo que consiste em etanol, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), dioxano, dimetilformamida (DMF) e N-metil-2-pirrolidona (NMP).

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o solvente orgânico está presente em uma concentração de 0,1 a 10%.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a insulina e o polímero hidrofílico são postos em contato em uma concentração de insulina de 0,1 - 5,0%.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o quelador é selecionado do grupo que consiste em queladores de íons metálicos polivalentes, EDTA, deferoxamina (DEF), dietilenotriamina do ácido pentaacético (DTPA) e bis(aminoetil) glicoléter N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA).

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o quelador está presente em uma concentração de 0,1 - 10 mM.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a insulina e o polímero hidrofílico são postos em contato a uma temperatura de 4 - 50°C.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que compreende, ainda, a etapa da interrupção da formação do conjugado, antes de isolar o conjugado.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que compreende, ainda, a etapa de encapsular o conjugado em um polímero biodegradável.

Fig. 1A

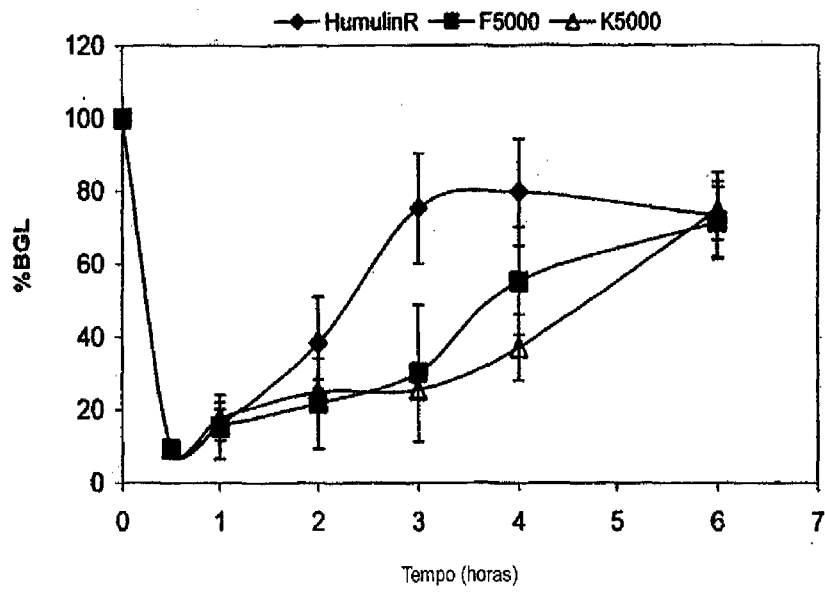


Fig. 1B

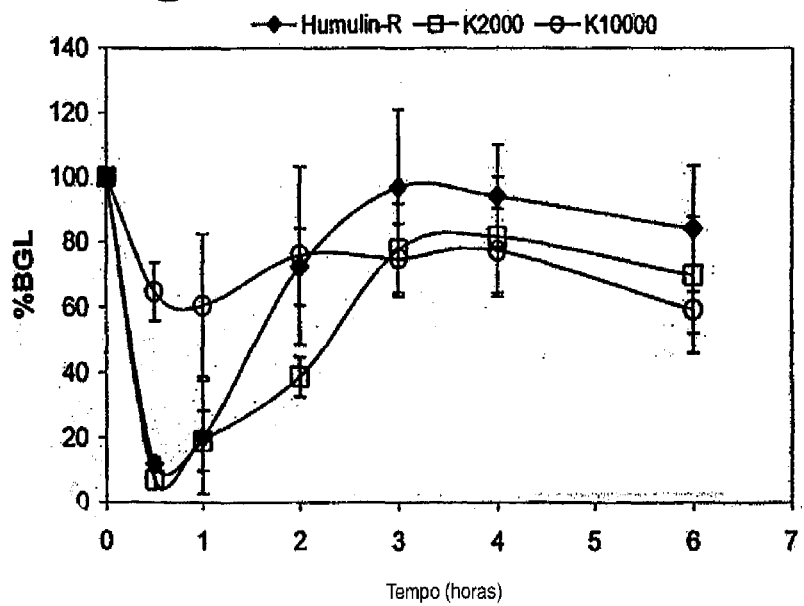


Fig. 2A

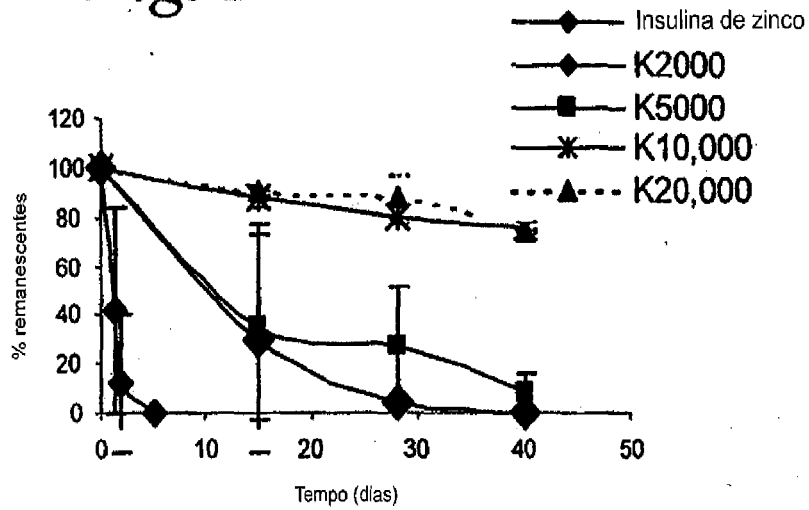


Fig. 2B

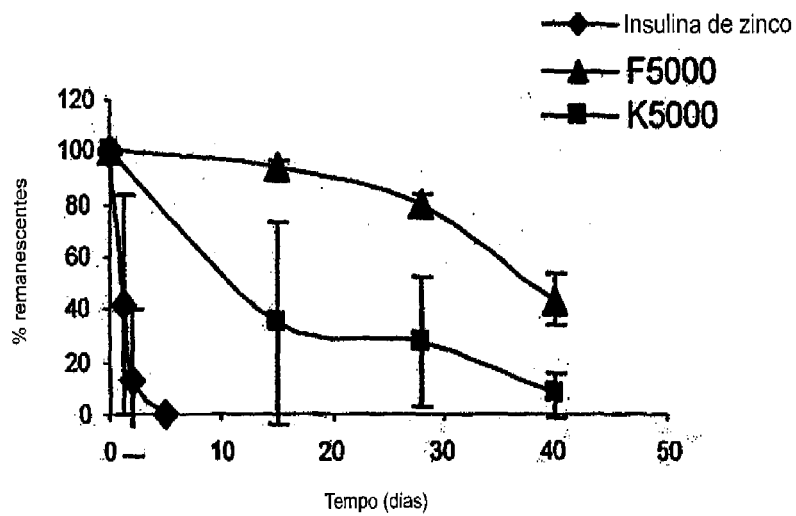


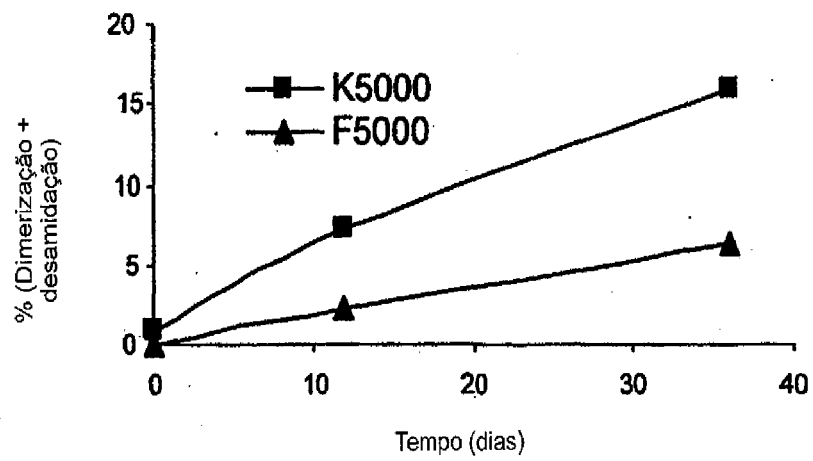
Fig. 3

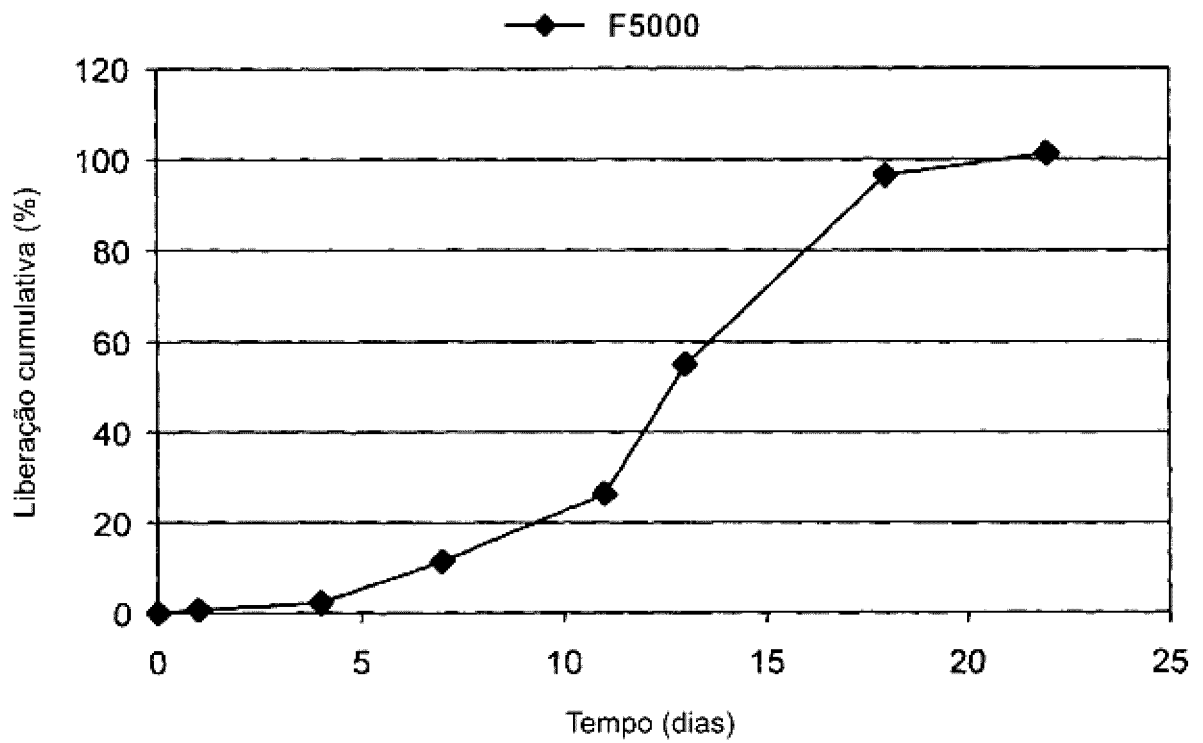
Fig. 4

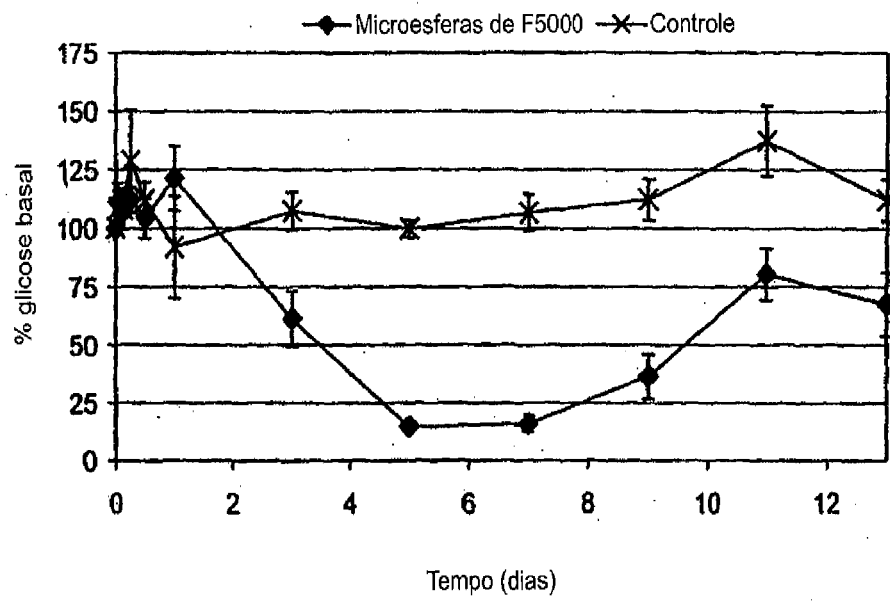
Fig. 5

Fig. 6