

PCT

B.T

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



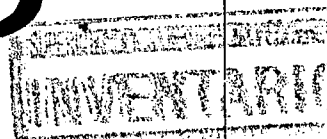
No. 10-160886-00000-0000

Fecha: 2010-12-22 13:07:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130

10-160886

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES



SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: COMPUESTOS DE INSULINA LISPRO PEGILADA

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

DIRECCIÓN: Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 13 Diciembre de 2010

P2010/000170

Com. Traducción Anexos
13-01-2011

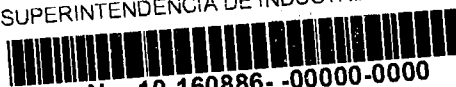
Ni Eren

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160886-00000-0000

Fecha: 2010-12-22 13:07:43
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eva: 379 FASENACIONALI
Folios: 130

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2010/000170

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: ELI LILLY AND COMPANY

Dirección: Lilly Corporate Center,
Indianápolis, Indiana 46285

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Diagonal 34 No. 5-28 Bogotá

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/046704

Fecha

Junio 9, 2009

Publicación Internacional No. WO 2009/152128

Fecha

Diciembre 17, 2009

6

Título (54) COMPUESTOS DE INSULINA LISPRO PEGILADA

Clasificación Internacional (51) A61K 38/28, A61K 47/48

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Junio 13, 2008

Diciembre 10, 2008

(31) Número de Solicitud

61/061,281

61/121,394

9

Comprobante de pago No. 10-

Fecha

Diciembre de 2010



ANEXOS

2



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 08-11087



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



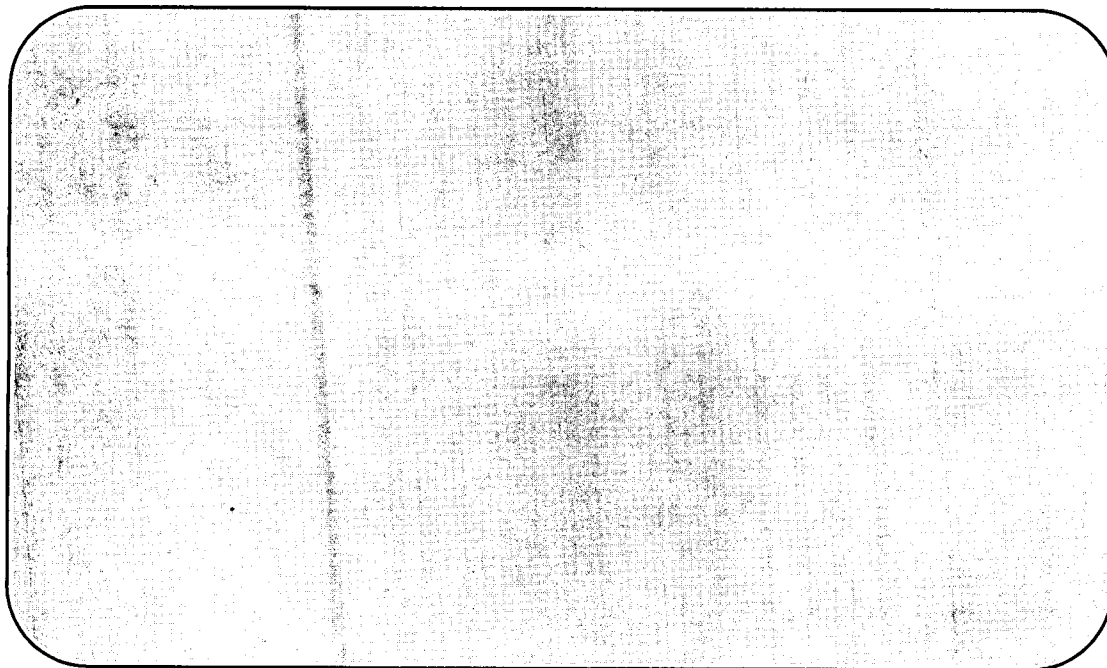
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

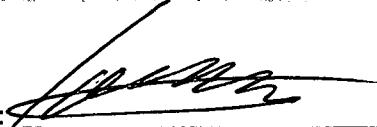


FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2009/046704

3

1. John Michael BEALS,
Eli Lilly and Company,
Lilly Corporate Center,
Indianapolis, IN 46285
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

2. Gordon Butler CUTLER,
Eli Lilly and Company,
Lilly Corporate Center,
Indianapolis, IN 46285
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

3. Brandon DOYLE,
Eli Lilly and Company,
Lilly Corporate Center,
Indianapolis, IN 46285
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

4. Ryan John HANSEN,
Eli Lilly and Company,
Lilly Corporate Center,
Indianapolis, IN 46285
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

5. Shun LI,
Eli Lilly and Company,
Lilly Corporate Center,
Indianapolis, IN 46033
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

6. Shahriar SHIRANI,
Eli Lilly and Company,
Lilly Corporate Center,
Indianapolis, IN 46285
Estados Unidos
Nacionalidad: Canadiense

7. Lianshan ZHANG,
Eli Lilly and Company,
Lilly Corporate Center,
Indianapolis, IN 46285
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

41
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160886- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 13:07:43 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 109,368
FECHA : DICIEMBRE 22 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
DLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	387590405	22/12/2010	4,986,000.00

***** CONCEPTO *****

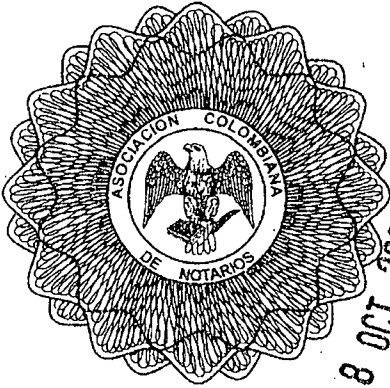
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
TOTAL :			\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

WK 9397304



28 OCT. 2008

ESCRITURA PUBLICA NUMERO : (1 2 2 7)

MIL DOSCIENTOS VEINTISIETE

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, a los Veintiocho -- (28) días del mes de Octubre -- -- del año dos mil ocho (2008), ante mi MARIA EUGENIA

ROJAS DE URUETA NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL CIRCULO DE BOGOTA, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos:-----

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACION DE PODER.-----

JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS Y CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA.-----

C.C. No. 79.376.996 Y 79.782.747.-----

Comparecieron JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS, mayor de edad vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.376.996 de estado civil casado con sociedad conyugal vigente y CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA, mayor de edad, vecino de Bogotá, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.782.747, de estado civil casado con sociedad conyugal vigente, obrando en sus propios nombres y dijeron:-----

PRIMERO.- Que presentan para su protocolización y custodia en los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta escritura corresponda, en cinco (5) folios autenticados, un poder y sus traducciones, los cuales son del siguiente tenor:-----

PODER-----

El suscrito ELI LILLY AND COMPANY, domiciliado en Lilly Corporate Center, Indianápolis, Indiana 46285 US por medio del

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

presente otorga a Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri, poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de patentes, modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial o extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones y demandas que por motivo de encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultades para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.-----

Firma (ilegible) -----

Fecha 17 July 2003 -----

City, Country/ Ciudad, País: Indianápolis, Indiana, United Status of America.- -----

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia.- -----

APOSTILLA EN PODER DE DE REPRESENTACION DE ELI LILLY
AND COMPANY.

Bilingüe inglés- español otorgado en Indianapoles, Indiana, Estados Unidos el 17 de julio de 2003 y firmado por Meter G. Stringer, Director Ejecutivo y patentes Internacionales de Ely Lilly & Company.- -----

Todd Rokita Secretario de Estado -----

Secretario de Estado de Indiana Estado de Indiana -----

APOSTILLA

(Convencion de la Haya del 5 octubre 1961)

WK 9397305



1. País: Estados Unidos de América-
este documento público -----
2. Ha sido firmado por: Catherine Michel
3. Quien ejerce funciones de Secretario
de la Corte del Circuito en y para el
condado Jonson -----
- 4 Lleva el sello del Secretario de la Corte

del Circuito en y para el estado de Indiana -----

Certificado

5. En: Indianapoles, Indiana -----
6. El: 22 de julio de 2003.-----
7. Por el Secretario de Estado de Indiana 8 No. A2003-1279-----
9. Gran Sello del Estado de Indiana -----
10. Firma ilegible de Todd Rokita- Secretario de Estado de Indiana
- * Vigente desde el 1 de mayo de 2003, todas las apostillas de
Secretario y de Estado de Indiana tienen el sello impreso
electrónicamente.-----
- The Statehouse, Indianapoles, Indiana 46204, (307) 232-6531, fax
(317) 233-3283-----

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 17 de julio de 2003 el suscrito notario
Catherine Michel certifica que Meter G. Stringer, domiciliado en
7620 Castleton Faros, West Drive Indianápolis, Indiana- 46256
Estados Unidos ejercía funciones de Director Ejecutivo y Patentes
Internacionales de Ely Lilly & Company, con sede en Indianápolis,
Indiana, Estados Unidos..-----

MARLEN NEIRA CASTRO Traductor e Intérprete Oficial inglés-
Español- Inglés-----

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987.- -----

El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento:
Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de
Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité Ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.-----

Firma del notario público Catherine Michel certifica sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008- residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana.-----

Es traducción fiel de inglés, con copia archivo para confrontación, Bogotá 28 de julio-2003.-----

MARLEN NEIRA CASTRO Traductor e Intérprete Oficial Inglés-Español- Inglés -----

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987.-----

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaría para que de su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

Se advierte que la protocolización de documentos no da mayor fuerza o autenticidad de la que tienen dichos documentos.-----

Esta escritura pública fue firmada fuera del Despacho Notarial, de conformidad con el artículo 12 del Decreto 2.148 de 1.983. -----

Se advirtió a los otorgantes de esta escritura de la obligación que tienen de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados, con el fin de aclarar, modificar o corregir lo pertinente antes de firmarla, la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto, en consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por errores o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma de (el, los) otorgante(s) y de la notaría, en tal caso, este (os) debe(n) ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por todos los que intervinieron en la inicial y sufragada por los mismos (artículo 35, decreto ley 960 de 1970).-----



ELI LILLY AND COMPANY

Todd Rokita Secretario de Estado

Secretario de Estado de Indiana Estado de Indiana

(Convención de la Haya del 5 de octubre de

1. País: Estados Unidos de América- Este documento Público
2. ha sido firmado por Catherine Michel
3. Quien ejerce funciones de Secretario de la Corte del Circuito en y para el condado Johnson
4. Lleva el sello del Secretario de la Corte del Circuito en y para el estado de Indiana

CERTIFICADO

5. En Indianapolis, Indiana 6. El 22 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado de Indiana 8. No. A2003- 112
9. Gran Sello del Estado de Indiana
10. Firma legible de Todd Rokita- Secretario de Estado de Indiana

* Vigente desde el 1 mayo de 2003, todas las apostillas del Secretario de Estado de Indiana tienen el sello impreso electrónicamente.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, fax (317) 233-3283

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 17 de julio de 2003 el suscrito notario Catherine Michel certifica que Peter G. Stringer, domiciliado en 7620 Castleton Farms, West Drive, Indianapolis, Indiana - 46256 Estados Unidos ejercía funciones de Director Ejecutivo y Patentes Internacionales de Ely Lilly & Company, con sede en Indianapolis, Indiana, Estados Unidos.

Marlen Neira Castro
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento: Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.

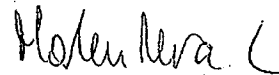
Firma del notario público Catherine Michel certifica

Sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008 - residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana

--
Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 28 de julio-2003.

Marlen Neira C



MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

ELI LILLY AND COMPANY

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 US

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents, Utility Models and Industrial Designs** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de **Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma

Date/Fecha: 17 July 2003

City/Country/Ciudad,País: Indianapolis, Indiana, United States of America

NOTARIA VERIFICABLE
Hacienda - Bogotá, D.C. - Oficina de Notarías



Todd Rokita
Secretary of State

SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA

APOSTILLE

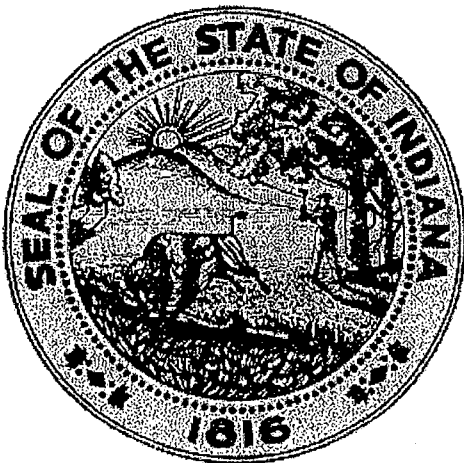
(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Catherine Michel*
3. acting in the capacity of circuit court clerk in & for *Johnson County*
4. and bears the seal/stamp of circuit court clerk in & for the State of Indiana

Certified

5. at Indianapolis, Indiana
6. this *Twenty-second day of July, 2003*
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. A2003- 11279
9. Seal/Stamp:

10. Signature:




Todd Rokita

Indiana Secretary of State

*Effective May 1, 2003 all apostilles from the Indiana Secretary of State will have an electronically printed seal.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, Fax (317) 233-3283

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,

17 July 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

7620 Castleton Farms, West Drive, Indianapolis, Indiana 46256 US
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Executive Director, International
Patents

of ELI LILLY AND COMPANY

3. That ELI LILLY AND COMPANY
having its principal place of business located in
Indianapolis, Indiana, United States of
America

is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Delegation of Authority Concerning Certain
Patent Matters, executed January 20, 2003;
pursuant to the authority granted to the
General Counsel of the Company by the
executive Committee of the Board of
Directors of Eli Lilly and Company

NOTARY PUBLIC (Signature):



Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

Peter G. Stringer

mayor de edad y domiciliado
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de

de

4. Que

con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

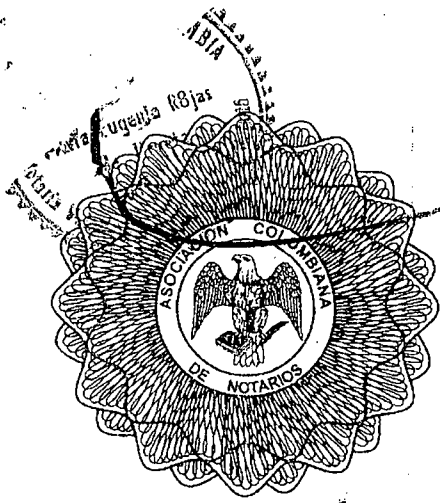
4. Que el otorgante tiene la representación para
suscibir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

Notario Eugenio Rojas de la Huelga

Catherine Michel
Catherine Michel
My Commission Expires October 21, 2008
Resident of Johnson County

WK 9397306



ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y
AUTORIZACION.- Leído el presente
instrumento por el (los) compareciente
(s) y advertido (s) sobre las
formalidades legales, lo aprueban y
firman conmigo y ante mí la(el)
Notaria(o) quién lo autoriza. ---Se

utilizaron las Hojas de papel Notarial Nos. WK 9397304, WK 9397305 Y
WK 9397306 .

DERECHOS LEGALES: \$ 39.630.00

RESOLUCION 8850 DE 2007

IVA \$ 10.781.00

James Ian Raisbeck Llínas

JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS

C.C.No. 79.376.996 BOGOTA

TEL: 601-7700

Carlos Reinaldo Olarte Garcia

CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA

C.C.No. 79.782.747 BOGOTA.

TEL: 601-7700

Maria Eugenia Rojas de Urue

MARIA EUGENIA ROJAS DE URUE

NOTARIA(O) VENTISIETE (27) DE BOG

redb.



ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

Es fiel y Segunda (2ª)
fotocopia de la Escritura Pública No. 1227
de fecha 28 de Octubre de 2008
tomada de su original que expido en
Ses (6) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 28 OCT 2008
El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá



ESPACIO EN BLANCO

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 December 2009 (17.12.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/152128 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 38/28 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/046704

(22) International Filing Date:
9 June 2009 (09.06.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/061,281 13 June 2008 (13.06.2008) US
61/121,394 10 December 2008 (10.12.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ELI LILLY AND COMPANY [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BEALS, John, Michael [US/US]; Eli Lilly And Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US). CUTLER, Gordon, Butler [US/US]; Eli Lilly And Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US). DOYLE, Brandon [US/US]; Eli Lilly And Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US). HANSEN, Ryan, John [US/US]; Eli Lilly And Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US). LI, Shun [US/US]; Eli Lilly And Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46033 (US). SHIRANI, Shahriar [CA/US]; Eli Lilly And Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US). ZHANG, Lianshan [US/US];

Eli Lilly And Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(74) Agents: SHARP, Robert, L. et al.; Eli Lilly And Company, Patent Division, P.O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

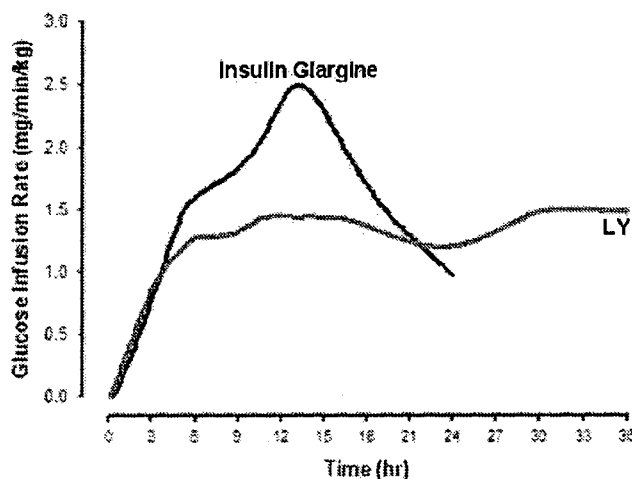
Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

[Continued on next page]

(54) Title: PEGYLATED INSULIN LISPRO COMPOUNDS

Figure 2



(57) Abstract: The present invention relates to the field of diabetes. More particularly, the invention relates to PEGylated insulin lispro compounds that are PEGylated with high molecular weight poly(ethylene glycol), are highly soluble at physiological pH, have an extended duration of action, and characterized by pharmacokinetic, pharmacodynamic, and/or activity peak-trough ratios of less than 2. The invention also relates to methods of providing such molecules, to pharmaceutical compositions containing them, and to their therapeutic uses.

WO 2009/152128 A1

12

-1-

PEGYLATED INSULIN LISPRO COMPOUNDS

The present invention relates to the field of diabetes. More particularly, the invention relates to PEGylated insulin lispro compounds that are highly soluble and have an extended profile of action, to methods of providing such molecules, to pharmaceutical compositions containing them, and to the therapeutic use of such compounds.

In order to achieve normal glycemia, insulin replacement therapy is designed to parallel as closely as possible the pattern of endogenous insulin secretion in normal individuals. The daily physiological demand for insulin fluctuates and can be separated into two phases: (a) the absorptive phase requiring a pulse of insulin to dispose of the meal-related blood glucose surge, and (b) the post-absorptive phase requiring a sustained amount of insulin to regulate hepatic glucose output for maintaining optimal fasting blood glucose. Accordingly, effective insulin therapy for diabetics generally involves the combined use of two types of exogenous insulin formulations: a rapid-acting, mealtime insulin provided by bolus injections, and a longer-acting insulin, administered by injection once or twice daily to control blood glucose levels between meals.

Currently available insulin replacement therapies are deficient in one or more clinically important aspects. For example, traditional intermediate- and long-acting insulin formulations, such as the basal insulin analog, insulin detemir, possess a duration of activity that is insufficient to provide basal glucose control for a full day when administered daily. As a result, the duration of action of basal insulin is oftentimes insufficient to adequately control hyperglycemia and, more specifically, post-absorptive phase requirements, with a single daily injection. Furthermore, the omission of a single injection of the current therapies can lead to significant increase in "peak-to-trough" levels of the drug resulting in impaired glucose control. Moreover, the utilization of insolubility strategies to prolong insulin release in traditional intermediate- and long-acting insulin formulations, e.g., crystalline suspensions of Neutral Protamine Hagedorn (NPH) insulin and ULTRALENTE[®], or the *in vivo* precipitation strategy of insulin glargine, increase intra-injection variability resulting in increased variability in the dose-response profile. More specifically, NPH and ULTRALENTE[®] suspensions require mechanical mixing to insure product uniformity, have increased intra-subject variability, and tend to peak rather than provide an ideal "flat" pharmacodynamic profile necessary to maintain optimal fasting blood glucose for an extended period of time between meals. Therefore, insulin formulations that rely on an insoluble state to protract insulin payout are inherently less predictable than soluble formulations and result in less than adequate control of blood glucose and a greater susceptibility to life-threatening hypoglycemic

-2-

episodes. Additionally, modern basal insulin analogs are not readily mixable with rapid- or immediate-acting insulin formulations. Thus, current insulin replacement therapies still leave diabetic patients susceptible to life-threatening hypoglycemic episodes, the serious long-term medical complications of diabetes and/or impose considerable
5 inconvenience and quality-of-life disadvantages to the patient.

United States Patent No. 4,179,337 entitled "Non-Immunogenic Polypeptides" discloses insulin conjugated to linear PEG molecules having a molecular weight of between about 500 and about 20,000 Da. Hinds and Kim disclosed insulin conjugated with low molecular weight (600 Da, 750 Da, and 2000 Da) monomethoxypoly(ethylene glycol) (Hinds, K.D., and Kim, et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:505-530
10 (2002)). In that article, the authors stated that they restricted their study to low-molecular weight mPEG insulin conjugates "because the attachment of higher-molecular-weight mPEG (5000 Da) was [previously] found to considerably depress the conjugate's bioactivity." PCT International Patent Application Publication No. WO 2006/079641
15 discloses the conjugation of insulin derivatives, including insulin lispro, with small branched polymers. PCT International Patent Application Publication No. WO 2004/091494 discloses, inter alia, insulin molecules conjugated to linear and branched PEG molecules having a total molecular weight of PEG up and about 10 kDa and about 20 kDa, respectively. PCT International Patent Application Publication Nos. WO
20 2008/015099 (published 7 February 2008) and WO 2008/084051 (published 17 July 2008) disclose, inter alia, various insulin analogs conjugated to PEG molecules having a nominal molecular weight in the range from about 200 to about 40,000 Da.

Clearly, there still exists a critical need for long-lasting insulins that are better suited for basal insulin replacement regimens. In particular, soluble basal insulins that
25 are mixable with prandial insulin formulations, have extended time-action profiles (i.e., able to adequately control blood glucose levels with an once-daily or less frequent injection), flatter activity, pharmacokinetic profiles (i.e., lower "peak-to-trough" ratios), reduced intra-patient variability (i.e., more predictable time-action profile translating into reduced incidence of hypoglycemia and/or weight gain) and/or lesser injection site
30 irritation or pain upon injection are needed.

We report here the discovery that insulin lispro can be PEGylated with high molecular weight poly(ethylene glycol) derivatives to provide PEGylated insulin lispro compounds that have therapeutically effective basal insulin activity, extended time-action profiles, are highly soluble at physiological pH, and/or are mixable with other commonly
35 used prandial insulin formulations.

The present invention provides a compound of Formula I:

P-[(A)-(B)], or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:

13

-3-

A is the A-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 1);

B is the B-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 3); and

P is a PEG having a molecular weight in the range from about 20 kDa to about 40 kDa, and wherein the A and B are properly cross-linked and P is attached either
5 directly or indirectly via a covalent bond to the alpha-amino group of the glycine at position 1 of A, the alpha-amino group of the phenylalanine at position 1 of B, or the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of B.

The present invention also provides compositions comprising a plurality of mono- and di-PEGylated insulin lispro compounds wherein greater than about 75% of the
10 PEGylated insulin lispro compounds in the composition are mono-PEGylated compounds of Formula I.

The present invention also provides compositions comprising mono-PEGylated insulin compounds of Formula I wherein greater than about 50% of the mono-PEGylated compounds in the composition have a PEG covalently attached either directly or
15 indirectly to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain.

The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a PEGylated insulin lispro of Formula I and one or more pharmaceutically acceptable preservatives, isotonicity agents, metal ions, or buffers. In certain embodiments of the invention, pharmaceutical compositions comprising a PEGylated insulin lispro of
20 Formula I and one or more pharmaceutically acceptable preservatives, isotonicity agents, metal ions, or buffers further comprise a therapeutically effective amount of an insulin analog.

The present invention also provides methods of treating hyperglycemia, diabetes mellitus or gestational diabetes comprising administering to a patient a therapeutically
25 effective amount of a pharmaceutical composition comprising a PEGylated insulin lispro compound of the present invention.

The present invention also includes the use of a PEGylated insulin lispro compound of the present invention for therapy.

The present invention also includes the use of a PEGylated insulin lispro
30 compound of the present invention for the manufacture of a medicament for the treatment of hypoglycemia, diabetes mellitus, or gestational diabetes.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

35 Figure 1 graphically depicts simulated human PK profiles for 20 kDa PEG-B28-insulin lispro, 40 kDa-PEG-B28-insulin lispro, and insulin detemir, based on allometric

-4-

scaling of PK parameters from rats and dogs. Profiles represent one dosing interval following a week of dosing. Numbers are mean peak-trough ratios.

Figure 2 is a graph of glucose infusion rates (GIR) in humans after a subcutaneous dose of either PEG_{20kDa}-B28($\geq 95\%$)/A1($\leq 5\%$)-insulin lispro (LY; 0.225 mg/kg) or insulin glargine (0.5 U/kg). The GIR profiles are based on observed data and a "loess smooth" (Splus 2000, Professional Edition, MathSoft, Inc) function developed within Lilly Research Laboratories was used to fit the observed data.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

10

The following abbreviations are used herein: ACN: Acetonitrile. Boc: *tert*-Butoxycarbonyl. BSA: bovine serum albumin. DCM: dichloromethane, methylenechloride. DMF: *N,N*-dimethylformamide. DMSO: Di-methyl sulphoxide. DTT: Dithiothreitol. EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid. Et: Ethyl. EtOH: Ethanol. Fmoc: 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl. HCl: Hydrochloric acid. Da: Dalton. kDa: kilodalton. Lilly: Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN). mAb: monoclonal antibody. Me: Methyl. MeOH: Methanol. PBS: phosphate-buffered saline. RP-HPLC: reversed-phase high-performance liquid chromatography. SEC: size-exclusion chromatography. SEM: standard error of the mean. SPA: scintillation proximity assay. TFA: trifluoroacetic acid. All amino acid abbreviations used in this disclosure are those accepted by the United States Patent and Trademark Office as set forth in 37 C.F.R. § 1.822(B)(2).

The term "insulin" is intended to encompass wild-type insulin from any species including, but not limited to, porcine insulin, bovine insulin, and human insulin. Native or wild-type insulin refers to insulin having an amino acid sequence corresponding to the amino acid sequence of insulin as found in nature. Polynucleotide and amino acid sequences encoding insulin from a number of different species are well known to those of ordinary skill in the art. For example, human insulin has a twenty-one amino acid A-chain and a thirty amino acid B-chain (SEQ ID NOS: 1 and 2, respectively). Insulin can be natural (i.e., isolated from a natural source), biosynthetically, or synthetically produced. The term "insulin" is also intended to include any insulin derivative and/or insulin analog.

An "insulin analog" or "insulin derivative" is defined herein as protein having insulin activity and substantially the same amino acid sequence as human insulin but differing from human insulin by a modification relative to human insulin including one or more amino acid substitutions, deletions, inversions, or additions. Such compounds are well known in the art. See, e.g., PCT International Patent Application Publication Nos.

NA

-5-

WO 96/15804 and WO 03/053339; U.S. Patent Nos. 3,528,960, 5,514,646, 5,618,913, 5,750,497, 6,011,007, 6,251,856; and EP Patent Nos. 254,516 and 280,534. An exemplary but non-exhaustive list of insulin analogs known to one skilled in the art includes insulin aspart, insulin lispro, insulin glargine, insulin detemir, and insulin glulisine. Furthermore, the term "insulin" herein also covers compounds which can be considered as being both an insulin derivative and an insulin analog. Examples of such compounds are described in the U.S. Patent Nos. 5,750,497, and 6,011,007. A specific example of such a compound known to one skilled in the art is insulin detemir.

Various insulin analogs and/or derivatives are known to be "fast-acting" or "rapid-acting" insulin analogs. The terms "fast-acting" and "rapid-acting" are used interchangeably herein. A "rapid-acting insulin analog" produces a prandial glucose effect that (a) begins sooner after subcutaneous administration than human insulin, and/or (b) exhibits a shorter duration of action than human insulin after subcutaneous administration. Exemplary fast-acting insulin analogs include "monomeric insulin analogs" that are fast-acting because they are generally less prone to dimerization or self-association under physiological conditions. Monomeric insulin analogs are known in the art. See, e.g., U.S. Patent No. 5,700,662, and European Patent No. 214 826. Insulin lispro is a rapid-acting, monomeric insulin analog in which the proline at position 28 of the wild-type insulin B-chain (SEQ ID NO: 2) and the lysine at position 29 of the wild-type insulin B-chain (SEQ ID NO: 2) have been switched. Accordingly, insulin lispro is known in the art by various designations including, but not limited to, Lys^{B28}Pro^{B29} - human insulin, LysB28ProB29-human insulin, and B28Lys, B29Pro human insulin.

The term "cross-linked" means disulfide bonds exist between cysteine residues. For instance, properly cross-linked human insulin contains a disulfide bond between the cysteine at position 7 of SEQ ID NO: 1 and the cysteine at position 7 of SEQ ID NO: 2, between the cysteine at position 20 of SEQ ID NO: 1 and the cysteine at position 19 of SEQ ID NO: 2, and between the cysteine at position 6 of SEQ ID NO: 1 and the cysteine at position 11 of SEQ ID NO: 1. Similarly, a properly cross-linked insulin lispro compound contains a disulfide bond between the cysteine at position 7 of SEQ ID NO: 1 and the cysteine at position 7 of SEQ ID NO: 3, between the cysteine at position 20 of SEQ ID NO: 1 and the cysteine at position 19 of SEQ ID NO: 3, and between the cysteine at position 6 of SEQ ID NO: 1 and the cysteine at position 11 of SEQ ID NO: 3.

As used herein, "PEG conjugated insulin lispro" or "PEGylated insulin lispro" refers to human insulin lispro or a derivative thereof covalently attached to at least one PEG and possessing insulin activity *in vivo*.

The biological activities of insulin and insulin lispro are well-established. The phrase "insulin activity" with respect to a PEGylated insulin lispro compound of the

-6-

present invention is intended to mean the ability to significantly lower blood glucose levels in at least one generally accepted *in vivo* animal model including, but not limited to, the animal models of Type 1 and Type 2 diabetes described below in Example 5 and Example 6, respectively. Therefore, insulin activity includes the ability of a PEGylated insulin lispro compound to lower blood glucose to a level of 100 mg/dL or below in a STZ-treated rat for a period ranging from about 4 hours to at least about 36 hours after a single subcutaneous injection at a dose of 568 nmol/kg.

The term "polyethylene glycol" or "PEG" refers to a polyalkylene glycol compound or derivative thereof, with or without coupling agents or derivatization with coupling or activating moieties. In its typical form, PEG is a linear polymer with terminal hydroxyl groups and has the formula $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$. The number of repeating subunits "*n*" in the PEG is approximated for the molecular mass described in Daltons. Typically, PEG reagents used to prepare PEGylated compounds comprise a heterogenous mixture of PEGs having a different number (*n*) of ethylene glycol subunits in the PEG polymer. A single ethylene glycol subunit ($\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}$) of PEG has a molecular weight of about 44 Daltons. Therefore, the molecular weight of the PEG polymer depends on the number (*n*). The PEGs attached to the PEGylated insulin lispro compounds of the present invention will have *n* in the range from about 400 to about 1000 subunits. Preferably, the PEGs attached to the PEGylated insulin lispro compounds of the present invention will have *n* in the range from about 400 to about 750. More preferably, the PEGs attached to the PEGylated insulin lispro compounds of the present invention will have *n* in the range from about 400 to about 550. Most preferably, the PEGs attached to the PEGylated insulin lispro compounds of the present invention will have *n* of about 400 and about 500.

Numerous derivatives of PEG and methods for making them and conjugating them to a protein such as insulin or insulin lispro are known in the art and are suitable for use in the present invention. *See, e.g.*, PCT International Patent Application Pub. Nos. WO 01/62827, WO 2006/028745, WO 2006/096535, WO 2006/036825; Zalipsky, S. *Bioconjugate Chem.* 6:150-165, 1995; Veronese, et al., *Applied Biochem. and Biotech.* 11:141-152, 1985; and Roberts, M. et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:459-476, 2002. One particularly preferred PEG for use in the invention is a PEG having one end of the polymer terminating with a relatively inert group, such as a lower C_{1-6} alkoxy group. Preferably, the PEG is a monomethoxy-PEG (commonly referred to as mPEG), which is a linear form of PEG wherein one terminus of the polymer is a methoxy (-OCH_3) group. Even more preferably, the PEG used in the invention is an "activated mPEG" in which one end of the linear PEG terminates with a methoxy group and the other end terminates with a reactive group appropriate for coupling to a desired site on insulin lispro or on an

15

-7-

insulin lispro derivative derivatized in order to facilitate PEGylation with a desired activated mPEG at a specific site of the insulin lispro molecule.

Because PEGs are typically generated and used as mixtures of PEG compounds varying to some degree in their molecular weight, one of ordinary skill in the art generally describes the molecular weight of a PEG attached to a compound by describing the average size of the PEG reagent used in the PEGylation reaction that generated the particular PEGylated compound. Among the many possible ways of reporting averages, three are commonly used: the number average, weight average, and z-average molecular weights. As used herein, the phrase "average molecular weight" is intended to refer to the weight-average molecular weight which can be measured using techniques well-known in the art including, but not limited to, matrix-assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, gel permeation chromatography or other liquid chromatography techniques, light scattering techniques, ultracentrifugation and viscometry. The formula for calculating weight average molecule weight may be represented as $\sum(M_i^2 N_i) / \sum(M_i N_i)$ where N_i is the mole-fraction (or the number-fraction) of molecules with molecular weight M_i in the mixture. The formula for calculating number average molecule weight may be represented as $\sum(M_i N_i) / \sum(N_i)$ where N_i is the mole-fraction (or the number-fraction) of molecules with molecular weight M_i in the mixture. The ratio of weight average molecular weight and number average molecular weight is known as the polydispersity index (PDI), and provides a rough indication of the breadth of the distribution. The PEG reagents suitable for preparing the PEGylated insulin lispro compounds of the invention are typically polydisperse (i.e., number average molecular weight and weight average molecular weight of the polymers are not equal). Preferably, the PDI for PEG reagents used to prepare the compounds or compositions of the present invention is less than about 1.1. More preferably, the PDI for PEG reagents used to prepare the compounds or compositions of the present invention is less than about 1.05.

With respect to the PEGylated insulin lispro compounds of the present invention the PEG covalently attached to an insulin lispro molecule has a molecular weight in the range from about 17.5 kDa to about 40 kDa (n is in the range from about 400 to about 1000) or the PEG has an average molecular weight of about 17.5 kDa and about 40 kDa. Preferably, the PEG covalently attached to an insulin lispro molecule has a molecular weight in the range from about 20 kDa to about 30 kDa (n is in the range from about 450 to about 750) or the PEG has an average molecular weight from about 20 kDa to about 30 kDa. More preferably, the PEG covalently attached to an insulin lispro molecule has a molecular weight in the range from about 17.5 kDa to about 25 kDa (n is in the range from about 400 to about 550) or the PEG has an average molecular weight of about 17.5

-8-

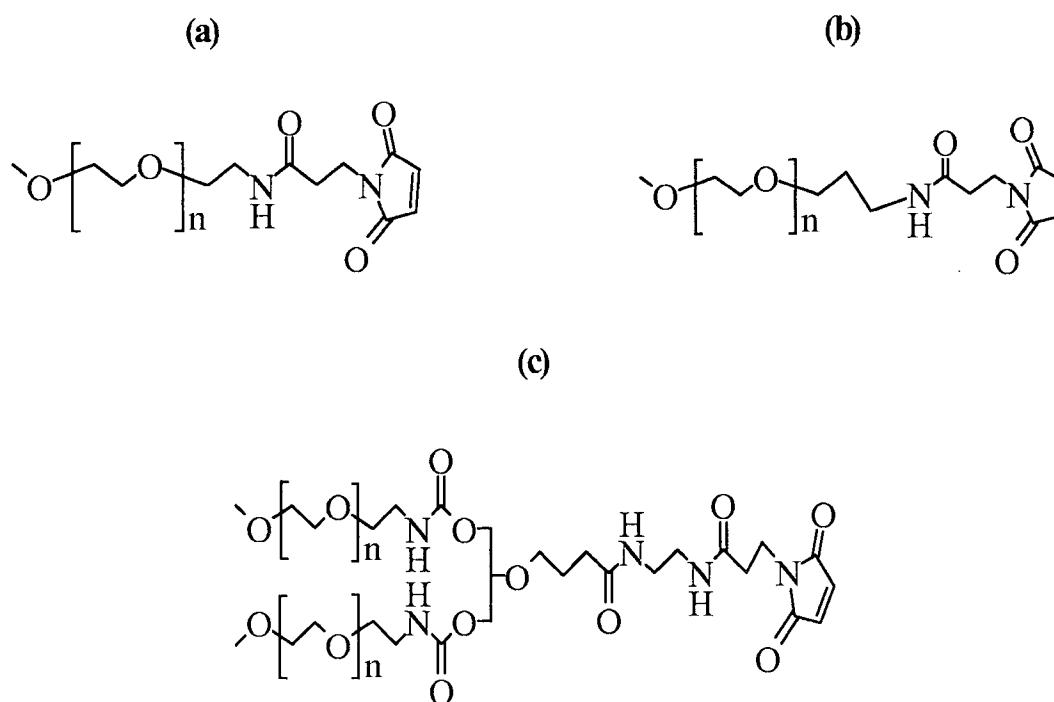
kDa and about 25 kDa. Most preferably, the PEG covalently attached to an insulin lispro molecule has a molecular weight in the range from about 17.5 kDa to about 20 kDa (n is in the range from about 400 to about 500) or the PEG has an average molecular weight from about 17.5 kDa to about 20 kDa.

5 In certain embodiments, the PEGylated insulin lispro compounds of the present invention are prepared by covalently attaching an activated mPEG of a desired average molecular weight to insulin lispro. The reaction conditions for PEGylating insulin lispro will vary depending upon the particular PEG employed, the site of attachment on the insulin lispro, the particular type of reactive group on the insulin lispro that is the target
10 for attachment, the desired degree of PEGylation, and the like, and can readily be determined by one skilled in the art. Optimized experimental conditions for a particular PEGylation strategy can readily be determined, typically by routine experimentation, by one skilled in the art.

 In preferred embodiments, the PEGylated insulin lispro compounds of the present
15 invention are prepared by indirectly conjugating an activated mPEG that is relatively thiol-selective such as a mPEG-maleimide (mPEG-MAL) or a mPEG-thiol (mPEG-SH) to insulin lispro by conjugating the thiol-selective activated mPEG to a thiol functionality that has been introduced into insulin lispro using "amine-to-thiol" modifiers such as N-succinimidyl-S-acetylthiopropionate (SATP) and N-succinimidyl-S-acetylthioacetate
20 (SATA). More preferably, the activated mPEG employed to covalently attach a PEG to a thiol (sulfhydryl) group on insulin lispro is a mPEG-maleimide such as (a), (b), or (c) shown below.

16

-9-



A preferred method of preparing PEGylated insulin lispro compounds of the present invention utilizes Michael addition to form a stable thioether bond. The reaction is highly specific and takes place under mild conditions in the presence of other functional groups. For example, mPEG-maleimide is useful as an activated mPEG for preparing PEGylated insulin lispro conjugates of the present invention. Preferably, the PEGylation procedure uses a molar excess of a thiol-derivatized insulin lispro relative to mPEG-maleimide to drive the reaction to completion. Preferably, the reactions are also performed between pH 4.0 and 9.0 at room temperature for 1 to 40 hours. The excess of unPEGylated thiol-containing peptide is readily separated from the PEGylated product by conventional separation methods. Exemplary conditions required for PEGylation of insulin lispro using activated mPEG-maleimide are described in Example 1.

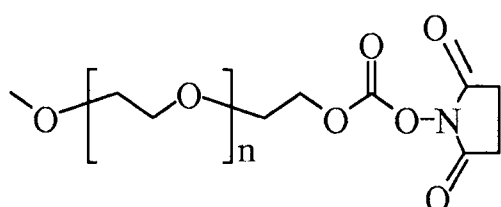
In certain embodiments, the PEGylated insulin lispro compounds of the present invention are prepared by conjugating an activated mPEG that is relatively specific for amines. Activated mPEGs suitable for primarily amine specific PEGylation of insulin lispro include mPEG-succinimidyl propionate (mPEG-SPA), mPEG succinimidyl butanoate (mPEG-SBA), mPEG-succinimidyl α -methylbutanoate (mPEG-SMB), mPEG-succinimidyl carbonate (mPEG-SC), mPEG-benzotriazole carbonate, and mPEG-p-nitrophenyl carbonate (mPEG-NPC).

In preferred embodiments of the invention, the activated mPEGs used for PEGylation of insulin lispro result in an insulin lispro covalently attached to a mPEG

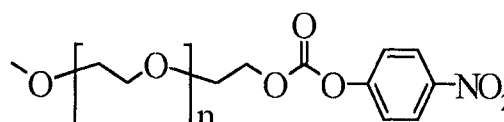
-10-

through a hydrolytically stable covalent bond, such as an amide, urethane (also known as a carbamate), amine, thioether (also known as sulfide), or urea (also known as carbamide) bond. More preferably, the activated mPEG used for PEGylation of insulin lispro is mPEG-SC or mPEG-NPC, both of which result in an insulin lispro being covalently attached to the PEG through a urethane (or carbamate) bond. Exemplary conditions useful for PEGylation of insulin lispro using mPEG-NPC of various molecular weights are set forth in Example 2.

mPEG-SC:



mPEG-NPC:



The PEGylated insulin lispro compounds of the invention are typically purified using one or more purification techniques such as ion exchange chromatography, size exclusion chromatography, affinity chromatography, hydrophobic interaction chromatography, and/or reversed-phase chromatography. The overall heterogeneity of PEGylated insulin lispro compounds (number and proportion of PEGylated insulin lispro compounds generated from a PEGylation reaction) in a sample can be assessed using one or more of the following methods: chromatography, electrophoresis, mass spectrometry, and in particular, MALDI-MS, and NMR spectroscopy.

The insulin lispro used to prepare the PEGylated insulin lispro compounds of the present invention may be prepared by any of a variety of recognized peptide synthesis techniques including solution-phase methods, solid-phase methods, semi-synthetic methods, and recombinant DNA methods. For example, U.S. patent No. 5,700,662 (Chance, et al.) and European Patent No. 214 826 (Brange, et al.), disclose the preparation of various insulin analogs. The A- and B- chains of insulin lispro may also be prepared via a proinsulin-like precursor molecule using recombinant DNA techniques. In preferred embodiments, a proinsulin-like precursor is used to make the insulin lispro used to make the PEGylated insulin lispro of the present invention.

The present invention provides a compound of Formula I:

P-[(A)-(B)], or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:

A is the A-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 1);

B is the B-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 3); and

17

-11-

P is a PEG having a molecular weight in the range from about 17.5 kDa to about 40 kDa, and wherein A and B are properly cross-linked and P is attached either directly or indirectly via a covalent bond to the alpha-amino group of the glycine at position 1 of the A-chain, the alpha-amino group of the phenylalanine at position 1 of the B-chain, or the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain. Preferred compounds of the invention are those in which (a) P is covalently attached to insulin lispro via a urethane or thioether bond; and (b) the compound is characterized by having a K_i for human insulin receptor of about 30 nM, about 20 nM, about 10 nM, or about 5 nM or less, an elimination half-life greater than about 6 hours, about 8 hours, about 10 hours, about 12 hours, or about 14 hours in a STZ-treated rat dosed at about 568 nmol/kg, or by the activity of lowering blood glucose to a level of about 100 mg/dL or below in a STZ-treated rat for a period ranging from about 4 hours to at least about 36 hours, about 48 hours, about 60 hours, about 72 hours, about 84 hours, about 96 hours, about 108 hours, or about 120 hours after a single subcutaneous injection of the compound at a dose of about 568 nmol/kg. Even more preferred compounds are those in which: (a) P is covalently attached to insulin lispro via a urethane bond; (b) the compound is characterized by having a K_i for the human insulin receptor of about 10 nM or less; (c) the compound is characterized by having an elimination half-life greater than 6 hours in a STZ-treated rat dosed at about 568 nmol/kg; and (d) the compound is characterized by the activity of lowering blood glucose to a level of about 100 mg/dL or below in a STZ-treated rat for a period ranging from about 4 hours to at least about 48 hours, about 60 hours, about 72 hours, about 84 hours, about 96 hours, about 108 hours, or about 120 hours after a single subcutaneous injection of the compound at a dose of about 568 nmol/kg. Most preferred compounds are those in which: (a) P is covalently attached to insulin lispro via a urethane bond; (b) the compound is characterized by having a K_i for the human insulin receptor of about 10 nM or less; (c) the compound is characterized by having an elimination half-life greater than 6 hours in a STZ-treated rat dosed at about 568 nmol/kg; (d) the compound is characterized by the activity of lowering blood glucose to a level of about 100 mg/dL or below in a STZ-treated rat for a period ranging from about 4 hours to at least about 48 hours, about 60 hours, about 72 hours, about 84 hours, about 96 hours, about 108 hours, or about 120 hours after a single subcutaneous injection of the compound at a dose of about 568 nmol/kg, and (e) the compound is characterized by having an elimination half-life greater than about 24 hours, about 30 hours, about 32 hours, about 34 hours, about 36 hours, 38 hours, about 40 hours, or about 42 hours in a human upon administration of a single parenteral dose at 0.225 mg/kg.

According to features and principles consistent with the invention, an embodiment of the invention provides a mono-PEGylated insulin lispro compound comprising a PEG

-12-

having an average molecular weight of about 17.5 kDa, about 20 kDa, about 25 kDa, about 30 kDa, or about 40 kDa covalently attached directly or indirectly to the alpha-amino group of glycine at position 1 of the A-chain of insulin lispro (PEG-GlyA1 insulin lispro), the alpha-amino group of the phenylalanine at position 1 of the B-chain of insulin lispro (PEG-PheB1 insulin lispro), or the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain of insulin lispro (PEG-LysB28 insulin lispro). Preferably, the mono-PEGylated insulin lispro comprises a PEG having an average molecular weight of about 17.5 kDa, about 20 kDa, about 25 kDa, about 30 kDa, or about 40 kDa attached either directly or indirectly to the alpha-amino group of phenylalanine at position 1 of the B-chain of insulin lispro or the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain of insulin lispro. More preferably, the mono-PEGylated insulin lispro comprises a PEG having an average molecular weight of about 17.5 kDa, about 20 kDa, about 25 kDa, about 30 kDa, or about 40 kDa attached to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain of insulin lispro. Even more preferably, the mono-PEGylated insulin lispro comprises a PEG having an average molecular weight of about 17.5 kDa or about 20 kDa attached to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain of insulin lispro (20 kDa-PEG-LysB28 insulin lispro). Most preferably, the mono-PEGylated insulin lispro comprises a PEG having an average molecular weight of about 20 kDa attached to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain of insulin lispro (i.e., PEG_{20 kDa}-LysB28 insulin lispro)

Other embodiments of the invention provide a mono-PEGylated insulin lispro compound comprising a PEG having a molecular weight of about 17.5 kDa, about 20 kDa, about 25 kDa, about 30 kDa, or about 40 kDa covalently attached directly or indirectly to the alpha-amino group of glycine at position 1 of the A-chain of insulin lispro, the alpha-amino group of the phenylalanine at position 1 of the B-chain of insulin lispro, or the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain of insulin lispro. Preferably, the mono-PEGylated insulin lispro comprises a PEG having a molecular weight of about 17.5 kDa, about 20 kDa, about 25 kDa, about 30 kDa, or about 40 kDa attached either directly or indirectly to the alpha-amino group of phenylalanine at position 1 of the B-chain of insulin lispro or the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain of insulin lispro. More preferably, the mono-PEGylated insulin lispro comprises a PEG having a molecular weight of about 17.5 kDa, about 20 kDa, about 30 kDa, or about 40 kDa attached to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain of insulin lispro. Most preferably, the mono-PEGylated insulin lispro comprises a PEG having a molecular weight of about 20 kDa attached to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain of insulin lispro and the PEG-LysB28-insulin lispro is characterized by having an elimination half-life greater

18

-13-

than about 24 hours, about 30 hours, about 32 hours, about 34 hours, about 36 hours, about 38 hours, about 40 hours, or about 42 hours in a human upon administration of a single subcutaneous dose of the composition at 0.225 mg/kg..

In another embodiment the invention provides compositions comprising a mixture of PEGylated insulin lispro compounds where attachment of the PEG occurs at different sites and/or a mixture of mono-PEGylated, di-PEGylated, and tri-PEGylated insulin lispro compounds. Exemplary compositions in accordance with the invention are those comprising more than one PEGylated-insulin lispro compound selected from the group consisting of: i) PEG-GlyA1 insulin lispro, ii) PEG-PheB1 insulin lispro, iii) PEG-LysB28 insulin lispro, iv) di-PEG-GlyA1PheB1-insulin lispro, v) di-PEG-GlyA1LysB28-insulin lispro, vi) di-PEG-PheB1LysB28-insulin lispro, and vii) di-PEG-GlyA1PheB1-insulin lispro. More preferably, compositions of the present invention comprise a mixture of PEGylated insulin lispro compounds wherein greater than about 80%, about 85%, about 90%, about 95%, or about 97% of the PEGylated insulin lispro compounds are mono-PEGylated insulin lispro compounds of Formula I. Even more preferably, compositions of the present invention comprise a mixture of PEGylated insulin lispro compounds wherein greater than about 80%, about 85%, about 90%, about 95%, or about 97% of the PEGylated insulin lispro compounds are mono-PEGylated insulin lispro compounds and less than about 20%, about 15%, about 10%, about 5%, or about 3% of the total PEGylated insulin lispro compounds are di-PEGylated. Even more preferably, compositions of the present invention comprise a mixture of PEGylated insulin lispro compounds wherein greater than about 80%, about 85%, about 90%, about 95%, or about 97% of the PEGylated insulin lispro compounds are PEG-LysB28-insulin lispro. Even more preferably, compositions of the present invention comprise a mixture of PEGylated insulin lispro compounds wherein greater than about 80%, about 85%, about 90%, about 95%, or about 97% of the PEGylated insulin lispro compounds are PEG-LysB28-insulin lispro and less than about 20%, about 15%, about 10%, about 5%, or about 3% of the total PEGylated insulin lispro compounds are PEG-GlyA1-insulin lispro. Even more preferably, compositions of the present invention comprise a mixture of PEGylated insulin lispro compounds wherein greater than about 80%, about 85%, about 90%, about 95%, or about 97% of the PEGylated insulin lispro compounds are PEG-LysB28-insulin lispro, less than about 20%, about 15%, about 10%, about 5%, or about 3% of the total PEGylated insulin lispro compounds are PEG-GlyA1-insulin lispro and less than about 10%, about 5%, or about 3% of the total PEGylated insulin lispro compounds are di-PEGylated insulin lispro compounds. Even more preferably, compositions of the present invention comprise a mixture of PEGylated insulin lispro compounds wherein about 80% of the total PEGylated insulin lispro compounds are PEG-LysB28-insulin lispro, about

-14-

10% are PEG-GlyA1-insulin lispro, and about 10% is di-PEG-GlyA1LysB28-insulin lispro. Even more preferably, compositions of the present invention comprise a mixture of PEGylated insulin lispro compounds wherein about 90% or greater of the total PEGylated insulin lispro compounds are PEG-LysB28-insulin lispro, about 5% or less are PEG-GlyA1-insulin lispro, and about 5% or less is di-PEG-GlyA1LysB28-insulin lispro. Even more preferably, compositions of the present invention comprise a mixture of PEGylated insulin lispro compounds wherein about 90% or greater of the total PEGylated insulin lispro compounds are PEG-LysB28-insulin lispro, about 5% or less are PEG-GlyA1-insulin lispro, about 5% or less is di-PEG-GlyA1LysB28-insulin lispro and wherein the PEG-LysB28-insulin lispro is characterized by having an elimination half-life greater than about 24 hours, about 30 hours, about 32 hours, about 34 hours, about 36 hours, about 38 hours, about 40 hours, or about 42 hours in a human upon administration of a single subcutaneous dose of the composition at 0.225 mg/kg. Most preferably, compositions of the present invention comprise a mixture of PEGylated insulin lispro compounds wherein about 95% or greater of the total PEGylated insulin lispro compounds are PEG-LysB28-insulin lispro, about 5% or less are PEG-GlyA1-insulin lispro, and the PEG-LysB28-insulin lispro is characterized by having an elimination half-life greater than about 24 hours, about 30 hours, about 32 hours, about 34 hours, about 36, about 38 hours, about 40 hours, or about 42 hours in a human upon administration of a single subcutaneous dose of the composition at 0.225 mg/kg.

The term "basic conditions" as used herein refers to the basicity of the PEGylation reaction. To more selectively PEGylate insulin lispro at the lysine at position 28 of the B-chain of insulin lispro, the reaction should be carried out with the alpha-amino groups of insulin lispro substantially deprotonated. In an aqueous solvent or co-solvent, basic conditions means the reaction is carried out at a pH greater than 7.0. Preferably, the PEGylation reaction is conducted at pH from about 8.5 to about 11.5. In an organic solvent, the reaction is carried out in the presence of a base with a basicity equivalent to a pK_a greater than or equal to 10.75 in water.

The present invention also includes a process of making a PEGylated insulin lispro compound of the formula:

P-[(A)-(B)], or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:

A is the A-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 1);

B is the B-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 3); and

P is a PEG having a molecular weight in the range from about 20 kDa to about 40 kDa, and wherein A and B are properly cross-linked and P is attached via an urethane covalent bond to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of B which comprises reacting the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of B with

19

-15-

monomethoxypoly(ethylene glycol) p-nitrophenyl carbonate (mPEG-NPC) having a weight average molecular weight between about 20 kDa and about 40 kDa in an aqueous solvent at a pH between about 8.5 and about 11.5 and at a reaction temperature between about 25 °C and about 30 °C. Preferably, the pH of the reaction is maintained between about 10.5 and about 11.1, the pegylation reaction is conducted at a temperature between about 25 °C and about 30 °C for a period of time between about 2 and about 12 hours, and the ratio of mPEG-NPC to insulin lispro is in the range between about 1.0 and about 5.0. More preferably, the weight average molecular weight of the mPEG-NPC is about 20 kDa, the pH of the reaction is maintained between about 10.5 and about 11.1, the pegylation reaction is conducted at a temperature between about 25 °C and about 30 °C for a period of time between about 2 and about 12 hours, and the ratio of mPEG-NPC to insulin lispro is in the range between about 1.0 and about 5.0. Even more preferably, the PEG:insulin lispro molar ratio is in the range between about 2.5 and about 4.5, the weight average molecular weight of the mPEG-NPC is about 20 kDa, the pH of the pegylation reaction is maintained between about 10.5 and about 11.1, the temperature of the pegylation reaction is maintained between about 25 °C and about 30 °C for a period of time between about 3 and about 6 hours. Most preferably, the PEG:insulin lispro molar ratio is in the range between about 2.6 and about 4.5, the weight average molecular weight of the mPEG-NPC is about 20 kDa, the pH of the pegylation reaction is maintained between about 10.5 and about 11.0, and the temperature of the reaction is maintained between about 25 °C and about 30 °C for about 3 hours.

If desired, PEGylated insulin lispro compounds of the present invention having different molecular weights can be isolated using various techniques known to one skilled in the art including, but not limited to, gel filtration chromatography and/or ion exchange chromatography. That is to say, gel filtration chromatography may be used to fractionate mono-PEGylated, di-PEGylated, and tri-PEGylated insulin lispro compounds on the basis of their differing molecular weights (where the difference corresponds essentially to the average molecular weight of the PEG used in the PEGylation reaction). For example, in an exemplary reaction where an insulin lispro is conjugated to an activated mPEG having an average molecular weight of about 20 kDa, the resulting reaction mixture may contain unmodified insulin lispro having a molecular weight of about 5,808 Daltons, mono-PEGylated insulin lispro having an average molecular weight of about 25,808 Daltons, di-PEGylated insulin lispro having an average molecular weight of about 45,808 Daltons kDa, and tri-PEGylated insulin lispro having an average molecular weight of about 65,808 Daltons. However, because gel filtration techniques separate compounds based on hydrodynamic size, mono-PEGylated insulin lispro conjugated to an mPEG having an average molecular weight of about 20 kDa will migrate during gel filtration as an

-16-

approximately 82 kDa protein despite having an average molecular weight of about 25,808 Daltons. One skilled in the art would expect a di- and tri-PEGylated species pegylated with an average molecular weight mPEG of about 20 kDa to have very different migration or retention times allowing for their purification and/or quantification.

5

The phrase "plasma half-life" refers to the time taken for the plasma concentration of the drug in the body to fall by one-half. An alternatively used term is "elimination half-life", which corresponds to the terminal log-linear rate of elimination. Those of skill in the art appreciate that half-life is a derived parameter that changes as a function of both clearance and volume of distribution. The terms "extended", "longer", or "increased" used in the context of plasma half-life or elimination half-life are used interchangeably herein and are intended to mean that there is a statistically significant increase in the half-life of a test compound (e.g., a PEGylated insulin lispro) relative to that of the reference molecule (e.g., insulin lispro) as determined under comparable conditions.

15 Clearance is the measure of the body's ability to eliminate a drug. As clearance decreases due, for example, to modifications to a drug, half-life would be expected to increase. However, this reciprocal relationship is exact only when there is no change in the volume of distribution. A useful approximate relationship between the terminal log-linear half-life ($t_{1/2}$), clearance (CL), and volume of distribution (V) is given by the equation: $t_{1/2} \sim 0.693 (V/CL)$. Clearance does not indicate how much drug is being removed but, rather, the volume of biological fluid such as blood or plasma that would have to be completely freed of drug to account for the elimination. Clearance is expressed as a volume per unit of time.

25 The term "treatment" or "treating" as used herein refers to the management and care of a patient having diabetes or hyperglycemia, or other condition for which insulin administration is indicated for the purpose of combating or alleviating symptoms and complications of those conditions. Treating includes administering compounds or compositions of the present invention to prevent the onset of symptoms or complications, alleviating the symptoms or complications, or eliminating the disease, condition, or disorder. The patient to be treated is a mammal, and preferably, a human being.

35 The PEGylated insulin lispro compounds of Formula I are effective in treating hyperglycemia by administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of one or more compounds of Formula I. As used herein the phrase "therapeutically effective amount" refers to that amount of a PEGylated insulin lispro compound of Formula I or compositions thereof sufficient to regulate blood glucose in a patient. Preferably, a therapeutically effective amount of a PEGylated insulin lispro of Formula I is from about 0.01 nmol/kg to about 100 nmol/kg. More preferably, a

90

-17-

therapeutically effective amount is from about 0.01 to about 50 nmol/kg. Even more preferably, a therapeutically effective amount is from about 0.01 to about 20 nmol/kg. Even more preferably, a therapeutically effective amount is from about 0.01 to about 10 nmol/kg. Even more, preferably a therapeutically effective amount is from about 0.1 to about 7.5 nmol/kg. Even more, preferably a therapeutically effective amount is from about 0.1 to about 5 nmol/kg. Most preferably, a therapeutically effective amount is from about 0.5 to about 5 nmol/kg. However, it is to be understood that the amount of a PEGylated insulin lispro compound or a composition comprising one or more PEGylated insulin lispro compounds actually administered will be determined by a physician in light of the relevant circumstances including the condition being treated (i.e., the cause of the hyperglycemia), the particular species of PEGylated insulin lispro or particular mixture of PEGylated insulin lispro compounds to be administered, other drugs, insulins or otherwise, to be co-administered, the chosen parenteral route of administration, the age, weight and response of the individual patient and the severity of the patient's symptoms. Therefore, the above dosage ranges are not intended to limit the scope of the invention in any manner.

The phrase "sufficient to regulate blood glucose" means that administration of a compound or composition to a patient results in a normal fasting plasma glucose level. A clinically normal fasting plasma glucose level is 70-110 mg/dL. A clinically normal postprandial plasma glucose level is less than 140 mg/dL.

Covalent chemical changes in the insulin structure are known to occur upon storage. This may lead to the formation of molecules which are less active and potentially immunogenic such as deamidation products and higher molecular weight transformation products (e.g., dimers, oligomers, polymers). A comprehensive study on the chemical stability of insulin is given in by Jens Brange in "Stability of Insulin", Kluwer Academic Publishers, 1994. The shelf-life of insulin products is mainly compromised by the formation of soluble aggregates (dimers, oligomers, and polymers) over time, despite the fact that insulin compositions are typically stored at a low temperature of no more than about 2-8 °C, which improves the shelf-life considerably compared to storage, e.g., at room temperature. In addition, insulin products are subject to the formation of insoluble aggregates (fibrils) as a result of shaking, e.g., when carried in the pocket of a patient or during transport. It is essential for the quality of an insulin product that the tendency to form such soluble and insoluble aggregates as a result of chemical or physical influences is reduced to an absolute minimum. Therefore, insulin compositions must demonstrate acceptable chemical and physical stability characteristics in order to be used therapeutically.

-18-

The term "stability" as used herein refers to the physical and/or chemical stability of formulations of PEGylated insulin lispro compounds. Physical instability of a PEGylated insulin lispro formulation may be caused by aggregation of the protein molecules to form higher order polymers or even precipitates. A "stable" formulation is one where the degree of aggregation of proteins is acceptably controlled, and does not increase unacceptably with time. In certain embodiments of the invention, a PEGylated insulin lispro formulation is considered stable over a certain time period if the degree of aggregation is within about 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% or 30% of the degree of aggregation observed in the starting material. In certain embodiments of the invention, a PEGylated insulin lispro formulation is considered stable over a certain time period if the polypeptide's biological activity is at least about 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% or 50% of the activity observed with the starting material.

The term "chemical stability" as used herein refers to the tendency of a PEGylated insulin lispro composition to form soluble protein aggregates during storage under static conditions, including storage at low temperatures of approximately 2-8 °C or elevated temperatures of approximately 20-40 °C. The chemical stability of a PEGylated insulin lispro compound of the invention can be measured by determining analytical attributes in the formulation under specific conditions, such as at a particular temperature and humidity condition over a certain period of time. The analytical attributes that can be measured include the formation of high molecular weight species using size-exclusion HPLC, for instance. The results can then be monitored and compared against pre-specified parameters.

The term "physical stability" as used herein refers to the tendency of a PEGylated insulin lispro composition to form insoluble protein aggregates as a result of a physical action such as shaking of a PEGylated insulin lispro composition. The physical stability of PEGylated insulin lispro compounds of the invention upon storage for a defined period of time at various temperatures in various pharmaceutical formulations may be assessed by methods well-known in the art, including measurement of a sample's apparent attenuation of light (absorbance or optical density). Such a measurement of light attenuation relates to the turbidity of a formulation. Turbidity is produced by aggregation or precipitation of proteins or complexes in the formulation. Other methods for assessing physical stability are well-known in the art including visual assessments of presence or absence of particles or by detecting fibril/gel formation by Thioflavin T fluorescence microscopy.

Other embodiments of the invention provide pharmaceutical compositions suitable for administration to a patient, particularly to a human being, comprising a therapeutically effective amount of at least one PEGylated insulin lispro compound of

21

-19-

Formula I and one or more pharmaceutically acceptable excipients, diluents, buffers, metal ions, or carriers. Such pharmaceutical compositions are typically, though not necessarily, parenteral in nature and may be prepared by any of a variety of techniques using conventional excipients, buffers, diluents, metal ions, or carriers for parenteral products which are well known in the art.

Because the PEGylated insulin lispro compounds of the present invention are very water-soluble, a pharmaceutical composition of the present invention includes a composition comprising water as the primary solvent, PEGylated insulin lispro compounds at a total concentration of at least 1 mg/mL, at least 2 mg/mL, at least 5 mg/mL, at least 10 mg/mL, at least 15 mg/mL, at least 20 mg/mL, at least 25 mg/mL, at least 30 mg/mL, at least 35 mg/mL, at least 40 mg/mL, at least 45 mg/mL, at least 50 mg/mL, or greater and a pharmaceutically acceptable buffer wherein the pharmaceutical composition has a pH from about 4.0 to about 8.5. Preferably, a pharmaceutical composition of the present invention has a pH between about 6.0 and about 8.5. More preferably, a pharmaceutical composition of the invention comprises PEGylated insulin lispro compounds at a total concentration in the range from about 2.5 mg/mL to about 60 mg/mL and a buffer wherein the composition has a pH in the range from about 6.0 to about 8.5. More preferably, a pharmaceutical composition of the invention comprises PEGylated insulin lispro compounds at a concentration in the range from about 5 mg/mL to about 50 mg/mL and a buffer wherein the pharmaceutical composition has a pH in the range from about 6.5 to about 7.5. Even more preferably, a pharmaceutical composition of the invention comprises PEGylated insulin lispro compounds at a concentration in the range from about 15 mg/mL to about 40 mg/mL and a buffer wherein the pharmaceutical composition has a pH in the range from about 7.0 to about 7.5, or from about 7.0 to about 8.0. Even more preferably, a pharmaceutical composition of the invention further comprises a therapeutically effective amount of an insulin. Even more preferably, the insulin is an insulin analog. Even more preferably, the insulin analog is a rapid-acting insulin analog. Most preferably, the rapid-acting insulin analog is insulin lispro.

The term "buffer" refers to a solution that resists changes in pH by the action of its acid-base conjugate components. Preferably, the buffers employed are pharmaceutically acceptable buffers. The phrase "pharmaceutically acceptable buffer" refers to a solution that is safe for use in insulin formulations and that has the effect of controlling the pH of the pharmaceutical composition at the pH desired. In preferred embodiments, the buffer

-20-

has a pH in the range from about 6.0 to about 8.5. More preferably, the buffer has a pH in the range from about 7.0 to about 8.0. Pharmaceutically acceptable buffers for controlling pH of the compositions of the present invention in this range include, but are not limited to, agents such as phosphate, acetate, citrate, arginine, TRIS, and histidine buffers, as well as combinations thereof. "TRIS" refers to 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3,-propanediol, and to any pharmacologically acceptable salt thereof. The free base and the hydrochloride form (i.e., TRIS-HCl) are two common forms of TRIS. TRIS is also known in the art as trimethylol aminomethane, tromethamine, and tris(hydroxymethyl)aminomethane. Preferably, a pharmaceutical composition of the present invention comprises from about 2.5 mM to about 50 mM phosphate or TRIS buffer. More preferably, a pharmaceutical compositions of the present invention comprises from about 5 mM to about 20 mM phosphate or TRIS buffer. Even more preferably, a pharmaceutical composition of the present invention comprises from about 5 mM to about 10 mM phosphate buffer. Even more preferably, a pharmaceutical composition of the present invention comprises about 5 mM phosphate buffer. Even more preferably, a pharmaceutical composition of the present invention comprises between about 7.5 mM and about 50 mM TRIS buffer. Even more preferably, a pharmaceutical composition of the present invention comprises between about 10 mM and about 25 mM TRIS buffer. Even more preferably, a pharmaceutical composition of the present invention comprises between about 15 mM and about 20 mM TRIS buffer. Most preferably, a pharmaceutical composition of the present invention comprises about 16 mM TRIS buffer.

The PEGylated insulin lispro compounds and compositions of the invention may be formulated analogously with known formulations of insulins that are administered to patients parenterally. Such formulations are known to one skilled in the art. Preferably, PEGylated insulin lispro compounds of Formula I are formulated analogously with the formulation of HUMALOG[®] insulin lispro or Humulin[®]. Therefore, a preferred pharmaceutical composition of the present invention may comprise water, a PEGylated insulin lispro compound of Formula I, an isotonicity agent, and a pharmaceutically acceptable buffer. Preferably, a pharmaceutical composition of the invention further comprises a pharmaceutically acceptable preservative. More preferably, a pharmaceutical composition of the invention further comprises a divalent cation such as zinc and/or cobalt, which can facilitate hexamerization of insulin. Even more preferably, a pharmaceutical composition of the invention further comprises at least one hexamer-stabilizing agent. Furthermore, hydrochloric acid and/or sodium hydroxide may be added to adjust pH.

An "isotonicity agent" is a compound that is physiologically tolerated and imparts a suitable tonicity to a formulation to prevent the net flow of water across cell membranes

-21-

that are in contact with an administered pharmaceutical composition. Glycerol, which is also known as glycerin, is commonly used as an isotonicity agent. Other isotonicity agents include i) other sugar alcohols such as but not limited to mannitol and sorbitol, ii) salts such as, but not limited to, NaCl, iii) monosaccharides including, but not limited to, dextrose, and iv) disaccharides including, but not limited to, lactose, sucrose, and trehalose. The pharmaceutical compositions of the present invention may include one or more isotonicity agents. Preferably, pharmaceutical formulations of the present invention have one or more isotonicity agents which produce a formulation with an isotonicity in the range of about 270 and about 330 mOsm. More preferably, the isotonicity agent(s) is glycerol, sorbitol, sucrose, NaCl, trehalose, and/or mannitol. Even more preferably, the isotonicity agent is glycerol, sorbitol, sucrose, NaCl, and/or trehalose. Even more preferably, glycerol, sorbitol, sucrose, NaCl, or trehalose at a concentration from about 100 to about 200 mM is present in the pharmaceutical compositions of the present invention. Even more preferably, glycerol at a concentration from about 100 to about 200 mM is present in the pharmaceutical compositions of the present invention. Even more preferably, glycerol at a concentration from about 150 to about 180 mM is present in the pharmaceutical compositions of the present invention. Even more preferably, glycerol at a concentration from about 130 to about 175 mM is present in the pharmaceutical compositions of the present invention. Even more preferably, NaCl at a concentration from about 50 to about 300 mM is present in the pharmaceutical compositions of the present invention. Even more preferably, NaCl at a concentration from about 100 to about 200 mM is present in the pharmaceutical compositions of the present invention. Most preferably, NaCl at a concentration of about 150 mM is present in the pharmaceutical compositions of the present invention.

The pharmaceutical compositions of the present invention may also contain a hexamer-stabilizing compound. The phrases "hexamer-stabilizing compound" refers to a non-proteinaceous, small molecular weight compound that stabilizes the PEGylated insulin lispro compounds of the present invention in a hexameric association state. Calcium ions, zinc, cobalt, copper, nickel, iron, magnesium, manganese, anions, particularly, chloride, bromide, iodide, thiocyanate, and phenolic compounds, particularly phenol, phenolic preservatives, resorcinol, 4'-hydroxyacetanilide, 4-hydroxybenzamide, and 2,7-dihydroxynaphthalene, are known hexamer-stabilizing compounds for insulin molecules. Preferably, the hexamer-stabilizing compound is phenol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, chlorocresol, methylparaben, calcium, chloride, or a combination of two or more of these compounds. More preferably, the hexamer-stabilizing compound is phenol, m-cresol, calcium, chloride, or a combination thereof. Preferably, a pharmaceutical composition of the invention comprises between about 1 mM and 75 mM calcium,

-22-

between about 1 mM and about 50 mM calcium, between about 1 mM and about 25 mM calcium, between about 5 mM and about 50 mM calcium, between about 2.5 mM and about 30 mM calcium, between about 2.5 mM and about 15 mM calcium, between about 2.5 mM and about 10 mM calcium, between about 5 mM and about 30 mM calcium, between about 5 mM and about 15 mM calcium. More preferably, a pharmaceutical composition of the invention comprises between about 2.5 mM and 10 mM calcium.

Multi-use formulations of the pharmaceutical compositions of the present invention may also contain a preservative. The term "preservative" refers to a compound added to a pharmaceutical formulation to act as an anti-microbial agent. Among preservatives known in the art as being effective and acceptable in parenteral formulations are benzalkonium chloride, benzethonium, chlorohexidine, phenol, m-cresol, benzyl alcohol, methylparaben, propylparaben, chlorobutanol, o-cresol, p-cresol, chlorocresol, phenylmercuric nitrate, thimerosal, benzoic acid, and various mixtures thereof. Certain phenolic preservatives, such as methylparaben, phenol, and m-cresol, are known to bind to insulin and insulin-like molecules and thereby to induce conformational changes that increase either physical or chemical stability, or both (*See, e.g.,* Birnbaum, D. T., *et al., Pharmaceutical. Res.* 14:25-36 (1997); Rahuel-Clermont, S., *et al., Biochemistry* 36:5837-5845 (1997)). "Phenolic preservative" includes the compounds phenol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, chlorocresol, methylparaben, and mixtures thereof. The preservative used in formulations of the PEGylated insulin lispro compounds of the present invention may be a phenolic preservative, and may be the same as, or different from the hexamer-stabilizing compound. Preferably, the phenolic preservative is m-cresol or phenol. More preferably, a pharmaceutical compositions of the present invention comprises phenol and/or m-cresol at a concentration from about 0.1 to about 75 mM as a preservative at a pH from about 7.0 to about pH 8.0. Even more preferably, a pharmaceutical composition of the present invention comprises phenol and/or m-cresol at a concentration from about 1 to about 60 mM as a preservative at a pH from about 7.0 to about pH 8.0. Even more preferably, a pharmaceutical composition of the present invention comprises phenol and/or m-cresol at a concentration from about 10 to about 40 mM as a preservative at a pH from about 7.0 to about pH 8.0. Even more preferably, a pharmaceutical composition of the present invention comprises phenol and/or m-cresol at a concentration of about 30 mM at a pH from about 7.0 to about pH 8.0. Most preferably, a pharmaceutical composition of the present invention comprises phenol and/or m-cresol at a concentration of about 30 mM at a pH from about 7.3 to about pH 7.5.

As mentioned above, the pharmaceutical compositions of the present invention may comprise divalent metal cations such as zinc or cobalt that drive hexamerization of insulin or otherwise stabilize insulin compounds. "Divalent metal cation" means the ion

-23-

or ions that participate to form a complex with a multiplicity of protein molecules. The transition metals, the alkaline metals, and the alkaline earth metals are examples of metals that are known to form complexes with insulin compounds. The transitional metals are preferred. Preferably, the divalent metal cation is one or more of the cations selected

5 from the group consisting of zinc, copper, cobalt, nickel, manganese, magnesium, cadmium, and iron. More preferably, zinc is the divalent metal cation. Zinc is known to facilitate the formation of hexamers of insulin and of various insulin analogs and/or derivatives, including insulin lispro. The primary role of divalent cations such as zinc or cobalt in pharmaceutical compositions of the present invention is to facilitate formation

10 of hexamers of the PEGylated insulin lispro compounds of the present invention and/or any other insulins or insulin analogs in a pharmaceutical composition comprising a PEGylated insulin lispro compound of the present invention. In the presence of a phenolic preservative, hexamer formation may be facilitated by bringing the pH of a solution comprising pharmaceutical compositions of the present invention into the neutral

15 region in the presence of Zn(II) ions, or by adding Zn(II) after the pH has been adjusted to the neutral region. Preferably, the ratio of zinc to insulin compound, insulin analog, and/or PEGylated insulin lispro compound is bounded at the lower limit by about 0.33, that is, two zinc atoms per insulin hexamer, insulin analog hexamer and/or PEGylated insulin lispro hexamer. More preferably, the ratio of zinc to insulin compound, insulin

20 analog, and/or PEGylated insulin lispro compound is from about 0.33 to about 0.67. Even more zinc may be used during the process if a compound that competes with the protein for zinc binding, such as citrate or phosphate, is present. Excess zinc above the amount needed for hexamerization may be desirable to more strongly drive hexamerization, e.g., a ratio of zinc to insulin compound, insulin analog, and/or

25 PEGylated insulin lispro compound from about 0.33 to about 0.83. Also, excess zinc above the amount needed for hexamerization can be present in a pharmaceutical composition of the present invention, and may be desirable to improve chemical and physical stability, to improve "suspendability", and possibly to extend time-action further. On the other hand, excessive amounts of zinc in citrate or phosphate buffers

30 might lead to precipitation of zinc citrate or zinc phosphate, respectively, as well as insulin.

In accordance with the present invention, zinc may be present in the formulation in an amount from about 0.3 mole to about 3 moles per mole of insulin, insulin analog, and PEGylated insulin lispro hexamer. More preferably, zinc is present in the

35 pharmaceutical compositions of the present invention in an amount from about 0.3 mole to about 1 mole per mole of total insulin, insulin analog, and PEGylated insulin lispro hexamer. Even more preferably, zinc is present in the pharmaceutical compositions of

-24-

the present invention in an amount from about 0.3 mole to about 0.7 mole per mole of total insulin, insulin analog, and PEGylated insulin lispro hexamer. Most preferably, zinc is present in the pharmaceutical compositions of the present invention in an amount from about 0.3 mole to about 0.55 mole per mole of insulin, insulin analog, and PEGylated
5 insulin lispro hexamer. The zinc compound that provides zinc for the present invention may be any pharmaceutically acceptable zinc compound. The addition of zinc to insulin preparations is known in the art, as are pharmaceutically acceptable sources of zinc. Preferably, zinc is provided as a salt, such as zinc sulfate, zinc chloride, zinc acetate, zinc citrate, zinc oxide, or zinc nitrate.

10 In a further embodiment of the invention the pharmaceutical composition of the present invention further comprises one or more surfactants. The term "surfactant" as used herein, includes agents that reduce the surface tension of a liquid by adsorption at the air-liquid interface. Examples of surfactants include, without limitation, nonionic surfactants, such as polysorbates (e.g., polysorbate 80 or polysorbate 20); poloxamers
15 (e.g., poloxamer 188); Triton™ (e.g., Triton™ X-100); polyethyl glycol; polypropyl glycol; and copolymers of ethylene and propylene glycol (e.g., pluronics, PF68). For example, the surfactant can be present in a pharmaceutical composition of the present invention in an amount from about 0.001-0.5%, e.g., from about 0.05-0.3%. Preferably, the surfactant used in the pharmaceutical composition of the present invention is
20 poloxamer 188. More preferably, the surfactant is poloxamer 188 at a concentration between about 0.5 and about 10 mg/mL, between about 1 and about 10 mg/mL, between about 2 and about 10 mg/mL, between about 3 and about 10 mg/mL, between about 4 and about 10 mg/mL, between about 1 and about 5 mg/mL, between about 2 and about 5 mg/mL, between about 3 and about 5 mg/mL, and between about 4 and about 5 mg/mL.

25 The invention also provides a PEGylated insulin lispro compound of Formula I or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in the treatment of hypoglycemia and/or diabetes, preferably, in humans.

The invention also provides a PEGylated insulin lispro compound of Formula I or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in the manufacture of a medicament for
30 the treatment of hypoglycemia and/or diabetes, preferably, in humans.

Pharmaceutical compositions comprising a PEGylated insulin lispro according to the present invention may be administered parenterally to patients in need of such a treatment. Parenteral administration may be performed by subcutaneous, intramuscular or intravenous injection by means of a syringe, optionally a pen-like syringe, or
35 mechanical driven injector. Alternatively, parenteral administration can be performed by means of an infusion pump.

28

-25-

Preparation 1**GlyA1-HSCH₂CH₂CO-insulin lispro (3) and LysB28-HSCH₂CH₂CO-insulin lispro (4)**

5 One mmol each of Trt-SCH₂CH₂CO-OH, N-hydroxysuccinimide (NHS), and diisopropylcarbodiimide (DIC) is mixed in 2 mL DMF for 30 minutes to prepare Trt-SCH₂CH₂CO-NHS ester. One-tenth mmol of insulin lispro is dissolved in 10 mL of 5% triethylamine (TEA) in DMSO. To the solution is added 0.2 mmol activated Trt-SCH₂CH₂CO-NHS. After 2 hours at room temperature, 0.2 mL ethanolamine is added to
10 terminate the reaction. The reaction mixture is then diluted with 90 mL of H₂O and applied onto a RP-C18 column for purification. The desired fractions of LysB28-Trt-SCH₂CH₂CO-insulin lispro (2) are pooled and lyophilized. Separately, the desired fractions of GlyA1-Trt-SCH₂CH₂CO-insulin lispro (1) are pooled and lyophilized. One-tenth mmol of (1) or (2) is dissolved in 5 mL TFA containing 0.2 mL of thioanisole and
15 0.4 mL of triisopropyl-silane. After 30 min, TFA is removed by evaporation and the residual peptide is taken in 50 mL of 10% ACN in H₂O. The resulting solution is applied to a RP-C18 column for purification. The desired fractions of (3) or (4) are pooled and, optionally, lyophilized.

20

Preparation 2**PheB1-HSCH₂CH₂CO-insulin lispro (7)**

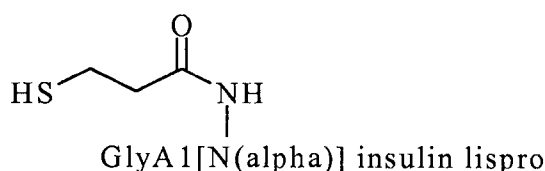
One-tenth mmol of insulin lispro is dissolved in 10 mL of 5% TEA in DMSO. To the solution is added 0.2 mmol of di-tert-butylcarbonate in DMSO. After 1 hour at room
25 temperature, 0.2 mL ethanolamine is added to terminate the reaction. The reaction mixture is then diluted with 90 mL of H₂O and applied onto a RP-C18 column for purification. The desired fractions of Boc-GlyA1, Boc-LysB28-insulin lispro are pooled and lyophilized to yield (5). One-tenth mmol of (5) is dissolved in 10 mL of 5% TEA in DMSO. To the solution is added 0.2 mmol activated Trt-SCH₂CH₂CO-NHS. After 2
30 hours at room temperature, 0.2 mL ethanolamine is added to terminate the reaction. The reaction mixture is then diluted with 90 mL of H₂O and applied onto a RP-C18 column for purification. The desired fractions are pooled and lyophilized to yield Trt-SCH₂CH₂CO-PheB1, Boc-GlyA1, Boc-LysB28-insulin lispro (6). One-tenth mmol of (6)
35 is dissolved in 5 mL TFA containing 0.2 mL of thioanisole and 0.4 mL of triisopropylsilane. After 30 min, TFA is removed by evaporation and the residual peptide is taken in 50 mL of 10% ACN in H₂O. The resulting solution is applied to a RP-C18 column for purification. The desired fractions are pooled and lyophilized to yield (7).

-26-

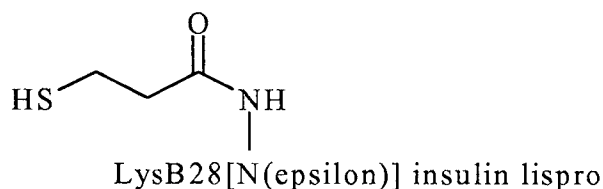
Example 1: PEGylation of thiol-derivatized insulin lispro intermediates

Monomethoxy-PEG-MAL having an average molecular weight of about 20 kDa (b), 30 kDa (a), 40 kDa (a), or 60 kDa (c) is dissolved in a 1:1 mixture of 100 mM NH₄Ac buffer (pH 4.69) and ACN. A lyophilized powder of a thiol-derivatized insulin lispro, e.g., compound (3), (4), or (7), is added to the solution. The reaction may be followed by analytical RP-HPLC. When the reaction is complete (usually after approximately 4 hours), the mixture is diluted with H₂O and applied onto a RP-HPLC column for purification. The desired fractions are pooled and lyophilized to yield the PEGylated insulin lispro compounds. Exemplary PEGylated insulin lispro compounds prepared as described in Example 1 are shown below as (8(a)), (8(b)), (9(a)), (9(b)), (10(a)), (10(b)), and (15(c)). Preferably, these PEGylated insulin lispro compounds will have *n* in the range from about 400 to about 1000. More preferably, these PEGylated insulin lispro compounds will have *n* in the range from about 400 to about 750. More preferably, these PEGylated insulin lispro compounds will have *n* in the range from about 400 to about 550. Even more preferably, these PEGylated insulin lispro compounds will have *n* of about 400 and about 500. Even more preferably, these PEGylated insulin lispro compounds will have *n* of about 450 and about 500. Most preferably, these PEGylated insulin lispro compounds will have *n* of about 450.

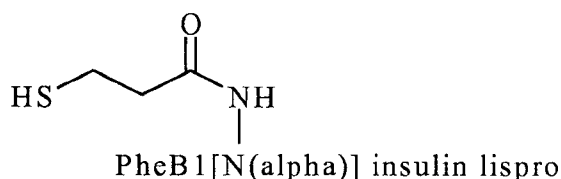
(3)



(4)



(7)

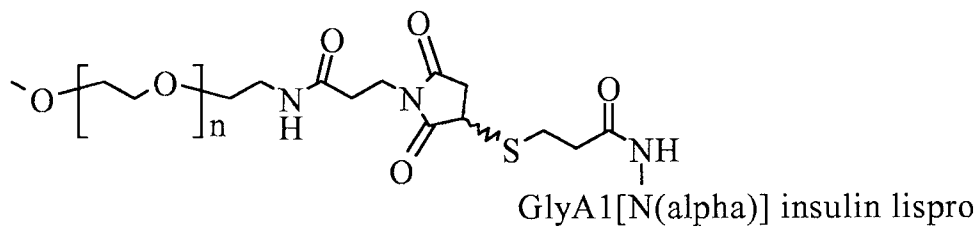


20

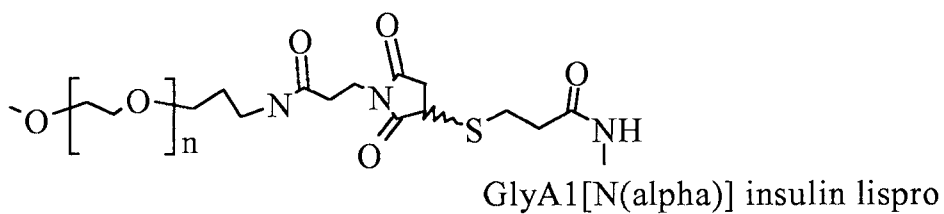
B

-27-

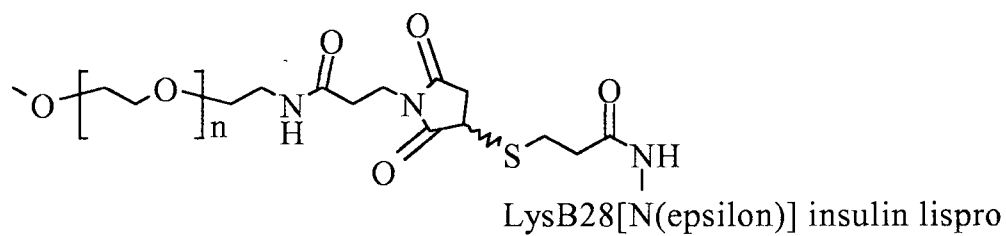
(8(a))



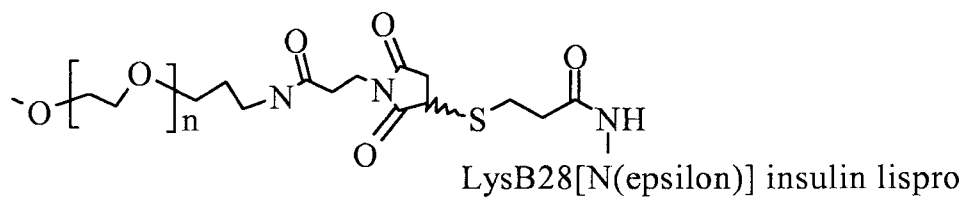
(8(b))



(9(a))

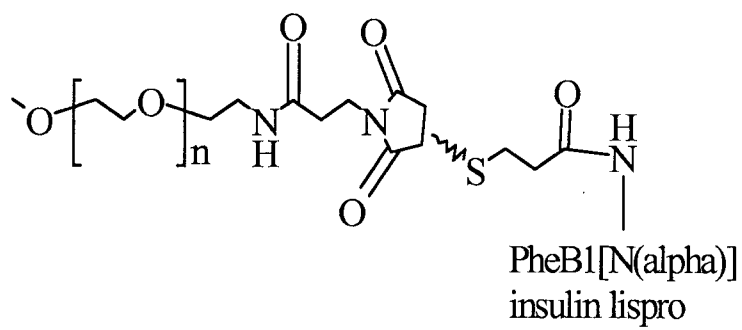


(9(b))

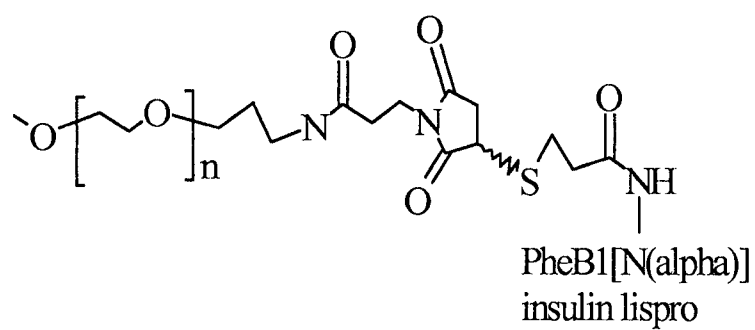


-28-

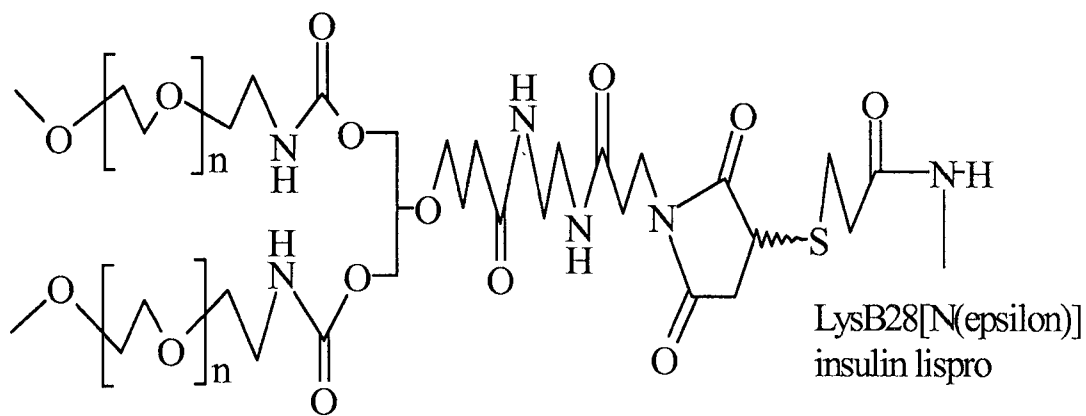
(10(a))



(10(b))



(15(c))



jb

-29-

Example 2: PEGylation of insulin lispro using monomethoxypoly(ethylene glycol) p-nitrophenyl carbonate (mPEG-NPC)

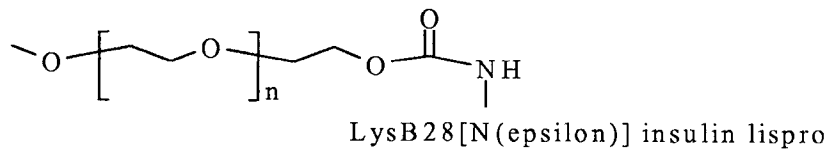
One-tenth mmol insulin lispro is dissolved in 20 mL of 0.2 M borate buffer, pH 10.5, and 1.98 g mPEG-NPC having an average molecular weight of about 20 kDa in 20 mL ACN is added to the solution with vigorous stirring. The reaction is monitored by RP-HPLC and SEC. After approximately 4 hours, the reaction mixture is acidified to pH 5-7 using acetic acid and applied onto a RP-HPLC column for purification. The desired fractions are pooled and lyophilized to yield mono-PEGylated PEG20K-insulin lispro in a yield ranging from 20 to 45%. The identity and purity are confirmed by RP-HPLC, SEC, and MALDI-MS. The ratio of mPEG attached onto A-chain or B-chain is determined by the area integrations of free A-chain and B-chain released after the treatment of the resulting conjugate with tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP). The ratio of mPEG-NPC to insulin lispro determines the product distribution of mono-PEGylated and di-PEGylated species. The reaction pH governs the site-specificity of PEGylation. As pH increases from about 8 to about 12, compound (11) becomes the major product. When the reaction is conducted at pH 10.5 with mPEG-NPC having an average molecular weight of about 20 kDa (n is about 450), the ratio of (11) to (12) is about 85:15.

The PEGylation reaction described above can also be conducted in a non-buffered aqueous solution by maintaining the pH of the reaction mixture by continuous addition of 0.2 M NaOH. When conducted in a non-buffered aqueous solution using mPEG-NPC having an average molecular weight of about 20 kDa while the pH is maintained at about pH 11.5, the PEGylation reaction products include (11) and (12) in a ratio of about 92:8. Preferably, compound (11) will have n in the range from about 400 to about 1000. More preferably, compound (11) will have n in the range from about 400 to about 750. Even more preferably, compound (11) will have n in the range from about 400 to about 550. Even more preferably, compound (11) will have n of about 400 to about 500. Even more preferably, compound (11) will have n of about 450 and about 500. Most preferably, compound (11) will have n of about 450.

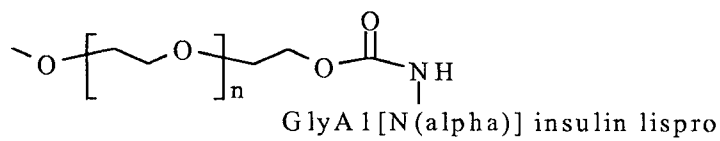
30

-30-

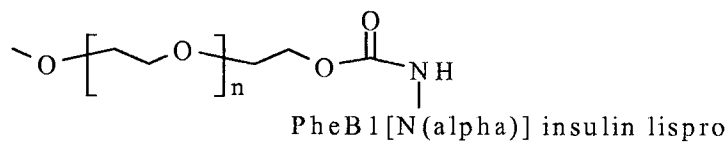
(11)



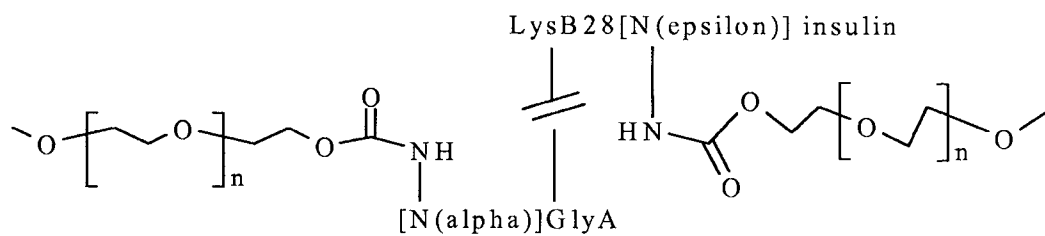
(12)



(13)



(14)



Example 3: *In Vitro* Receptor Affinity

- 5 Receptor binding assays are performed on P1 membranes prepared from stably transfected 293 EBNA HEK cells over-expressing the human insulin receptor (hIR) or human IGF-1 receptor (hIGF-1R). Binding affinities are determined from a competitive radio-ligand binding assay using either human recombinant (3-[¹²⁵I]iodotyrosyl A¹⁴)-Insulin (2000 Ci/mmol) or human recombinant [¹²⁵I]Insulin Like Growth Factor 1 (2000
- 10 Ci/mmol). The assay was performed with a SPA method using PVT PEI-treated Type A

-31-

wheat germ agglutinin-coupled SPA beads. SPA assay buffer (50 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% BSA) was used for all reagent preparations. Three-fold serial dilutions of compounds (100 nM to 2 pM) are prepared in assay buffer using a Freedom/Evo robot (Tecan) and added to 96-well white, clear-bottom microplates (Corning/Costar) with a Multimek (Beckman Coulter). Radioligand, membranes and SPA beads are added using a multidrop instrument (Titertek). Following a 10-hour incubation at room temperature, the radioactivity is determined using a Microbeta Trilux scintillation counter. Unlabeled insulin lispro and unlabeled IGF-1 are included in each experiment as positive and negative controls, respectively. IC_{50} values are determined from 4-parameter logistic non-linear regression analysis. The affinity constant (K_i) is calculated from the IC_{50} value based upon the equation $K_i = IC_{50}/(1 + D/K_d)$ where D equals the concentration of radioligand used in the experiment and K_d equals the equilibrium binding affinity constant of the radioligand determined from saturation binding analysis (K_d for hIR and hIGF-1R is 0.124 and 0.130 nM, respectively). The geometric mean K_i reported below is $10^{(\text{Mean Log } K_i)}$ wherein $\text{Mean Log } K_i = \text{Average } (K_{i1} + K_{i2} + K_{i3} \dots K_{in})$ and the number of independent experiments (n) is greater than two. However, where noted below with respect to human IGF-1, n is two.

The following PEGylated insulin lispro compounds prepared as described in Example 1 have a geometric mean K_i less than 30 nM in the hIR binding assay described above: compound **10(a)** prepared using linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa, compound **8(a)** prepared using linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa, compound **15(c)** prepared using bifurcated mPEG-MAL having an average molecular weight of about 60 kDa, compound **9(a)** prepared using linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 30 kDa, compound **9(a)** prepared using linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa, and compound **9(b)** prepared using linear mPEG-MAL having an average molecule weight of 20 kDa. In the hIR and hIGFR binding assays, compound **9(a)** prepared using linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa has a geometric mean K_i of $3.07 \text{ nM} \pm .32 \text{ nM}$ ($\pm$ S.E.M; $n = 6$) and greater than 84.3 nM (SEM = not determined; $n=6$), respectively. Additionally, heterogenous PEGylated insulin lispro products generated as described in Example 2 using a linear mPEG-NPC of either 40, 30, or 20 kDa also have a geometric mean K_i less than 30 nM in the hIR binding assay described above. In the hIR binding assay described above, insulin lispro has a geometric mean K_i of $0.22 \pm .072 \text{ nM}$ ($\pm$ SEM; $n = 4$). In the hIGFR binding assay described above, all of the aforementioned compounds have a geometric mean K_i greater than 75 nM and human IGF-1 has a geometric mean K_i of $1.51 \pm .23 \text{ nM}$ ($\pm$ SEM; $n = 2$).

-32-

These data show that PEGylating position B28 reduces hIR affinity by about 10-fold, making these PEGylated species of insulin lispro weak agonists of the hIR. The PEGylated insulin lispro species also possess no measurable IGFR-1 binding properties in this assay under these conditions.

5

Example 4: Evaluation of the Potency of PEGylated Insulin Lispro using an Insulin Receptor Phosphorylation Whole Cell Assay

The PEGylated insulin lispro compounds of the present invention may be evaluated for functional activity using DELFIA[®], a heterogeneous time-resolved
10 fluorometric assay method available commercially (Perkin-Elmer). Briefly, 293HEK cells over-expressing the human insulin receptor are trypsinized and plated at 60,000 cells/well in poly-D-lysine-coated, half-area Costar 96-well tissue culture plates in serum-free media (SFM), (DMEM with 0.1% fatty acid-free BSA). The cell culture plates are incubated overnight at 37 °C in a CO₂ incubator. Anti-insulin receptor A-chain mAb
15 8314 capture plates are also prepared the night before using Costar 1/2 area black 96-well microtiter plate, treated overnight at 4 °C with 30 µL of anti-insulin receptor A-chain mAb 8314 (Soos, M.A., *et al. Biochem J* **235**:199-208 (1986); available commercially including from Abcam, Inc., Cambridge, MA), diluted to 1 µg/mL in 10 mM sodium carbonate. The mAb 8314 capture plates are washed four times with 50 mM TRIS, pH
20 7.5, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween (TBST) to remove any unbound mAb 8314. The mAb 8314 capture plate is then blocked for more than 1 hour at 4 °C with 1% BSA in TBST. After blocking, the capture plate is washed twice with TBST to remove excess BSA solution. Once the capture plate is in the blocking buffer, the cell culture plates are removed from the incubator and equilibrated to room temperature. The test compounds
25 are serially diluted into SFM. To stimulate autophosphorylation of the insulin receptor, 50 µL of the diluted testing agent is added to the cell monolayer. After 30 minutes at room temperature, the reaction is stopped by aspirating off the test compounds and adding back 50 µL of a 2x lysis buffer (2% NP40, 100 mM TRIS, pH 7.4, 300 mM NaCl, Roche Complete[™] protease inhibitors with EDTA, and 4 mM vanadate). After 30
30 minutes in lysis buffer at room temperature, 30 µL of lysate is transferred to the blocked capture plate containing 30 µL of a Europium-N1-anti-phosphotyrosine PY20-antibody, Eu-N1-PY20 (Perkin Elmer), diluted to 50 ng/mL in 10 mM Hepes, 140 mM NaCl and 0.1% Tween. This mixture is incubated for 1 hour at room temperature followed by 6 washes with TBST to remove unbound Eu-N1-PY20 and cell lysate. Following
35 incubation with 50 µL of Enhancement Solution (Perkin Elmer) for 10 minutes with intermittent shaking as the signal is developed. The phosphorylated insulin receptor is quantitated using a Wallac Victor using Time Resolve Fluorescence Europium settings.

78

-33-

Phosphorylation level is calculated as a % of the response for a maximally stimulating dose of insulin (100 nM). The potencies of the insulin analogs are calculated as the EC50 dose using a four parameter fit of the dose response. PEGylated insulin lispro compounds prepared as described in Example 1 having an EC50 of less than 15 nM in the assay

5 described in Example 4 include **10(a)** prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa, **9(a)** prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa, **9(a)** prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 30 kDa, and **9(b)** prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 20 kDa. In the assay

10 described in Example 4, compound **9(a)** prepared using linear mPEG-MAL has an EC50 of 10.88 nM. Heterogenous PEGylated insulin lispro products generated as described in Example 2 using a linear mPEG-NPC having an average molecular weight of about 40, about 30, or about 20 kDa also have an EC50 of less than 15 nM in the assay described in Example 4. A 50:50 and a 70:30 mixture of compound **8(a)** prepared using a linear

15 mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa and compound **9(a)** prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa also have an EC50 of less than 15 nM in the assay described in Example 4. In the same assay, human insulin and insulin lispro have an EC50 of 2.3 and 0.7 nM, respectively.

The data show that PEGylating position B28 reduces hIR *in vitro* activity by

20 about 10- to 20-fold, making these PEGylated insulin lispro species weak agonists of hIR. The PEGylated insulin lispro species also possess no measurable IGFR-1 binding properties.

Example 5: Evaluation of *In Vivo* Potency and Pharmacokinetic Profiles of PEGylated Insulin Lispro in a Rat Model of Type 1 Diabetes

25

Ten-week old male Harlan Sprague-Dawley rats (Harlan, Indianapolis) 250-280g body weight, are dosed intravenously into their tail vein with 45 mg/kg streptozocotin (STZ) in 0.5 M Citric Acid, pH 4.5, three days prior to study start. At the start of the study animals are sorted into groups based on body weight and blood glucose. Only

30 animals with blood glucose between 400-550 mg/dL are included in the study. In the morning of study start animals receive a single subcutaneous injection of the test compound at one of several pre-determined doses. Periodically, duplicate blood samples are drawn from the tail vein and collected into tubes containing disodium EDTA. Blood glucose levels are measured with a glucometer. Also, plasma is collected from the vein

35 blood sampling and a commercially available rat insulin radioimmunoassay is used to determine the levels of the administered drug in the plasma. The area under the curve for blood glucose over time (mg*h/dL) is calculated for each individual animal and is used

-34-

for a four-parameter logistic regression to determine the ED50. In this assay, compound 9(a) prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa, compound 9(a) prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 30 kDa, and compound 9(b) prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 20 kDa has a potency (ED50) of 241, 138, and 69 nmol/kg, respectively, from a typical dose response curve. Additionally, those compounds were able to lower blood glucose in STZ-treated rats to a level that is normal in this strain of rats (100 mg/dL or below) for at least 36 hours with a single subcutaneous injection of 568 nmol/kg. Insulin detemir on the other hand normalizes glucose for 5-6 hours in the above assay with a 568 nmol/kg single dose.

In addition to assessment of pharmacodynamic parameters, the mean pharmacokinetic parameter values in rats for test compounds are determined using the duplicate blood sample. Pharmacokinetic parameters are calculated using model-independent methods (WinNonlin Pro). The resulting pharmacokinetic parameter values show nonlinearity as function of dose. The range of values reported correspond to pharmacokinetic parameter values generated between the highest dose tested (568 nmol/kg) and the lowest dose (5.6 nmol/kg).

The pharmacokinetic results for compound 9(b) prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 20 kDa indicated a time to maximum concentration (T_{max}) ranging from 6-12 h, an apparent clearance rate of (CL/F) ranging from 0.05-0.14 L/h/kg, an apparent volume of distribution (V/F) ranging from 0.6-7.2 L/kg, and an elimination half-life ($t_{1/2}$) ranging from 8.5-34.5 h.

The pharmacokinetic results for compound 9(a) prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 30 kDa indicated a T_{max} of 12 hours, a CL/F ranging from 0.05-0.13 L/h/kg, a V/F ranging from 0.6-2.0 L/kg, and an $t_{1/2}$ ranging from 8.3-11.0 h.

The pharmacokinetic results for compound 9(a) prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa indicated a T_{max} ranging from 12-24 h, a CL/F ranging from 0.06-0.2 L/h/kg, a V/F ranging from 1.0-7.5 L/kg, and a $t_{1/2}$ ranging from 11.1-48.5 h.

When insulin lispro is similarly administered to male STZ-treated rats at 568 nmol/kg, a $t_{1/2}$ of about 1 h and a CL/F of about 1.2 L/h/kg is measured.

When insulin detemir is similarly administered to male STZ-treated rats at doses ranging from 18.9-568 nmol/kg, a $t_{1/2}$ of ranging from 1.9-3.1 h and a CL/F of about 0.8-1.7 L/h/kg is observed.

Due to the complexities in the pharmacokinetics, the apparent CL ratios between detemir and exemplary PEGylated insulin lispro compounds are different depending on

-35-

the dose used for the determination. However, the studies described in Example 5 indicate that exemplary PEGylated insulin lispro compounds conjugated to 20- or 40 kDa PEG have about a 5- to 30-fold slower apparent clearance than detemir in the STZ-induced diabetic rat.

5

Example 6: Evaluation of *In Vivo* Duration of Action And Pharmacokinetic Characteristics of PEGylated insulin lispro in a Rat Model of Type 2 Diabetes

The glucodynamic activity of compound **9(a)** with a 40 kDa linear PEG is evaluated in male ZDF fa/fa rats (n=4 rats/group) following a single subcutaneous injection of vehicle control (PBS) or 517 nmol/kg of **9(a)** prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa. Serial samples are collected for both pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization. A single subcutaneous administration of 517 nmol/kg of **9(a)** prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa to male ZDF fa/fa rats is associated with statistically significant glucose lowering that is sustained for at least seven days (relative to placebo; p<0.05). Compound **9(a)** prepared using a linear mPEG-MAL having an average molecular weight of about 40 kDa exposure is also verifiable over seven days.

Example 7: Phenolic preservative titration of PEG-B28_(92.4%)A1_(7.6%)-insulin lispro, insulin lispro, or a mixture (70% PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)A1_(7.6%)-insulin lispro:30% insulin lispro) thereof with phenol in the presence of cobalt ions

PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)A1_(7.6%)-insulin lispro or insulin lispro is dissolved in a solution containing 20mM KSCN and 50 mM TRIS-ClO₄ at pH 8.0. The target concentration for either protein is ~4 mg/mL, based on protein content ($\epsilon_{280} = 1.05$ (mg/mL)⁻¹cm⁻¹). Cobalt chloride (41.9 mg) is dissolved with 1 mL of water to yielding a stock solution with a cobalt ion concentration of 0.176 M. An aliquot of the cobalt stock solution (~2 μ L depending up on the protein concentration) is added to 0.8 mL protein solution such that the final mole ratio of cobalt ion to insulin hexamer is equal to 4. To assess hexamerization, distortions in the cobalt coordination chemistry were monitored at 574 nm as function of phenolic preservative concentration. Specifically, a concentrated phenol solution (0.564 M) is titrated into 0.8 mL of protein solution using microliter aliquots such that the final volume at the end of the titration does not exceed 0.84 mL. The final solution is stirred for a minimum of 20 minutes after each aliquot of phenol and the visible spectrum of the solution is collected from 400 nm to 800 nm. The absorbance recorded at 574 nm is converted to molar extinction coefficient by dividing the absorbance by the His^{B10}-coordinated cobalt molar concentration, i.e., the hexameric

protein concentration multiplied by two based on the knowledge that the His^{B10} moieties of insulin hexamers coordinates two divalent metal ions. For the preparation of 70/30 mixtures (mole:mole) formulations of PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-insulin lispro and insulin lispro, the protein is first mixed and then cobalt is added followed by titration with phenolic preservative.

In insulin lispro the natural sequence of proline at position B28 and lysine at position B29 is reversed as compared to wild-type human insulin. This reversal leads to a conformational shift in the C-terminal end of the B chain that sterically hinders the ability of the lispro insulin monomers to form dimers. Thus, the dimer association constant is reduced by a factor of 300 as compared with that of wild-type human insulin. The results, shown in Table I, indicate that PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-insulin lispro can surprisingly and unexpectedly associate as hexameric complex in the presence of divalent metal ions and phenolic preservative analogous to formulation conditions used in Humalog®, in spite of the presence of six 20 kDa PEG moieties conjugated near the already weakened, vis-à-vis wild-type human insulin, dimerization domain of insulin lispro. Moreover, 70/30 mixtures of PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-insulin lispro and insulin lispro also demonstrate the ability to form hexameric complexes, which support the preparation of extemporaneous and/or stable premixed formulations of a basal insulin and rapid-acting insulin.

Table I:

Phenol (mM)	ε _{574nm} insulin lispro	ε _{574nm} PEG _{20kDa} -B28 _(92.4%) /A1 _(7.6%) -insulin lispro	ε _{574nm} 70/30 Mixture
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	

30

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		392	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

Example 8: Analysis of Hexameric State of PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-insulin lispro Formulated with Zn, Phenol, and/or Calcium

- 5 The chemical shelf-life and in-use stabilities of insulin and some insulin analogs benefit from the ability to form discrete hexameric complexes in solution. The ability to hexamerize insulin or insulin lispro, in the presence of divalent metal ions (Zn⁺² or Co⁺²) and phenolic preservatives (phenol or m-cresol), slows deamidation of AsnA21 and subsequently minimizes high molecular weight particle (HMWP) formation.
- 10 To assess the ability for PEG20kDa-LysB28-insulin lispro to form hexamers, PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-insulin lispro, with a starting protein concentration based on A_{276nm} = 8.6 mg insulin lispro/mL or 38.2 mg PEGylated insulin lispro conjugate/mL, at

-38-

- pH 6.7 is dialyzed in water overnight. The dialyzed protein is then diluted with water to adjust the protein concentration to 4.6 mg/mL or 20.6 mg of PEGylated protein conjugate/mL. A 4x buffer stock solution is prepared at pH 7.0, with the final the concentrations of the phosphate buffer at 40 mM and m-cresol at 12.8 mg/mL. The zinc oxide stock solution is prepared by dissolving zinc oxide in 0.5 mL of 1 N HCl then diluting with water to a final zinc concentration of 0.097 M. Solution samples for near-UV circular dichroism (CD) analysis are prepared with varying zinc concentrations (0 to 400 μ M) by mixing 450 μ L of the PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-insulin at a protein concentration of 4.6 mg/mL with aliquots of zinc stock solution (the maximum total volume of zinc stock solution added = 2.5 μ L or equivalent to 4 zinc ions per PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-insulin hexamer), and 150 μ L of the 4x phosphate buffer stock solution. The final pH is adjusted, if necessary to pH $\sim$ 7.0. Hexameric association of the PEG_{20kDa}-B28_(96%)/A1_(4%)-insulin lispro or insulin lispro is monitored in the near-UV circular dichroism at 250 nm, a region sensitive to disulfide changes, using a 0.2 cm cell.
- The mean residue ellipticity is plotted versus a ratio of moles zinc per moles hexamer.

The results, shown in Table II, further indicate that PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-insulin can surprisingly and unexpectedly associate as hexameric complex in the presence of divalent metal ions and phenolic preservative in formulation conditions analogous to those of Humalog®, in spite of the presence of six 20 kDa PEG moieties conjugated near the already weakened, relative to wild-type human insulin, dimerization domain of insulin lispro.

The impact of hexamerization and ligand binding on thermal stability of PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-insulin in hexamer promoting test formulations was also investigated with CD thermal denaturation experiments. The wavelength used for the thermal denaturation studies was 240 nm because it was found the overall signal change was greater at 240 nm than the 250 nm used in the Zn²⁺ binding studies, yet the total solution absorbance would be low enough for high quality CD data to be obtained. Thermal scan data at 240 nm in a 1 mm cuvette were collected from 5 °C to approximately 95 °C (final temperature varied slightly for each sample), with a scan rate and data pitch of 1 °C/minute, bandwidth of 1.5 nm, and response time of 8 seconds. Thermal denaturation data may be plotted as both the raw signal (mdeg at 240 nm) and the fraction apparent unfolded (F_{unf}), which is given by: $F_{unf}(T) = [Y_{obs}(T) - Y_{nat}(T)] / [Y_{unf}(T) - Y_{nat}(T)]$

where $Y_{obs}(T)$ is the observed signal as a function of temperature, and $Y_{nat}(T)$ and $Y_{unf}(T)$ are linear extrapolations of the native and unfolded baselines, respectively. The unfolding onset temperature is defined as the temperature at which F_{unf} begins to increase

31

from the native baseline ($F_{unf} = 0$), and the midpoint temperature is the temperature at which $F_{unf} = 0.5$.

CD thermal denaturation experiments performed essentially as described above indicated that the thermal stability of PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-insulin hexamers is substantially reduced compared to insulin lispro hexamers when both are similarly formulated in 16 mM TRIS, pH 7.2, 3.1 mg/ml m-cresol, and zinc. Furthermore, the CD thermal denaturation studies detected a significant calcium and chloride ion concentration dependent increase in melting temperature for PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)-insulin lispro (data not shown). More specifically, the onset temperature of unfolding was observed to be ~30 °C in 16 mM TRIS, pH 7.2, 3.1 mg/ml m-cresol, and zinc but increases dramatically to ~50 °C in the same formulation having 75 mM calcium chloride. A similar effect was observed as the r upon the addition of NaCl (25 mM to 150 mM NaCl) rather than calcium chloride to the formulation. Therefore, calcium and/or chloride may be very useful hexamer-promoting excipients in pharmaceutical compositions comprising PEG_{20kDa}-B28-insulin lispro compounds in order to increase the chemical and/or physical stability of the pharmaceutical composition upon storage.

Table II: Mean Residue Ellipticity (MRE) changes as a function Zn/hexamer ratio

Zn per hexamer (mol/mol)	MRE PEG _{20kDa} -B28 _(96%) /A1 _(4%) -insulin lispro (degrees cm ² dmol ⁻¹ residue ⁻¹)	MRE Insulin lispro (degrees cm ² dmol ⁻¹ residue ⁻¹)
0	-116.103	-172.545
0.5	-135.764	-209.347
1	-158.861	-268.082
1.5	-190.81	-315.972
2	-213.12	-378.179
3	-255.23	-426.872
4	-298.729	-471.587

Example 9: Generation of PEG_{20kDa}-B28_(~95%)/A1_(~5%)-insulin lispro

-40-

A buffer solution containing 150 mM sodium phosphate dibasic and 50 mM EDTA is mixed with 150 mM sodium phosphate tribasic to yield a buffer solution with a pH between 10.85 and 11.10 at a temperature between about 4 and 6 °C. At a temperature between about 4 and 6 °C, insulin lispro crystals (30-60 mg/mL) are slowly added to the buffer with gentle agitation to avoid formation of agglomerates during crystal dissolution.

Monomethoxypoly(ethylene glycol) p-nitrophenyl carbonate (mPEG-NPC) having PEG of a weight average molecular weight of about 20 kDa $\pm$ about 2 kDa is dissolved at a concentration from 60-120 mg/mL in chilled water (4-6 °C) by placing the required amount of chilled water in a vessel, agitating to create a vortex, and slowly pouring the mPEG-NPC powder into the eye of the vortex to ensure adequate and rapid dispersion. mPEG-NPC powder is a fine powder and upon dispersion considerable air bubbles are released into the vessel. The mPEG-NPC solution in the vessel is allowed to de-aerate between 30 to 60 minutes, depending on volume.

The insulin lispro solution prepared above is transferred to a mechanically agitated jacketed vessel. The vessel is instrumented for measurement of temperature and pH. Agitation is provided by a standard impeller operating at a Reynolds number in the turbulent regime. The mPEG-NPC (PEG) solution is metered into the vessel at rate to give a total PEG addition time of between 3 to 5 hours. The temperature of the jacket is maintained between 4 °C and 6 °C and mixing is continued. The pH of the reaction is maintained between 10.85 to 11.10 by the addition of the required amount of the 150 mM sodium phosphate tribasic buffer. The PEG is added until the final PEG:insulin lispro molar ratio is in the range between 2.5 to 4.5.

At the end of the PEG addition, the jacket temperature is raised within 60 minutes to between 25 °C and 30 °C and the reaction mixture is incubated at that temperature for about 3 to about 6 hours while maintaining the pH between about 10.7 to about 11.0. At the end of incubation period, the reaction mixture is quenched by the addition of 2x buffer (100 mM acidic acid/sodium acetate, pH 4.0) and diluted with the same 2x buffer to adjust its conductivity (2.5 mS/cm) and concentration (3-5 mg/mL).

The reaction mixture is purified using a cation exchange chromatography (CEX) column packed with an appropriate resin (e.g., Fast Flow SP Sepharose resin). The column is packed with resin to a bed height between about 15 to about 30 cm, equilibrated with 100 mM Na-Acetate (buffer A) and loaded with the diluted reaction mixture (5-8 gm product/L of resin) at low pH (about 2.5 to about 4.0) at an appropriate flow rate of between about 50 to about 90 cm/h. The mono-PEGylated product and unreacted protein preferentially bind onto the resin while multi-PEGylated by-products and excess reagents mostly pass through the column. Buffer A, with dilute salt

-41-

concentration (20-30 mM), is used to wash away any weakly adsorbing multi-PEGylated by-products, followed by gradient elution using a buffer (8-12 CV) with increased salt concentration (50-70 mM) to preferentially remove the PEGylated product away from the resin while keeping any unreacted protein onto the column. The product is collected (3-5 CV) and the column is washed with buffer A with high salt concentration (100 mM) to remove un-reacted protein.

The CEX column mainstream (3-5 CV) at 3-5 mg/mL is subjected to a tangential flow filtration to increase its concentration to 40-80 mg/mL using a standard flat sheet membrane (3-5 kDa molecular weight cut-off). The process is carried out via an initial concentration following by buffer exchanges and final concentration to the required concentration. The operating flux throughout the process is maintained between 10-20 liter per meter squared of filter area per hour (LMH) and transmembrane pressure (TMP) between about 15 to about 35 psi.

The final concentrated bulk active pharmaceutical ingredient solution is frozen at an appropriate temperature (-20 °C to -70 °C) and stored at an appropriate temperature (-20 °C to -70 °C).

Example 10: Pharmacokinetic Profiles of PEGylated Insulin Lispro in Dogs

Two-four year old female Beagle dogs, 7-10 kg body weight, are dosed subcutaneously with 18.9 nmol/kg of exemplary test compounds. Periodically, blood samples is drawn from the cephalic or saphenous vein and collected into tubes containing disodium EDTA. Plasma is collected from the vein blood sampling and a commercially available insulin radioimmunoassay was used to determine the levels of the administered drug in the plasma. Pharmacokinetic profiles and parameters were determined for each of the following exemplary compounds prepared essentially as described in Example 2: compound 11 prepared using a linear mPEG-NPC having an average molecular weight of about 40 kDa, about 30 kDa, and about 20 kDa.

Pharmacokinetic parameters were calculated using model-independent methods (WinNonlin Pro). Compound 11 prepared using a linear mPEG-NPC having an average molecular weight of about 20 kDa exhibited a time to maximum concentration (T_{max}) of approximately 12 hours, an apparent clearance rate (CL/F) of approximately 0.046 L/h/kg, a maximal concentration (C_{max}) of approximately 14 nM, and an elimination half-life ($t_{1/2}$) of approximately 14 hours.

Compound 11 prepared using a linear mPEG-NPC having an average molecular weight of about 30 kDa exhibited a T_{max} of approximately 24 h, a CL/F of approximately 0.027 L/h/kg, a C_{max} of approximately 18 nM, and a $t_{1/2}$ of approximately 23 hours.

Compound 11 prepared using a linear mPEG-NPC having an average molecular weight of about 40 kDa exhibited a T_{max} of approximately 24 h, a CL/F of approximately 0.026 L/h/kg, a C_{max} of approximately 15 nM, and a $t_{1/2}$ of approximately 20 hours.

Insulin detemir was similarly administered to female beagle dogs at a dose of 18.9 nmol/kg, and exhibited a T_{max} of approximately 1.3 hour, a CL/F of approximately 0.12 L/h/kg, a C_{max} of approximately 23 nM, and a $t_{1/2}$ of approximately 3.5 hours.

Table III lists the comparable parameters in the dog. The insulin-specific RIA utilized for these studies detects both PEGylated insulin lispro and endogenous insulin.

10 **Table III. PK parameters for PEGylated insulin lispro in dog**

Parameter	20kDa PEG-compound 11	30kDa PEG-compound 11	40kDa PEG-compound 11	Insulin 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 subcutaneous dose; n = 3/group

23

Example 11: Projection of mean ‘flatness’ and dose in humans

A key criterion for improved basal insulin therapy is the ability to achieve a truly flat profile, amenable to once daily dosing in patients. Sufficient flatness is defined as a peak-trough (PT) ratio of <2. For purposes of comparison, PT ratios calculated from published PK profiles range from ~4-9 for detemir and ~1.2-2.6 for glargine. The rat and dog PK data (see Examples 5 and 10, respectively) for the 18.9 nmol/kg dose of exemplary compounds and insulin detemir were fit to 1-CMT PK models, parameterized in terms of k_a , CL/F and V/F . Each PK parameter (P) is then fit to an allometric equation of the form $P = aBW^b$, where b is fixed at -0.25, 0.75 and 1 for k_a , CL/F and V/F , respectively, and a is a fitted parameter. Mean human estimates are obtained for each PK parameter, and simulations generated mean profiles following daily dosing in humans. Because of the similarities between the 30 kDa and 40 kDa PEGylated insulin lispro conjugates, the simulations are shown only for 20 kDa PEGylated insulin lispro, 40 kDa PEGylated insulin lispro and insulin detemir. The simulations generated indicate that the peak-trough (PT) ratios for 20 kDa and 40 kDa PEGylated insulin lispro compounds are dramatically flatter than for insulin detemir. Simulations results are shown in Figure 1.

A strategy for estimating the human dose of a PEGylated insulin lispro required for efficacy is to use a known clinical comparator (insulin detemir) as an internal control in the rat efficacy model, with the assumption that the relative potency between PEGylated insulin lispro and insulin detemir in the rat model is similar to the relative potency in the clinic. The required daily dose of PEGylated insulin lispro in the clinic can be obtained using the following equation:

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

The relative potency ratio for each of the PEGylated insulin lispro conjugates can be obtained in Table IV. The relative apparent clearance ratios for exemplary PEGylated insulin lispro/detemir in the rat, dog and human (projected) are compiled in Table V.

Table IV. Relative concentration-based potency of PEGylated insulin lispro conjugates and insulin detemir in the rat

Compound 11	Potency ratio detemir/PEGylated insulin lispro
20 kDa PEG-insulin lispro	1.34 ± 0.68
30 kDa PEG-insulin lispro	0.68 ± 0.35
40 kDa PEG-insulin lispro	0.65 ± 0.36

5 Table V. Relative CL/F ratios for insulin detemir/PEGylated insulin lispro compounds

Compound 11	CL/F Rat	CL/F Dog	CL/F Human (Projected)
20 kDa PEG-insulin lispro	5.5	2.6	3.3
40 kDa PEG-insulin lispro	4.8	4.6	4.1

Using the relative potency estimates from Table IV and the relative CL/F
10 estimates from Table V, the mean dose projections for PEGylated insulin lispro
conjugates in humans is 4.2 and 6.9 nmol/kg for the 20 kDa and 40 kDa PEGylated
insulin lispro compounds, respectively. These projections are based on a mean daily
clinical dose of 18.5 nmol/kg insulin detemir as reported for Type 2 diabetic patients in
the detemir label. When both time action and potency are considered, the maximum
15 mean clinical dose prediction for is ~3-fold lower than insulin detemir. In the best case,
the mean clinical dose estimate for the 20 kDa, 30 kDa, and 40 kDa PEGylated insulin
lispro conjugate is about 20- and about 45-fold lower than insulin detemir.

20 **Example 12: Glucose Infusion Rates after Single Administration in Healthy
Volunteers: PEG_{20kDa}-B28_(≥~95%)/A1_(≤~5%)-insulin lispro and Glargine Administration**

A three-part first-human-dose study was conducted using a single dose of
PEG_{20kDa}-B28_(≥~95%)/A1_(≤~5%)-insulin lispro (LY) prepared essentially as described in
Example 9. Part A included three study periods, in which subjects received a
subcutaneous (SC) injection of LY dose in the first period, followed by an injection of
25 insulin glargine dose (0.5 U/kg) in the second period, and then followed by an injection

34

-45-

of another LY dose in the third period. Part B was an open label, single dose, two replicate periods study in which subjects received a single dose of LY in both periods utilizing 24- and 36-hour glucose clamps. Part C was an open label, two period, single dose, fixed sequence, comparator-controlled study in which subjects received a single 0.5 mg/kg SC dose of LY in one period and a single 0.8 U/kg SC dose of insulin glargine in the other period. Subjects underwent a 24-hr glucose clamp procedure in each period in Parts A and C and a longer duration (up to 36-hr) glucose clamp procedure in each period in Part B. LY was administered subcutaneously as a single dose in Parts A, B and C as follows:

10 Part A doses: 0.0025, 0.0125, 0.075, 0.325 mg/kg body weight

 Part B doses: 0.15, 0.225 mg/kg

 Part C dose: 0.5 mg/kg

 Subjects are administered a single dose of the PEGylated insulin lispro compound or a single dose of insulin glargine (0.5 U/kg) as a comparator and another single dose of LY in the 3rd period. In all treatment periods, subjects undergo a euglycaemic clamp procedure for up to 24/36 hours following each insulin compound injection. Glucose infusion rates (GIR) are adjusted to maintain euglycaemia, with the documented GIR over time providing the GD measure of insulin action. The aim of the euglycaemic glucose clamp is to maintain euglycaemia through glucose infusion after the administration of a dose of an insulin compound. It is assumed that endogenous insulin secretion and hepatic glucose output are minimal and that any glucose that is translocated out of the glucose space (i.e., glucose metabolised) is the direct consequence of the administered exogenous insulin. The GIR in this case will be the glucodynamic (GD) measure of the insulin action over time. All glucose clamp studies are performed after an overnight fast of approximately 8 hours. On the morning of the study, a small catheter is placed into a vein of one arm, ideally in the ante-cubital fossa, for administration of 20% dextrose solution (buffered to near neutral pH) under the control of a volumetric pump. Another catheter is placed, ideally in the wrist or hand for venous glucose sampling. This area is heated with a warming device to approximately 55-60 °C for sampling arterialized venous blood. Blood samples are obtained at the bedside for immediate determination of whole blood glucose concentrations using an automated glucose oxidase technique. After basal blood sampling and a stabilization period of approximately 30 minutes, each subject receives a dose of insulin compound administered subcutaneously. The start of the subcutaneous injection of an insulin compound is defined as time zero. Following completion of dosing, in conjunction with frequent blood sampling for measurement of blood glucose, glucose is infused intravenously at a variable rate in order to maintain euglycaemia for up to 24 or 36 hours after insulin administration.

-46-

Blood sampling occurs approximately every 10 minutes for approximately 30 minutes prior to dosing and continued every 5-10 minutes for the first 2 hours after dosing (with the option to sample as frequently as every 2.5 minutes), and then reduced to 10-30 minute intervals up to the end of clamp.

5 During the glucose clamp, the glucose infusion rate is adjusted to maintain a pre-determined target blood glucose concentration for the individual subject. Preferably, the target concentration is close to the fasting blood glucose. The aim of the glucose clamp procedure is to maintain the blood glucose concentrations within +5% of the pre-dose target value, which is defined as 5 mg/dL below the mean fasting blood glucose. Thus, 10 blood glucose concentrations are kept constant while the GIR varied. Therefore, the varying glucose infusion rate reflects the activity of the test insulin compound. Blood glucose levels from samplings and infusion rate changes throughout the clamp are documented.

A study conducted essentially as described in Example 12 demonstrated, in 15 humans, that LY has features of an ideal "basal" insulin: a long duration of action, an apparent half-life ranging from 24-44 hrs and basal characteristics, i.e., a peak-trough ratio of less than 2 (Figure 2). Additionally, the duration of action for LY is longer than that of insulin glargine (Figure 2). The within subject variability in the glucodynamics was less than 30% (data not shown) which is similar to or better than glargine. Finally, 20 glucodynamic data from Part C of the study (0.5 mg/kg) resulted in a GIR profile for LY that was "peakless", maintained GD for greater than 36 hours, and exceeded the peak GIR response for glargine (0.5 U/kg; data not shown).

Example 13: Chemical and Physical Stability of PEG_{20kDa}-B28_(~95%)/A1_(~5%)-insulin lispro Pharmaceutical Compositions 25

As described in Examples 7 and 8 above, PEG_{20kDa}-B28_(~95%)/A1_(~5%)-insulin lispro can associate as a hexameric complex in the presence of divalent metal ions and phenolic preservative in formulation conditions analogous to those of Humalog[®]. 30 Accordingly, chemical and physical stability studies on PEG_{20kDa}-B28-insulin lispro formulations similar to commercial solution formulations of insulin lispro (i.e., Humalog[®] solution formulations) were conducted. Chemical stability of a test pharmaceutical formulation was considered acceptable if no significant change in various analytical properties was detected from the initial time point for the indicated storage period at the 35 different temperatures. Physical stability of a test pharmaceutical formulation was considered acceptable if upon visual assessment no particles were observed and upon

35

-47-

assessment by Thioflavin T fluorescence microscopy no fibril or gel formation was observed.

PEG_{20kDa}-B28-insulin lispro formulations containing 0.5 mole zinc per mole of PEG_{20kDa}-B28-insulin lispro, 16 mg/mL glycerin, 3.15 mg/mL m-cresol, buffered with
 5 either phosphate or citrate at pH 7.0 or pH 6.5, respectively, were prepared and tested for both chemical and physical stability. Similar formulations without zinc were tested to evaluate the impact of zinc on stability. Samples at 35°C formed gel particles after approximately 1 month of storage and samples at 25°C showed significant number of particles/bubbles formation after approximately two months of storage. Both citrate and
 10 phosphate buffered as well as zinc/no zinc formulations showed similar chemical/physical stability at the accelerated 35°C condition although citrate buffer samples appeared to be worse than phosphate buffered samples when assessed visually. Insulin lispro control formulation remained clear. Both citrate and phosphate buffered formulations demonstrated an acceptable chemical stability at 5°C for at least 13 months.

15 Subsequent investigations indicated that the phenolic preservative, m-cresol, promoted gellation when combined with PEG_{20kDa}-B28-insulin lispro composed and exposed to high temperature (> 25°C). Interestingly, when m-cresol was added to mPEG alone (activated or non-activated) gel particles did not result upon exposure to high temperature.

20 When the prototypical formulations of insulin lispro did not confer acceptable stability to PEG_{20kDa}-B28-insulin lispro compounds at elevated temperatures, pharmaceutical compositions comprising PEG_{20kDa}-B28_(~95%)/A1_(~5%)-insulin lispro compounds demonstrating improved chemical and physical stability and suitable for commercialization as a parenterally administered pharmaceutical formulation were
 25 developed.

The following formulations of PEG_{20kDa}-B28_(~95%)/A1_(~5%)-insulin lispro (15 mg/mL) demonstrated acceptable chemical and physical stability for one week at 40 °C, for one month at 30 °C, for three months at 25 °C, and for over eight months at 5 °C:

- 1) 16 mM TRIS buffer, pH 7.0-8.0, 10 mM calcium chloride, 20 mg/mL sugar
 30 (sucrose or trehalose), 3 mg/mL (28 mM) m-cresol, and 0.5 mole zinc per 1.0 mole PEG_{20kDa}-B28_(~95%)/A1_(~5%)-insulin lispro
- 2) 16 mM TRIS buffer, pH 7.0-8.0, 10 mM calcium chloride, 3 mg/mL poloxamer, 3 mg/mL (28 mM) m-cresol, and 0.5 mole zinc per 1.0 mole PEG_{20kDa}-B28_(~95%)/A1_(~5%)-insulin lispro
- 35 3) 5 mM phosphate buffer, pH 7.0, 130 mM glycerine, 3 mg/mL (28 mM) m-cresol, 3 mg/mL poloxamer, 0.3 mole zinc per 1.0 mole of PEG_{20kDa}-B28_(~95%)/A1_(~5%)-insulin lispro

-48-

Formulations of PEG_{20kDa}-B28_(~95%)/A1_(~5%)-insulin lispro containing hexamer promoting excipients, e.g., zinc, m-cresol, and calcium generally exhibited greater physical and chemical stability, especially at elevated temperatures. Addition of calcium, chloride and/or NaCl to PEG_{20kDa}-B28_(~95%)/A1_(~5%)-insulin lispro formulations containing

5 zinc and m-cresol further enhanced the physical stability of formulations exposed to temperatures of 40 °C or greater. Furthermore, phosphate and citrate buffered formulations generally exhibited less physical stability than TRIS buffered formulations.

36

-49-

We claim:

1. A PEGylated insulin lispro compound of the formula:
P-[(A)-(B)], or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:
5 A is the A-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 1);
 B is the B-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 3); and
 P is a PEG having a molecular weight in the range from about 20 kDa to
about 40 kDa, and wherein A and B are properly cross-linked and P is attached via an
urethane or thioether covalent bond to the alpha-amino group of the glycine at position 1
10 of A, the alpha-amino group of the phenylalanine at position 1 of B, or the epsilon-amino
group of the lysine at position 28 of B.
2. The compound of claim 1 wherein the PEG is attached via an urethane or thioether
covalent bond to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of B.
- 15 3. The compound of any one of claims 1 to 2 which is further characterized by having
a K_i for human insulin receptor of about 30 nM or less.
4. The compound of any one of claims 1 to 2 which is further characterized by having
20 a K_i for human insulin receptor of about 20 nM or less.
5. The compound of any one of claims 1 to 2 which is further characterized by having
a K_i for human insulin receptor of about 10 nM or less.
- 25 6. The compound of any one of claims 1 to 5 which is further characterized by having
an elimination half-life greater than about 6 hours in STZ-treated rats dosed at about 568
nmol/kg.
7. The compound of any one of claims 1 to 6 which is sufficient to lower blood
30 glucose to below 100 mg/dL in a STZ-treated rat for a period ranging from about 4 hours
to at least about 36 hours after a single subcutaneous injection of the compound at a dose
of about 568 nmol/kg.
8. The compound of any one of claims 1 to 7 which is sufficient to lower blood
35 glucose to below 100 mg/dL in a STZ-treated rat for a period ranging from about 4 hours
to at least about 48 hours after a single subcutaneous injection of the compound at a dose
of about 568 nmol/kg.

-50-

9. The compound of any one of claims 1 to 8 which is further characterized by having an elimination half-life greater than about 30 hours in a human upon a single subcutaneous dose at about 0.225 mg/kg.
- 5 10. The compound of any one of claims 1 to 9 which is further characterized by having an elimination half-life greater than about 36 hours in humans upon a single subcutaneous dose at about 0.225 mg/kg.
- 10 11. The compound of any one of claims 1 to 10 wherein the PEG has a molecular weight in the range from about 17.5 kDa to about 25 kDa.
12. The compound of any one of claims 1 to 11 wherein the PEG has a molecular weight in the range from about 20 kDa to about 25 kDa.
- 15 13. The compound of any one of claims 1 to 12 wherein the covalent bond is an urethane bond.
14. The compound of any one of claims 1 to 13 further characterized by having a pharmacokinetic, pharmacodynamic, or activity peak to trough ratio of less than 2 upon parenterally administering to a patient a therapeutically effective amount of the compound.
- 20 15. The use of a compound of any one of claims 1 to 14 for use in therapy.
- 25 16. The use of a compound of any one of claims 1 to 14 for the manufacture of a medicament for the treatment of hypoglycemia or diabetes.
17. A pharmaceutical composition comprising a compound of any one of claims 1 to 14 and one or more pharmaceutically acceptable excipients, diluents, or carriers.
- 30 18. The pharmaceutical composition of claim 17 wherein greater than about 95% of the PEGylated insulin lispro compounds are mono-PEGylated.
19. The pharmaceutical composition of any one of claims 17 to 18 wherein greater than about 90% of the PEGylated insulin lispro compounds have a PEG covalently attached to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of B.
- 35 20. The pharmaceutical composition of any one of claims 17 to 19 further comprising a TRIS buffer at a concentration in the range from about 10 mM to about 25 mM TRIS

37

-51-

wherein the pH of said pharmaceutical composition is from about pH 7.0 to about pH 8.0 and at least one isotonicity agent producing a solution with an isotonicity between about 270 mOsm and about 330 mOsm.

5 21. The pharmaceutical composition of any one of claims 17 to 20 further comprising a phosphate buffer at a concentration in the range from about 5 mM to about 10 mM and wherein the pH of said pharmaceutical composition is from about pH 7.0 to about pH 7.5 and at least one isotonicity agent producing a solution with an isotonicity between about 270 mOsm and about 330 mOsm.

10 22. The pharmaceutical composition of any one of claims 17 to 21, wherein the total concentration of PEGylated insulin lispro compounds is from about 15 mg/mL to about 40 mg/mL.

15 23. The pharmaceutical composition of any one of claims 17 to 22 further comprising a therapeutically effective amount of insulin lispro.

20 24. The pharmaceutical composition of any one of claims 17 to 23 further comprising about 130 mM m-cresol, between about 2 and about 4 moles of zinc per mole of total hexamers of insulin, insulin analog, and PEGylated insulin lispro, between about 2.5 mM and about 25 mM calcium, and a surfactant.

25 25. The pharmaceutical composition of any one of claims 17 to 24 further comprising a pharmaceutically-acceptable phenolic preservative and an amount of zinc sufficient to cause the PEGylated insulin lispro compounds to hexamerize.

30 26. The pharmaceutical composition of any one of claims 17 to 25 further comprising between about 100 mM and about 150 mM NaCl, between about 2.5 mM and about 25 mM calcium, and between about .5 mg/mL and about 5 mg/mL of poloxamer 188.

27. The pharmaceutical composition of any one of claims 17 to 26 comprising between about 1 mg/mL and about 5 mg/mL poloxamer 188.

35 28. The pharmaceutical composition of any one of claims 17 to 27 comprising between about 0.3 and 5 moles of zinc per mole of PEGylated insulin lispro.

29. A method of treating hyperglycemia or diabetes in a patient in need of such a treatment, said method comprising administering to a patient a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition of any one of claims 17 to 28.

-52-

30. The method of claim 29, wherein the patient is treated for diabetes mellitus.
31. The method of claim 29, wherein the patient is treated for gestational diabetes.
- 5 32. A process of making a PEGylated insulin lispro compound of the formula:
P-[(A)-(B)], or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:
A is the A-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 1);
B is the B-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 3); and
10 P is a PEG having a molecular weight in the range from about 20 kDa to
about 40 kDa, and wherein A and B are properly cross-linked and P is attached via an
urethane covalent bond to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of B which
comprises reacting the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of B with
15 monomethoxypoly(ethylene glycol) p-nitrophenyl carbonate (mPEG-NPC) having a
weight average molecular weight of between about 20 kDa and about 40 kDa in an
aqueous solvent at a pH between about 8.5 and about 11.5 and at between about 25°C and
about 30°C for a period of time between about 3 and about 6 hours.
33. The process of claim 32 wherein the PEG:insulin lispro molar ratio is in the range
20 between about 2.5 and about 5.0.
34. The process of claim 32 or 33 wherein the weight average molecular weight of the
mPEG-NPC is about 20 kDa.
- 25 35. The process of any one of claims 32 to 34 wherein the pH of the reaction is
maintained at between about 10.5 and about 11.5.
36. The process of any one of claims 32 to 35 wherein the reaction is conducted at
between about 25 °C and about 30 °C for about 3 hours.
- 30

38

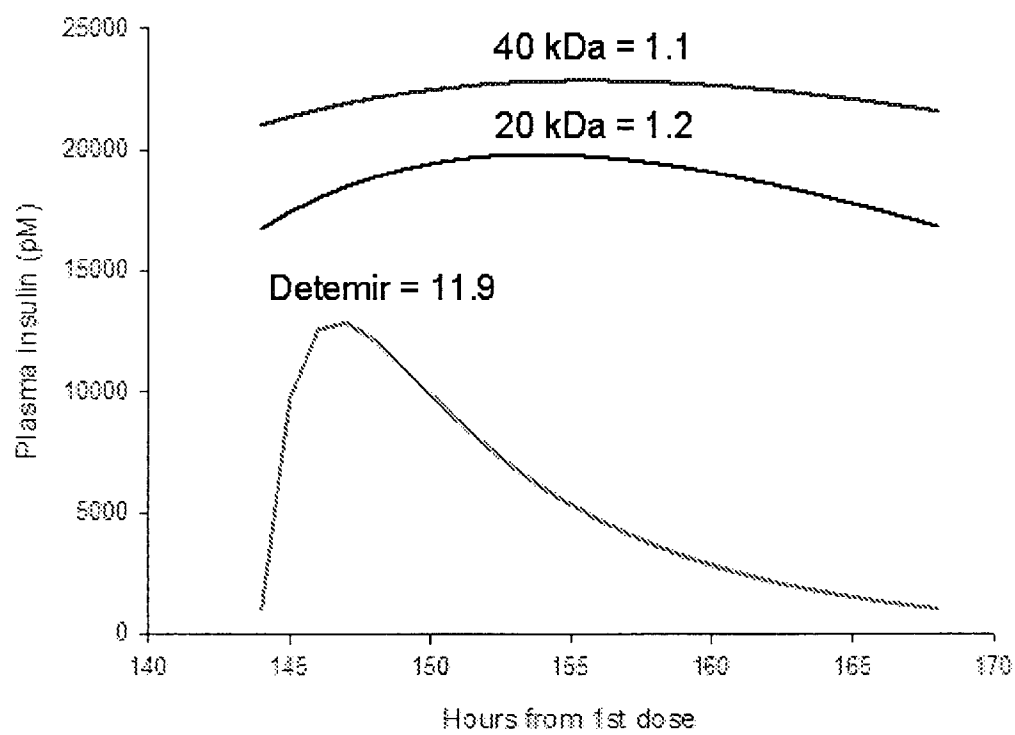


Figure 1

29

X18199OUSNat1Ph20Oct2010_ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company
<120> PEGYLATED INSULIN LISPRO COMPOUNDS
<130> X-18199.nationalphaseseqlist.20-Oct-2010
<140> PCT/US2009/046704
<141> 2009-06-09
<150> 61/061,281
<151> 2008-06-13
<150> 61/121,394
<151> 2008-12-10
<160> 6
<170> PatentIn version 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> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 3

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

AD

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

<210> 4
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa at position 1 is absent, any basic amino acid, or any
 genetically encodeable amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa at position 22 is absent, Gly, Ser, Ala, or 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> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa at position 1 is absent, any basic amino acid, or any
 genetically encodeable amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa at position 29 is Pro, Asp, Lys, Leu, Val, or Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa at position 30 is Lys or Pro

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)
 <223> Xaa at position 31 is absent or Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa at position 32 is absent

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa at position 33 is absent

<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 at position 1 is absent, or any genetically encodeable amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa at position 29 is Pro, Asp, Lys, Leu, Val, or Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa at position 30 is Lys or Pro

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa at position 31 is absent or Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa at position 32 is absent

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa at position 33 is absent

X181990USNat1Ph20Oct2010_ST25



<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

43

COMPUESTOS DE INSULINA LISPRO PEGILADA**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al campo de la diabetes. Más particularmente, la invención se refiere a compuestos de insulina lispro PEGilada que son altamente solubles y tienen un perfil de acción extendido, y a métodos para proporcionar tales moléculas, a composiciones farmacéuticas que los contienen, y al uso terapéutico de tales compuestos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Para lograr glicemia normal, la terapia de reemplazo de insulina es diseñada paralelamente tan cercanamente como sea posible, al patrón de secreción de insulina endógena en individuos normales. La demanda fisiológica diaria para insulina fluctúa y puede ser separada en dos fases: (a) la fase absorptiva que requiere un pulso de insulina para disponer del aumento de glucosa en la sangre relacionado con el alimento, y (b) la fase post-absorptiva que requiere una cantidad sostenida de insulina para regular el rendimiento de glucosa hepática para mantener la glucosa en la sangre en ayunos óptima. Por consiguiente, la terapia de insulina efectiva para diabetes en general, involucra el uso combinado de dos tipos de formulaciones de insulina

exógena: una insulina a la hora de comer, de acción rápida, proporcionada por inyecciones de bolo, y una insulina de acción prolongada, administrada por inyección una vez o dos veces diariamente para controlar los niveles de glucosa en la sangre entre alimentos.

Las terapias de reemplazo de insulina actualmente disponibles, son deficientes en uno o más aspectos clínicamente importantes. Por ejemplo, las formulaciones de insulina tradicionales intermediarias y de acción prolongada, tales como el análogo de insulina basal, insulina detemir, posee una duración de actividad que es insuficiente para proporcionar el control de glucosa basal para un día completo cuando se administra diariamente. Como un resultado, la duración de acción de insulina basal es algunas veces, insuficiente para controlar adecuadamente la hiperglicemia y, más específicamente, los requerimientos de fase post-adsorptiva, con una inyección diaria única. Además, la omisión de una inyección única de terapias actuales puede conducir a un incremento significativo en niveles "pico a canal" del fármaco, que resulta en control de glucosa deteriorado. Sin embargo, la utilización de estrategias de insolubilidad para prolongar la liberación de insulina en formulaciones de insulina tradicional intermedias y de acción prolongada, por ejemplo, suspensiones cristalinas de insulina Neutral Protamina Hagedorn (NPH) y ULTRALENTE®, o la

A4

estrategia de precipitación *in vivo* de insulina glargina, incrementan la variabilidad de intra-inyección que resulta en variabilidad incrementada en el perfil de respuesta de dosis. Más específicamente, las suspensiones NPH y ULTRALENTE® requieren mezclado mecánico para asegurar uniformidad de producto, tienen variabilidad intra-sujeto incrementada y tienden a maximizar en lugar de proporcionar un perfil de farmacodinámica "plano" ideal necesario para mantener la glucosa en la sangre en ayunos óptima por un periodo extendido de tiempo entre alimentos. Por lo tanto, las formulaciones de insulina que dependen de un estado insoluble para prolongar la distribución de insulina son inherentemente menos predecible que las formulaciones solubles y resultan en menos que el control adecuado de glucosa en la sangre y una mayor susceptibilidad a episodios hipoglicémicos que amenazan la vida. Adicionalmente, los análogos de insulina basal moderna no son fácilmente mezclables con formulaciones de insulina de rápida o intermedia acción. De este modo, las terapias de reemplazo de insulina actual, todavía dejan pacientes diabéticos susceptibles a episodios hipoglicémicos que amenazan la vida, complicaciones médicas de largo término serias de diabetes y/o imponen considerable de desventajas de inconveniencia y calidad de vida al paciente.

La Patente Estadounidense 4,179,337 titulada "Polipéptidos no Inmunogénicos" describe conjugados de

insulina a moléculas PEG lineales que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 500 y aproximadamente 20,000 Da. Hinds and Kim, describen conjugados de insulina con bajo peso molecular (600 Da, 750 Da, y 2000 Da) monometoxipoli(etilen glicol) (Hinds, K.D., and Kim, et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:505-530 (2002)). En tal artículo, los autores declaran que restringen su estudio a conjugados de insulina mPEG de bajo peso molecular "debido a que la unión de mPEG de elevado peso molecular (5000 Da) fue [previamente] encontrada por presionar la bioactividad del conjugado". La Publicación de Solicitud de Patente Internacional de PCT No. WO 2006/079641, describe la conjugación de derivados de insulina, que incluyen insulina lispro, con pequeños polímeros ramificados. La Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT No. WO 2004/091494 describe, entre otros, moléculas de insulina conjugadas a moléculas PEG lineales o ramificadas que tienen un peso molecular total de PEG hasta aproximadamente 10 ka y aproximadamente 20 kDa, respectivamente. Las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional de PCT Nos. WO 2008/015099 (publicada el 7 de Febrero de 2008) y WO 2008/084051 (publicada el 17 de Julio 2008) describen, entre otras cosas, varios análogos de insulina conjugados a moléculas PEG que tienen un peso molecular nominal en el intervalo desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 40,000 Da.

15

Claramente, existe todavía una necesidad crítica para insulinas de acción prolongada que son mejor adecuadas para regímenes de reemplazo de insulina basal. En particular, las insulinas basales solubles que son mezclables con formulaciones de insulina prandial, tienen perfiles de acción de tiempo extendido (es decir, capaz de controlar adecuadamente los niveles de glucosa en la sangre con inyección una vez diariamente o menos frecuente), actividad plana, perfiles farmacocinéticos (es decir, relaciones inferiores "pico a canal"), variabilidad intra-paciente reducida (es decir, perfil de tiempo de acción más predecible que se traduce en incidencia reducida de hipoglicemia y/o ganancia de peso) y/o reducir la irritación o dolor del sitio de inyección después de la inyección, son necesarios.

Se reporta aquí, el descubrimiento que la insulina lispro puede ser PEGilada con derivados de poli(etilenglicol) de alto peso molecular para proporcionar compuestos de insulina lispro PEGilada que tienen actividad insulina basa terapéuticamente efectiva, perfiles de tiempo de acción extendidos, son altamente solubles a pH fisiológicos y/o sin mezclables con otras formulaciones de insulina prandial comúnmente usadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un compuesto de

fórmula I:

P-[(A)-(B)], o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, en donde:

A es la cadena A de insulina lispro (SEC ID NO:1);

5 B es la cadena B de insulina lispro (SEC ID NO:3);

y

P es un PEG que tiene un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 40 kDa, y en donde A y B son apropiadamente reticulados y P está
10 unido ya sea directamente o indirectamente vía un enlace covalente al grupo alfa-amino de la glicina en la posición 1 de A, el grupo alfa-amino de la fenilalanina en la posición 1 de B, o el grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de B.

15 La presente invención también proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de compuestos de insulina lispro mono y di-PEGilados, en donde más de aproximadamente 75% de los compuestos de insulina lispro PEGilada en la composición, son compuestos mono-PEGilados de
20 Fórmula I.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden compuestos de Fórmula I de insulina mono-PEGilada, en donde más de aproximadamente 50% de los compuestos mono-PEGilados en la composición, tienen un
25 PEG covalentemente unido ya sea directamente o

46

indirectamente, al grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden insulina lispro PEGilada de Fórmula I y uno o más conservadores, agentes de isotonicidad, iones metálicos o amortiguadores, farmacéuticamente aceptables. En ciertas modalidades de la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden una insulina lispro PEGilada de Fórmula I, y uno o más conservadores, agentes de isotonicidad, iones metálicos o amortiguadores farmacéuticamente aceptables, además comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo de insulina.

La presente invención también proporciona los métodos para tratar hiperglicemia, diabetes mellitus o diabetes gestacional que comprende, administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende, un compuesto de insulina lispro PEGilada de la presente invención.

La presente invención también incluye el uso de un compuesto de insulina lispro PEGilada de la presente invención para terapia.

La presente invención también incluye el uso de un compuesto de insulina lispro PEGilada de la presente invención para la manufactura de un medicamento para el

tratamiento de hipoglicemia, diabetes mellitus o diabetes gestacional.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 La Figura 1, representa gráficamente perfiles PK humanos estimulados para insulina lispro PEG-B28 de 20 kDa, insulina lispro PEG-B28 de 40 kDa, e insulina detemir, basado en escalación alométrica de parámetros de PK a partir de ratas y perros. Los perfiles representan un intervalo de
10 dosificación después de una semana de dosificación. Los números son relaciones medias de pico-canal.

La Figura 2 es una gráfica de relaciones de infusión de glucosa (GIR) en humanos después de una dosis subcutánea de ya sea insulina lispro de PEG_{20kDa}-
15 B28 ($\geq 95\%$)/A1 ($\leq 5\%$) (LY; 0.225 mg/kg) o insulina glargina (0.5 U/kg). Los perfiles GIR se basan en datos observados y una función "loess suave" (Splus 2000, Professional Edition, MathSoft, Inc), desarrollada con Lilly Research Laboratories se usó para ajustar los datos observados.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Las siguientes abreviaturas son usadas en la presente: ACN: Acetonitrilo. Boc: *terc*-Butoxicarbonilo. BSA: albúmina de suero bovino. DCM: diclorometano,
25 metilencloruro. DMF: *N,N*-dimetilformamida. DMSO: Di-metil

ax

sulfóxido. DTT: Ditiotreitól. EDTA: ácido etilendiamina tetraacético Et: Etilo. EtOH: Etanol. Fmoc: 9-Fluorenilmetiloxycarbonilo. HCl: ácido clorhídrico. Da: Dalton. kDa: kilodalton. Lilly: Eli Lilly and Company
5 (Indianápolis, IN). mAb: anticuerpo monoclonal. Me: Metilo. MeOH: Metanol. PBS: salina amortiguada de fosfato. RP-HPLC: cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa. SEC: cromatografía de exclusión de tamaño. SEM: error estándar de la media. SPA: ensayo de proximidad de
10 escintilación. TFA: ácido trifluoroacético. Todas las abreviaturas de aminoácido usadas en esta descripción, son aquellas aceptadas por la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos como se expone en el 37 C.F.R. § 1.822(B)(2).

El término "insulina", está propuesto para abarcar
15 la insulina de tipo nativo a partir de cualquier especie que incluye, pero no se limita a, insulina porcina, insulina bovina, e insulina humana. La insulina nativa o de tipo silvestre, se refiere a insulina que tiene una secuencia de aminoácido que corresponde a la secuencia de aminoácido de la
20 insulina como se encuentra en la naturaleza. Las secuencias de aminoácido y polinucleótido que codifican la insulina a partir de un número de diferentes especies, son bien conocidas por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. Por ejemplo, la insulina humana tiene una cadena A de
25 veintiún aminoácidos y una cadena B de treinta aminoácidos

(SEC ID NOS: 1 y 2, respectivamente). La insulina puede ser natural (es decir, aislada a partir de una fuente natural), biosintéticamente o sintéticamente producida. El término "insulina" está también propuesto para incluir cualquier
5 derivado de insulina y/o análogo de insulina.

Un "análogo de insulina" o "derivado de insulina", es definido aquí como proteína que tiene actividad de insulina y sustancialmente la misma secuencia de aminoácido como la insulina humana, pero diferente de la insulina humana
10 por una modificación con relación a la insulina humana que incluye, una o más sustituciones, supresiones, inversiones o adiciones de aminoácido. Tales compuestos son bien conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional PCT Nos. WO 96/15804 y WO 03/053339;
15 Patentes Estadounidenses Nos. 3,528,960, 5,514,646, 5,618,913, 5,750,497, 6,011,007, 6,251,856; y Patentes EP Nos. 254,516 y 280,534. Una lista ejemplar pero no exhaustiva de análogos de insulina conocidos por un experto en la técnica incluyen, insulina aspart, insulina lispro, insulina
20 glargina, insulina detemir, e insulina glulisina. Además, el término "insulina" aquí, también cubre compuestos los cuales pueden ser considerados por ser tanto un derivado de insulina como un análogo de insulina. Ejemplos de tales compuestos son descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,750,497, y
25 6,011,007. Un ejemplo específico de tal compuesto conocido

por uno de habilidad en la técnica, es una insulina detemir.

Varios análogos y/o derivados de insulina, son conocidos por ser análogos de insulina de "acción acelerada" o "acción rápida". Los términos de "acción acelerada" y "rápida acción", son usados intercambiablemente en la presente. Un "análogo de insulina de rápida acción", produce un efecto de glucosa prandial que (a) comienza prontamente después de la administración subcutánea que la insulina humana, y/o (b) exhibe una duración de acción más corta que la insulina humana después de la administración subcutánea. Los análogos de insulina de acción acelerada ejemplares incluyen, "análogos de insulina monomérica" que son de acción acelerada debido a que son en general, menos propensos a dimerización o auto-asociación bajo condiciones fisiológicas. Los análogos de insulina monoméricos son conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,700,662, y Patente Europea No. 214 826. La insulina lispro es un análogo de insulina monomérica de acción rápida en la cual, la prolina en la posición 28 de la cadena B de insulina de tipo nativa (SEC ID NO:2) y la lisina en la posición 29 de la cadena B de insulina de tipo nativa (SEC ID NO:2), han sido cambiadas. Por consiguiente, la insulina lispro se conoce en la técnica por varias designaciones que incluyen, pero no se limitan a, insulina humana Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana LysB28ProB29, e insulina humana B28Lys, B29Pro.

El término "reticulado" significa enlaces disulfuro que existen entre residuos de cisteína. Por ejemplo, la insulina humana reticulada apropiadamente contiene un enlace disulfuro entre la cisteína en la posición 7 de la SEC ID NO: 1 y la cisteína en la posición 7 de la SEC ID NO: 2, entre la cisteína en la posición 20 de la SEC ID NO. 1 y la cisteína en la posición 19 de la SEC ID NO: 2, y entre la cisteína en la posición 6 de la SEC ID NO: 1 y la cisteína en la posición 11 de la SEC ID NO: 1. De manera similar, un compuesto de insulina lispro apropiadamente reticulado, contiene un enlace disulfuro entre la cisteína en la posición 7 de la SEC ID NO: 1 y la cisteína en la posición 7 de la SEC ID NO: 3, entre la cisteína en la posición 20 de la SEC ID NO. 1 y la cisteína en la posición 19 de la SEC ID NO: 3, y entre la cisteína en la posición 6 de la SEC ID NO: 1 y la cisteína en la posición 11 de la SEC ID NO: 3.

Como se usa en la presente, "insulina lispro conjugada a PEG", o "insulina lispro PEGilada", se refiere a insulina lispro humana o un derivado del mismo covalentemente unido en al menos, un PEG y que posee actividad de insulina *in vivo*.

Las actividades biológicas de insulina e insulina lispro están bien establecidas. La frase "actividad de insulina" con respecto a un compuesto de insulina lispro PEGilada de la presente invención, está propuesta por

AA

significar la capacidad para reducir significativamente los niveles de glucosa en la sangre en al menos, un modelo de animal *in vivo* generalmente aceptado que incluye, pero no se limita a, los modelos animales de diabetes Tipo 1 y Tipo 2 descritos abajo en el Ejemplo 5 y Ejemplo 6, respectivamente. Por lo tanto, la actividad de insulina incluye la capacidad de un compuesto de insulina lispro PEGilada para reducir la glucosa en la sangre a un nivel de 100 mg/dl o por debajo de una rata tratada con STZ por un periodo que varía desde aproximadamente 4 horas por al menos aproximadamente 36 horas después de una inyección subcutánea única a una dosis de 568 nmol/kg.

El término "polietilenglicol" o "PEG", se refiere a un compuesto polialquilenglicol o un derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento o derivatización con porciones de acoplamiento o activación. En su forma típica, el PEG es un polímero lineal con grupos hidroxilo terminales y tiene la fórmula $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$. El número de unidades de repetición "n" en el PEG es aproximadamente para la masa molecular descrita en Daltons. Típicamente, los reactivos PEG usados para preparar compuestos PEGilados comprenden, una mezcla heterogénea de PEGs que tienen un número diferente (n) de unidades de etilenglicol en el polímero PEG. Una subunidad de etilenglicol única $(-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}))$ de PEG, tiene un peso molecular de aproximadamente 44 Daltons. Por lo tanto, el

peso molecular del polímero PEG depende del número (n). Los PEGs unidos a los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención, tendrán n en el intervalo desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 1000 subunidades.

5 Preferiblemente, los PEGs unidos a los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención, tendrán un n en el intervalo desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 750. Más preferiblemente, los PEGs unidos a los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención, tendrán un
10 n en el intervalo desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 550. Más preferiblemente, los PEGs unidos a los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención, tendrán un n de aproximadamente 400 y aproximadamente 500.

15 Numerosos derivados de PEG y métodos para elaborarlos y conjugarlos a una proteína tal como una insulina o insulina lispro, son conocidos en la técnica y son adecuados para uso en la presente invención. Véase por ejemplo, Pubs. De Solicitud de Patente Internacional PCT Nos.
20 WO 01/62827, WO 2006/028745, WO 2006/096535, WO 2006/036825; Zalipsky, S. *Bioconjugate Chem.* 6:150-165, 1995; Veronese, et al., *Applied Biochem. and Biotech.* 11:141-152, 1985; y Roberts, M. et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:459-476, 2002. Un PEG particularmente preferido para uso en la
25 invención, es un PEG que tiene un extremo del polímero que

80

termina con un grupo relativamente inerte, tal como un grupo alcoxí C_{1-6} inferior. Preferiblemente, el PEG es un monometoxi-PEG (comúnmente referido como mPEG), el cual está en una forma lineal de PEG, en donde un término del polímero es un grupo metoxi ($-OCH_3$). Aún más preferiblemente, el PEG usado en la invención, es un "mPEG activado", en el cual, un extremo del PEG lineal termina con un grupo metoxi y el otro extremo termina con un grupo reactivo apropiado para acoplamiento a un sitio deseado en una insulina lispro o en un derivado de insulina lispro derivatizado para facilitar la PEGilación con un mPEG activado deseado en un sitio específico de la molécula de insulina lispro.

Debido a que los PEGs son típicamente generados y usados como mezclas de compuestos PEG que varían en algún grado en su peso molecular, uno de habilidad ordinaria en la técnica en general, describe el peso molecular de un PEG unido a un compuesto describiendo el tamaño promedio del reactivo PEG usado en la reacción de PEGilación que genera el compuesto PEGilado particular. Entre las muchas formas posibles de reportar promedios, existen tres comúnmente usados: el número promedio, el peso promedio y los pesos molecular z-promedios. Como se usa en la presente, la fase "peso molecular promedio", está propuesta para referirse al peso molecular promedio en peso, el cual puede ser medido usando técnicas bien conocidas en el arte que incluyen, pero

no se limitan a, Espectrometría de masas de desorción asistida por laser y tiempo de ionización de vuelo (MALDI-TOF), cromatografía de permeación en gel u otras técnicas de cromatografía líquida, técnicas de dispersión de luz, ultracentrifugación y viscometría. La fórmula para calcular el peso molecular promedio ponderado, puede ser representada como $\sum(M_i^2 N_i) / \sum(M_i N_i)$ en donde N_i es la fracción en mol (o la fracción en número) de moléculas con peso molecular M_i en la mezcla. La fórmula para calcular el número en peso de la molécula promedio puede ser representada como $\sum(M_i N_i) / \sum(N_i)$ en donde N_i es la fracción en mol (o fracción en número) de moléculas con peso molecular M_i en la mezcla. La relación del peso molecular promedio ponderado y número de peso molecular promedio ponderado, se conoce como el índice de polidispersidad (PDI), y proporciona una basta indicación de la amplitud de la distribución. Los reactivos PEG adecuados para preparar los compuestos de insulina lispro PEGilada de la invención, son típicamente polidispersos (es decir, número de peso molecular promedio y peso molecular promedio ponderado de los polímeros no son iguales). Preferiblemente, el PDI para reactivos PEG usados para preparar los compuestos o composiciones de la presente invención, es menos de aproximadamente 1.1. Más preferiblemente, el PDI para reactivos PEG usados para preparar los compuestos o composiciones de la presente invención es menos de

51

aproximadamente 1.05.

Con respecto a los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención, el PEG covalentemente unido a una molécula de insulina lispro, tiene un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 17.5 kDa hasta aproximadamente 40 kDa (n está en el intervalo desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 1000) o el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17.5 kDa y aproximadamente 40 kDa. Preferiblemente, el PEG covalentemente unido a una molécula de insulina lispro tiene un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 20 kDa hasta aproximadamente 30 kDa (n está en el intervalo desde aproximadamente 450 hasta aproximadamente 750) o el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa hasta aproximadamente 30 kDa. Más preferiblemente, el PEG covalentemente unido a una molécula de insulina lispro tiene un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 17.5 kDa hasta aproximadamente 25 kDa (n está en el intervalo desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 550) o el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17.5 kDa y aproximadamente 25 kDa. Mayormente preferiblemente, el PEG covalentemente unido a una molécula de insulina lispro tiene un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 17.5 kDa hasta aproximadamente 20 kDa (n está en el intervalo desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 500) o el PEG

tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17.5 kDa hasta aproximadamente 20 kDa.

En ciertas modalidades, los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención, son preparados uniendo covalentemente un mPEG activado de un peso molecular promedio deseado a la insulina lispro. Las condiciones de reacción para PEGilación de la insulina lispro variarán, dependiendo del PEG particular empleado, el sitio de unión en la insulina lispro, el tipo particular de grupo reactivo en la insulina lispro que es el objetivo para unión, el grado deseado de PEGilación, y similares, y pueden fácilmente ser determinados por uno de habilidad en la técnica. Las condiciones experimentales optimizadas para una estrategia de PEGilación particular pueden ser fácilmente determinadas, típicamente por experimentación de rutina, por un experto en la técnica.

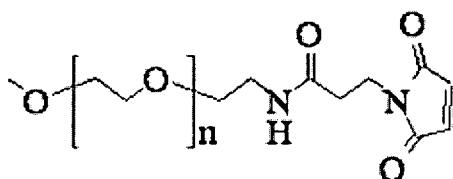
En modalidades preferidas, los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención, son preparados conjugando indirectamente un mPEG activado que es relativamente tiol-selectivo tal como un mPEG-maleimida (mPEG-MAL) o un mPEG-tiol (mPEG-SH) a la insulina lispro, conjugando el mPEG activado tiol-selectivo a una funcionalidad tiol que ha sido introducida en la insulina lispro usando modificadores de "amina-a-tiol", tales como N-succinimidil-S-acetilthiopropionato (SATP) y N-succinimidil-S-

SV

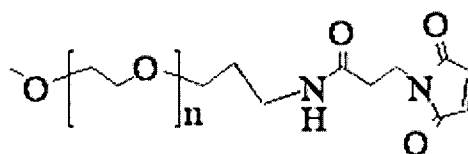
acetiltioacetato (SATA). Más preferiblemente, el mPEG activado empleado para unir covalentemente un PEG a un grupo tiol (sulfhidrilo) en una insulina lispro, es un mPEG-maleimida tal como (a), (b), o (c) mostrado abajo.

5

(a)

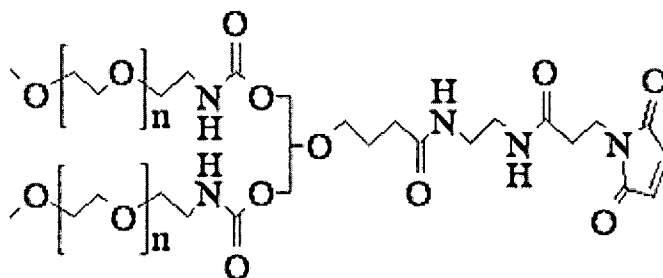


(b)



10

(c)



15

Un método preferido para preparar compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención, utiliza la adición Michael para formar un enlace tioéter estable. La reacción es altamente específica y toma lugar bajo condiciones medias en la presencia de otros grupos funcionales. Por ejemplo, la mPEG-maleimida es útil como un mPEG activado para preparar conjugados de insulina lispro PEGilada de la presente invención. Preferiblemente, el

20

25

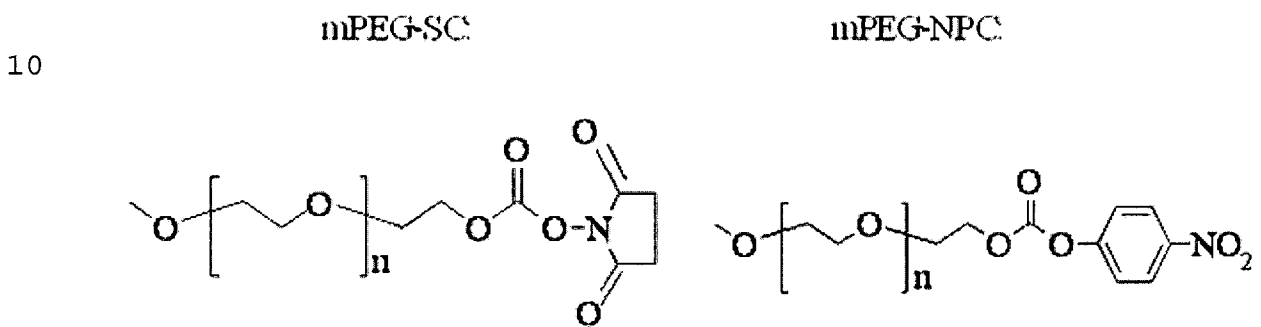
procedimiento de PEGilación usa un exceso molar de una insulina lispro derivada de tiol con relación a mPEG-maleimida para accionar la reacción a terminación, Preferiblemente, las reacciones también son realizadas entre
5 pH 4.0 y 6.9 a temperatura ambiente por 1 a 40 horas. El exceso de péptido que contiene tiol no PEGilado, es fácilmente separado del producto PEGilado por métodos de separación convencional. Condiciones ejemplares requeridas para PEGilación de insulina lispro usando mPEG-maleimida
10 activada, son descritas en el Ejemplo 1.

En ciertas modalidades, los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención, son preparados conjugado un mPEG activado que es relativamente específico para aminas. Los mPEG activados adecuados para principalmente
15 PEGilación específica de amina de insulinas lispro incluyen, mPEG-succinimidil propionato (mPEG-SPA), succinimidil butanoato de mPEG (mPEG-SBA), mPEG-succinimidil α -metilbutanoato (mPEG-SMB), mPEG-succinimidil carbonato (mPEG-SC), mPEG-carbonato de benzotriazol, y mPEG-p-nitrofenil
20 carbonato (mPEG-NPC).

En modalidades preferidas de la invención, el mPEG activado usado para PEGilación de insulina lispro resulta en una insulina lispro covalentemente unida a un mPEG a través de un enlace covalente hidrolíticamente estable, tal como un
25 enlace amida, uretano (también conocido como un carbamato),



amina, tioéter (también conocido como disulfuro), o urea (también conocido como carbamida). Más preferiblemente, el mPEG activado usado para PEGilación de insulina lispro es mPEG-SC o mPEG-NPC, ambos de los cuales resultan en una insulina lispro siendo covalentemente unida al PEG a través de un enlace uretano (o carbamato). Condiciones ejemplares empleadas para PEGilación de insulina lispro usando mPEG-NPC de varios pesos moleculares se exponen en el Ejemplo 2.



15 Los compuestos de insulina lispro PEGilada de la invención, son típicamente purificados usando una o más técnicas de purificación tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción

20 hidrofóbica, y/o cromatografía de fase inversa. La heterogeneidad total de compuestos de insulina lispro PEGilada (número y proporción de compuestos de insulina lispro PEGilada generados a partir de una reacción de PEGilación) en una muestra, puede ser valorada usando uno o

25 más de los siguientes métodos: cromatografía, electroforesis,

espectrometría de masas, y en particular, MALDI-MS, y espectroscopía de NMR.

La insulina lispro usada para preparar los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención, pueden ser preparados por cualquiera de una variedad de técnicas de síntesis peptídicas reconocidas que incluyen, métodos de solución de fase, métodos de fase sólida, métodos semi-sintéticos y métodos de ADN recombinante. Por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,700,663 (Chance, et al.) y Patente Europea No. 214 826 (Brange et al.), describen la preparación de varios análogos de insulina. Las cadenas A y B de insulina lispro, también pueden ser preparadas vía una molécula precursora similar a proinsulina usando técnicas de ADN recombinante. En modalidades preferidas, un precursor similar a proinsulina es usado para hacer la insulina lispro usada para elaborar la insulina lispro PEGilada de la presente invención.

La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:

$P-[(A)-(B)]$, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, en donde:

A es la cadena A de insulina lispro (SEC ID NO: 1);

B es la cadena B de insulina lispro (SEC ID NO: 3); y

P es un PEG que tiene un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 17.5 kDa hasta

SA

aproximadamente 40 kDa, y en donde A y B son apropiadamente reticulados y P está unido ya sea directamente o indirectamente vía un enlace covalente al grupo alfa-amino de la glicina en la posición 1 de la cadena A, del grupo alfa-amino de la fenilalanina en la posición 1 de la cadena B, o el grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B. Compuestos preferidos de la invención, son aquellos en los cuales (a) P está covalentemente unido a insulina lispro vía un enlace uretano o tioéter; y (b) el compuesto es caracterizado por tener un K_i para el receptor de insulina humana de aproximadamente 30 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 10 nM, o aproximadamente 5 nM o menos, una vida media de eliminación mayor de aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, o aproximadamente 14 horas en una rata tratada con STZ dosificada a aproximadamente 568 nmol/kg, o por la actividad de reducción de glucosa en la sangre a un nivel de aproximadamente 100 mg/dL o por abajo en una rata tratada con STZ por un periodo que varía desde aproximadamente 4 horas hasta al menos aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 108 horas, o aproximadamente 120 horas después de una inyección subcutánea única del compuesto a una dosis de aproximadamente 568

nmol/kg. Compuestos aún más preferidos, son aquellos en los cuales: (a) P está covalentemente unido a insulina lispro vía un enlace uretano; (b) el compuesto es caracterizado por tener un K_i para el receptor de insulina humana de

5 aproximadamente 10 nM o menos; (c) el compuesto es caracterizado por tener una vida media de eliminación mayor de 6 horas en una rata tratada con STZ dosificada a aproximadamente 568 nmol/kg; y (d) el compuesto es

10 caracterizado por la actividad de reducción de glucosa en la sangre a un nivel de aproximadamente 100 mg/dL o por abajo en una rata tratada con STZ por un periodo que varía desde aproximadamente 4 horas hasta al menos aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas,

15 aproximadamente 108 horas, o aproximadamente 120 horas después de una inyección subcutánea única del compuesto a una dosis de aproximadamente 568 nmol/kg. Compuestos más preferidos son aquellos en los cuales: (a) P está covalentemente unido a insulina lispro vía un enlace uretano;

20 (b) el compuesto es caracterizado por tener un K_i para el receptor de insulina humana de aproximadamente 10 nM o menos; (c) el compuesto es caracterizado por tener una vida media de eliminación mayor de 6 horas en una rata tratada con STZ dosificada a aproximadamente 568 nmol/kg; (d) el compuesto es

25 caracterizado por la actividad de reducción de glucosa en la

62

sangre a un nivel de aproximadamente 100 mg/dL o por abajo en una rata tratada con STZ por un periodo que varía desde aproximadamente 4 horas hasta al menos aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 108 horas, o aproximadamente 120 horas después de una inyección subcutánea única del compuesto a una dosis de aproximadamente 568 nmol/kg, y (e) el compuesto es caracterizado por tener una vida media de eliminación mayor de aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 36 horas, 38 horas, aproximadamente 40 horas, o aproximadamente 42 horas en un humano, después de la administración de una dosis parenteral única a 0.225 mg/kg.

De conformidad con características y principios consistentes con la invención, una modalidad de la invención proporciona un compuesto de insulina lispro mono-PEGilada que comprende un PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17.5 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, o aproximadamente 40 kDa covalentemente unido directamente o indirectamente, al grupo alfa-amino de glicina en la posición 1 de la cadena A de insulina lispro (insulina lispro PEG-GlyA1), del grupo alfa-amino de la fenilalanina en la

posición 1 de la cadena B de insulina lispro (insulina lispro PEG-PheB1), o el grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de insulina lispro (insulina lispro PEG-LysB28). Preferiblemente, la insulina lispro

5 mono-PEGilada comprende un PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17.5 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, o aproximadamente 40 kDa unido ya sea directamente o indirectamente, al grupo alfa-amino de fenilalanina en la

10 posición 1 de la cadena B de insulina lispro o el grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de insulina lispro. Más preferiblemente, la insulina lispro mono-PEGilada comprende un PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 17.5 kDa, aproximadamente 20 kDa,

15 aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, o aproximadamente 40 kDa unido al grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de insulina lispro. Aún más preferiblemente, la insulina lispro mono-PEGilada comprende un PEG que tiene un peso molecular promedio de

20 aproximadamente 17.5 kDa; o aproximadamente 20 kDa unido al grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de insulina lispro (insulina lispro de 20 kDa-PEG-LysB28). Más preferiblemente, la insulina lispro mono-PEGilada comprende un PEG que tiene un peso molecular

25 promedio de aproximadamente 20 kDa unido al grupo epsilon-

sb

amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de insulina lispro (es decir, insulina lispro PEG₂₀ kDa-LysB28).

Otras modalidades de la invención, proporcionan un compuesto de insulina lispro mono-PEGilada que comprende un

5 PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 17.5 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, o aproximadamente 40 kDa covalentemente unido directamente o indirectamente, al grupo alfa-amino de glicina en la posición 1 de la cadena A de

10 insulina lispro, del grupo alfa-amino de la fenilalanina en la posición 1 de la cadena B de insulina lispro, o el grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de insulina lispro. Preferiblemente, la insulina lispro mono-PEGilada comprende un PEG que tiene un peso molecular de

15 aproximadamente 17.5 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa, o aproximadamente 40 kDa unido ya sea directamente o indirectamente, al grupo alfa-amino de fenilalanina en la posición 1 de la cadena B de insulina lispro o el grupo

20 epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de insulina lispro. Más preferiblemente, la insulina lispro mono-PEGilada comprende un PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 17.5 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 30 kDa, o aproximadamente 40 kDa unido al

25 grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la

cadena B de insulina lispro. Más preferiblemente, la insulina lispro mono-PEGilada comprende un PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa unido al grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B de insulina lispro y la insulina lispro PEG-LysB28- es
5 caracterizada por tener una vida media de eliminación mayor de aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 38 horas,
10 aproximadamente 40 horas, o aproximadamente 42 horas en un humano, después de la administración de una dosis subcutánea única de la composición a 0.225 mg/kg.

En otra modalidad, la invención proporciona composiciones que comprenden, una mezcla de compuestos de
15 insulina lispro PEGiladas en donde la unión del PEG ocurre a diferentes sitios y/o a una mezcla de compuestos de insulina lispro mono-PEGilada, di-PEGilada y tri-PEGilada. Composiciones ejemplares de conformidad con la invención, son aquellas que comprenden más de un compuesto de insulina
20 lispro PEGilada, seleccionados a partir del grupo que consiste de 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, y vii)
25 insulina lispro di-PEG-GlyA1PheB1. Más preferiblemente,

SA

composiciones de la presente invención comprenden una mezcla de Compuestos de insulina lispro PEGilada en donde mayor de aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 97% de los

5 compuestos de insulina lispro PEGilada son compuestos de insulina lispro mono-PEGilada de Fórmula I. Aún más preferiblemente, composiciones de la presente invención comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilada en donde mayor de aproximadamente 80%,

10 aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 97% de los compuestos de insulina lispro PEGilada son compuestos de insulina lispro mono-PEGilada y menos de aproximadamente 20%, aproximadamente 15%, aproximadamente 10%, aproximadamente 5%, o aproximadamente 3%

15 los compuestos totales de insulina lispro PEGilada son dipegilados. Aún más preferiblemente, composiciones de la presente invención comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilada en donde mayor de aproximadamente 80%,

20 aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 97% de los compuestos de insulina lispro PEGilada son insulina lispro PEG-LysB28. Aún más preferiblemente, composiciones de la presente invención comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilada en donde mayor de aproximadamente 80%,

25 aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente

95%, o aproximadamente 97% de los compuestos de insulina lispro PEGilada son insulina lispro PEG-LysB28 y menos de aproximadamente 20%, aproximadamente 15%, aproximadamente 10%, aproximadamente 5%, o aproximadamente 3% de los compuestos totales de insulina lispro PEGilada son insulina lispro PEG-GlyA1. Aún más preferiblemente, composiciones de la presente invención comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilada en donde mayor de aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 97% de los compuestos de insulina lispro PEGilada son insulina lispro PEG-LysB28, menos de aproximadamente 20%, aproximadamente 15%, aproximadamente 10%, aproximadamente 5%, o aproximadamente 3% de los compuestos totales de insulina lispro PEGilada son insulina lispro PEG-GlyA1 y menos de aproximadamente 10%, aproximadamente 5%, o aproximadamente 3% de los compuestos totales de insulina lispro PEGilada son compuestos de insulina lispro di-PEGilada. Aún más preferiblemente, composiciones de la presente invención comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilada en donde aproximadamente 80% de los compuestos totales de insulina lispro PEGilada son insulina lispro PEG-LysB28, aproximadamente 10% son insulina lispro PEG-GlyA1, y aproximadamente 10% es insulina lispro di-PEG-GlyA1LysB28. Aún más preferiblemente, composiciones de la presente

58

invención comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilada en donde aproximadamente 90% o más de los compuestos totales de insulina lispro PEGilada son insulina lispro PEG-LysB28, aproximadamente 5% o menos son insulina lispro PEG-GlyA1, y aproximadamente 5% o menos es insulina lispro di-PEG-GlyA1LysB28. Aún más preferiblemente, composiciones de la presente invención comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilada en donde aproximadamente 90% o más de los compuestos totales de insulina lispro PEGilada son insulina lispro PEG-LysB28, aproximadamente 5% o menos son insulina lispro PEG-GlyA1, aproximadamente 5% o menos es insulina lispro di-PEG-GlyA1LysB28 y en donde la insulina lispro PEG-LysB28 es caracterizada por tener una vida media de eliminación mayor de aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 40 horas, o aproximadamente 42 horas en un humano, después de la administración de una dosis subcutánea única de la composición a 0.225 mg/kg. Más preferiblemente, composiciones de la presente invención comprenden una mezcla de compuestos de insulina lispro PEGilada en donde aproximadamente 95% o más de los compuestos totales de insulina lispro PEGilada son insulina lispro PEG-LysB28, aproximadamente 5% o menos son insulina lispro PEG-GlyA1, y

la insulina lispro PEG-LysB28 es caracterizada por tener una vida media de eliminación mayor de aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 36, 5 aproximadamente 38 horas, aproximadamente 40 horas, o aproximadamente 42 horas en un humano, después de la administración de una dosis subcutánea única de la composición a 0.225 mg/kg.

El término "condiciones básicas" como se usa en la presente, se refiere a la basicidad de la reacción de 10 PEGilación. A insulina lispro más selectivamente PEGilada en la lisina en la posición 28 de la cadena B de insulina lispro, la reacción debe llevarse a cabo con el grupo alfa-amino de insulina lispro sustancialmente desprotonados. En un 15 solvente acuoso o co-solvente, las condiciones básicas significan que la reacción se lleva a cabo a un pH mayor de 7.0. Preferiblemente, la reacción de PEGilación se conduce a pH desde aproximadamente 8.5 hasta aproximadamente 11.5. En un solvente orgánico, la reacción se lleva a cabo en la 20 presencia de una base con una basicidad equivalente a un pKa mayor de o igual a 10.75 en agua.

La presente invención también incluye un proceso para elaborar un compuesto de insulina lispro PEGilada de la fórmula:

25 P-[(A)-(B)], o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable,

en donde:

A es la cadena A de insulina lispro (SEC ID NO: 1);

B es la cadena B de insulina lispro (SEC ID NO: 3); y

P es un PEG que tiene un peso molecular en el
5 intervalo desde aproximadamente 20 kDa hasta aproximadamente
40 kDa, y en donde A y B son apropiadamente reticulados y P
está unido vía un enlace covalente uretano al grupo epsilon-
amino de la lisina en la posición 28 de B, el cual comprende
hacer reaccionar el grupo epsilon-amino de la lisina en la
10 posición 28 de B, con monometoxipoli(etilen glicol) p-
nitrofenil carbonato (mPEG-NPC), que tiene un peso molecular
promedio ponderado entre aproximadamente 20 kDa y
aproximadamente 40 kDa en un solvente acuoso a un pH entre
aproximadamente 8.5 y aproximadamente 11.5 y a una
15 temperatura de reacción entre aproximadamente 25°C y
aproximadamente 30°C. Preferiblemente, el pH de la reacción
se mantiene entre aproximadamente 10.5 y aproximadamente
11.1, la reacción de pegilación se conduce a una temperatura
entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 30°C por un
20 período de tiempo entre 2 y aproximadamente 12 horas y la
relación de mPEG-NPC a insulina lispro está en el intervalo
entre aproximadamente 1.0 y aproximadamente 5.0. Más
preferiblemente, el peso molecular promedio ponderado del
mPEG-NPC es aproximadamente 20 kDa, el pH de la reacción se
25 mantiene entre aproximadamente 10.5 y aproximadamente 11.1,

la reacción de pegilación se conduce a una temperatura entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 30°C por un período de tiempo entre aproximadamente 2 y aproximadamente 12 horas, y la relación de mPEG-NPC a insulina lispro está en el
5 intervalo entre aproximadamente 1.0 y aproximadamente 5.0. Aún más preferiblemente, la relación molar de PEG:insulina lispro está en el intervalo entre aproximadamente 2.5 y aproximadamente 4.5, el peso molecular promedio ponderado del mPEG-NPC es aproximadamente 20 kDa, el pH de la reacción se
10 mantiene entre aproximadamente 10.5 y aproximadamente 11.1, la reacción de pegilación se mantiene entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 30°C por un período de tiempo entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6 horas. Más preferiblemente, la relación molar de PEG:insulina lispro
15 está en el intervalo entre aproximadamente 2.6 y aproximadamente 4.5, el peso molecular promedio ponderado del mPEG-NPC es aproximadamente 20 kDa, el pH de la reacción se mantiene entre aproximadamente 10.5 y aproximadamente 11.0, y la temperatura de la reacción se mantiene entre
20 aproximadamente 25°C y aproximadamente 30°C por aproximadamente 3 horas.

Si se desea, compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención que tienen diferentes pesos moleculares, pueden ser aislados usando varias técnicas
25 conocidas por un experto en la técnica que incluyen, pero no

se limitan a, cromatografía de filtración en gel y/o cromatografía de intercambio iónico. Es decir, la cromatografía de filtración en gel, puede ser usada para fraccionar compuestos mono-PEGilados, di-PEGilados y tri-PEGilados de insulina lispro PEGilada, en base a sus diferentes pesos moleculares (en donde la diferencia corresponde esencialmente al peso molecular promedio del PEG usado en la reacción de PEGilación). Por ejemplo, en una reacción ejemplar en donde una insulina lispro es conjugada a un mPEG activado que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa, la mezcla de reacción resultante puede contener insulina lispro no modificada que tiene un peso molecular de aproximadamente 5,808 Daltons, insulina lispro mono-PEGilada que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 25,808 Daltons, insulina lispro di-PEGilada que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 45,808 Daltons kDa, e insulina lispro tri-PEGilada que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 65,808 Daltons. Sin embargo, debido a que las técnicas de filtración en gel separan compuestos basados en tamaño hidrodinámico, la insulina lispro mono-PEGilada conjugada a un mPEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa, migrará durante la filtración de gel como una proteína de aproximadamente 82 kDa, debido a que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 25,808 Daltons. Un experto en la

técnica podría esperar especies di y tri-PEGiladas con un peso molecular promedio mPEG de aproximadamente 20 kDa por tener una migración muy diferente o tiempos de retención que permiten su purificación y/o cuantificación.

5 La frase "vida media del plasma", se refiere al tiempo tomado para que la concentración de plasma del fármaco en el cuerpo caiga por la mitad. Un término alternativamente usado es "vida media de eliminación", el cual corresponde a la relación lineal log terminal de eliminación. Aquellos de
10 habilidad en la técnica, aprecian que la vida media es un parámetro derivado que cambia como una función de tanto separación como volumen de distribución. Los términos "extendido", "prolongado" o "incrementado", usados en el contexto de vida media del plasma o vida media de
15 eliminación, son usados intercambiabilmente en la presente, y están propuestos por significar que existe un incremento estadísticamente significativo en la vida media de un compuesto de prueba (por ejemplo, una insulina lispro PEGilada) con relación a aquella de la molécula de referencia
20 (por ejemplo, insulina lispro), como determinada bajo condiciones comparables.

La separación es la medida de la capacidad del cuerpo para eliminar un fármaco. Una separación reduce debido a, por ejemplo, modificaciones a un fármaco, la vida media
25 podría esperarse que incremente. Sin embargo, esta relación

61

recíproca es exactamente solamente cuando no existe cambio en el volumen de distribución. Una relación aproximada útil entre la vida media lineal-log terminal ($t_{1/2}$), separación (CL), y volumen de distribución (V), se da por la ecuación: $t_{1/2} \sim$
5 0.693 (V/CL). La separación no indica cuanto fármaco está siendo removido sino, preferentemente, el volumen de fluido biológico tal como sangre o plasma que podría haber estado completamente libre de fármaco para considerar la eliminación. La separación es expresada como un volumen por
10 unidad de tiempo.

El término "tratamiento" o "tratar" como se usa en la presente, se refiere al manejo y cuidado de un paciente que tiene diabetes o hiperglicemia, u otra condición por la cual la administración de insulina está indicada para
15 propósitos de combatir o aliviar síntomas y complicaciones de estas condiciones. El tratamiento incluye, administrar compuestos o composiciones de la presente invención para prevenir el comienzo de síntomas o complicaciones, aliviar los síntomas o complicaciones, o eliminar la enfermedad,
20 condición o trastorno. El paciente a ser tratado es un mamífero, y preferiblemente, un ser humano.

Los compuestos de insulina lispro PEGilada de Fórmula I, son efectivos en el tratamiento de hiperglicemia administrando a un paciente en necesidad del mismo, una
25 cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de

Fórmula I. Como se usa en la presente, la frase "cantidad terapéuticamente efectiva", se refiere a tal cantidad de un compuesto de insulina lispro PEGilada de Fórmula I, o composiciones de la misma, suficientes para regular la glucosa en la sangre en un paciente. Preferiblemente, una cantidad terapéuticamente efectiva de una insulina lispro PEGilada de Fórmula I, es desde aproximadamente 0.01 nmol/kg hasta aproximadamente 100 nmol/kg. Más preferiblemente, una cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 50 nmol/kg. Aún más preferiblemente, una cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 20 nmol/kg. Aún más preferiblemente, una cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 10 nmol/kg. Aún más, preferiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 7.5 nmol/kg. Aún más, preferiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 5 nmol/kg. Más preferiblemente, una cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 5 nmol/kg. Sin embargo, se entiende que la cantidad del compuesto o composición de insulina lispro PEGilada que comprende uno o más compuestos de insulina lispro PEGilada actualmente administrada, será determinado por un especialista en vista de las

circunstancias relevantes que incluyen, la condición a ser tratada (es decir, la causa de la hiperglicemia), las especies particulares de insulina lispro PEGilada o mezcla particular de compuestos de insulina lispro PEGilada a ser
5 administrada, otros fármacos, insulinas o de otro modo, a ser co-administrada, la ruta parenteral de administración elegida, la edad, peso y respuesta del paciente individual y la severidad de los síntomas del paciente. Por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriores no están
10 propuestos para limitar el campo de la invención en cualquier manera.

La frase "suficiente para regular la glucosa en la sangre", significa que la administración de un compuesto o composición a un paciente, resulta en un nivel de glucosa de
15 plasma en ayunas normal. Un nivel de glucosa de plasma en ayunas clínicamente normal es 70-110 mg/dL. Un nivel de glucosa en el plasma postprandial clínicamente normal es menos de 140 mg/dL.

Los cambios químicos covalentes en la estructura de
20 insulina son conocidos por ocurrir después del almacenamiento. Esto puede conducir a la formación de moléculas la cuales son menos activas y potencialmente inmunogénicas tales como productos de desaminación y productos de transformación de peso molecular superior (por
25 ejemplo, dímeros, oligómeros, polímeros). Un estudio

comprehensive sobre la estabilidad química de la insulina se da en Jens Brange in "Stability of Insulin", Kluwer Academic Publishers, 1994. La vida media de los productos de insulina es principalmente comprometida por la formación de agregados solubles (dímeros, oligómeros y polímeros) con el tiempo, debido al hecho de que las composiciones de insulina son típicamente almacenadas a una temperatura baja de no más de aproximadamente 2-8 °C, la cual mejora la vida de anaquel considerablemente comparada con el almacenaje, por ejemplo, a temperatura ambiente. Además, los productos de insulina son sometidos a la formación de agregados insolubles (fibrilos), como un resultado de sacudimiento, por ejemplo, cuando se lleva a cabo en la bolsa de un paciente o durante el transporte. Es esencial para la calidad de un producto de insulina, que la tendencia a formar tales agregados solubles e insolubles como un resultado de influencias químicas o físicas, se reduzca a un mínimo absoluto. Por lo tanto, las composiciones de insulina deben demostrar características de estabilidad química y física para ser usadas terapéuticamente.

El término "estabilidad", como se usa en la presente, se refiere a la estabilidad física y/o química de las formulaciones de compuestos de insulina lispro PEGilada. La inestabilidad física de una formulación de insulina lispro PEGilada, puede ser causada por agregación de las moléculas

B

de proteína para formar polímeros de orden superior o aún precipitados. Una formulación "estable" es una en donde el grado de agregación de proteínas es aceptablemente controlado, y no incrementa inaceptablemente con el tiempo.

5 En ciertas modalidades de la invención, una formulación de insulina lispro PEGilada es considerada estable durante un cierto periodo de tiempo si el grado de agregación está dentro de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% o 30% del grado de agregación observado en el material de
10 partida. En ciertas modalidades de la invención, una formulación de insulina lispro PEGilada es considerada estable durante un cierto periodo de tiempo si la actividad biológica del polipéptido es al menos aproximadamente 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% o 50% de la
15 actividad observada con el material de partida.

El término "estabilidad química" como se usa en la presente, se refiere a la tendencia de una composición de insulina lispro PEGilada para formar agregados de proteína soluble durante el almacenaje a bajas temperaturas de
20 aproximadamente 2-8°C o a temperaturas elevadas de aproximadamente 20-40°C. La estabilidad química de un compuesto de insulina lispro PEGilada de la invención, puede ser medida determinando los atributos analíticos en la formulación bajo condiciones específicas, tales como a una
25 temperatura particular y condición de humedad durante un

cierto periodo de tiempo. Los atributos analíticos que pueden ser medidos incluyen, la formación de especies de alto peso molecular usando HPLC de exclusión de tamaño por ejemplo. Los resultados pueden entonces ser monitoreados y comparados
5 contra parámetros pre-especificados.

El término "estabilidad física" como se usa en la presente, se refiere a la tendencia de una composición de insulina lispro PEGilada para formar agregados de proteína insoluble como un resultado de una acción física tal como
10 sacudimiento de una composición de insulina lispro PEGilada. La estabilidad física de compuestos de insulina lispro PEGilada de la invención después del almacenaje por un periodo definido de tiempo a varias temperaturas en varias formulaciones farmacéuticas, puede ser valorada por métodos
15 bien conocidos en la técnica, que incluyen medición de una atenuación de luz aparente de la muestra (absorbancia o densidad óptica). Tal medición de atenuación de luz se refiere a la turbidez de una formulación. La turbidez se produce por agregación o precipitación de proteínas o
20 complejos en la formulación. Otros métodos para valorar la estabilidad física son bien conocidos en la técnica, e incluyen valoraciones visuales de presencia o ausencia de partículas detectando formación de fibrilo/gel por microscopio de fluorescencia de Tioflavina T.

25 Otras modalidades de la invención proporcionan

64

composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un paciente, particularmente a un ser humano, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto de insulina lispro PEGilada de Fórmula I y uno o
5 más excipientes, diluyentes, amortiguadores, iones metálicos o portadores farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones farmacéuticas son típicamente, aunque no necesariamente, parenterales en naturaleza y pueden ser preparadas por cualquiera de una variedad de técnicas usando
10 excipientes, amortiguadores, diluyentes, iones metálicos o portadores convencionales, para productos parenterales los cuales son bien conocidos en el arte.

Debido a que los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención son muy solubles en agua,
15 una composición farmacéutica de la presente invención, incluye una composición que comprende agua como el solvente primario, compuestos de insulina lispro PEGilada a una concentración total de al menos 1 mg/mL, al menos 2 mg/mL, al menos 5 mg/mL, al menos 10 mg/mL, al menos 15 mg/mL, al menos
20 20 mg/mL, al menos 25 mg/mL, al menos 30 mg/mL, al menos 35 mg/mL, al menos 40 mg/mL, al menos 45 mg/mL, al menos 50 mg/mL, o más y un amortiguador farmacéuticamente aceptable en donde la composición farmacéutica tiene un pH desde aproximadamente 4.0 hasta aproximadamente 8.5.
25 Preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente

invención tiene un pH entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 8.5. Más preferiblemente, una composición farmacéutica de la invención, comprende compuestos de insulina lispro PEGilada a una concentración total en el
5 intervalo desde aproximadamente 2.5 mg/mL hasta aproximadamente 60 mg/mL y un amortiguador en donde la composición tiene un pH en el intervalo desde aproximadamente 6.0 hasta aproximadamente 8.5. Más preferiblemente, una composición farmacéutica de la invención, comprende
10 compuestos de insulina lispro PEGilada a una concentración en el intervalo desde aproximadamente 5 mg/mL hasta aproximadamente 50 mg/mL y un amortiguador, en donde la composición farmacéutica tiene un pH en el intervalo desde aproximadamente 6.5 hasta aproximadamente 7.5. Aún más
15 preferiblemente, una composición farmacéutica de la invención, comprende compuestos de insulina lispro PEGilada a una concentración en el intervalo desde aproximadamente 10 mg/mL hasta aproximadamente 40 mg/mL y un amortiguador, en donde la composición farmacéutica tiene un pH en el intervalo
20 desde aproximadamente 6.5 hasta aproximadamente 7.5. Aún más preferiblemente, una composición farmacéutica de la invención, comprende compuestos de insulina lispro PEGilada a una concentración en el intervalo desde aproximadamente 15 mg/mL hasta aproximadamente 40 mg/mL y un amortiguador, en
25 donde la composición farmacéutica tiene un pH en el intervalo

5

desde aproximadamente 7.0 hasta aproximadamente 7.5, o desde aproximadamente 7.0 hasta aproximadamente 8.0. Aún más preferiblemente, una composición farmacéutica de la invención, además comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una insulina. Aún más preferiblemente, la insulina es un análogo de insulina. Aún más preferiblemente, el análogo de insulina es un análogo de insulina de rápida acción. Más preferiblemente, el análogo de insulina de rápida acción es insulina lispro.

10 El término "amortiguador", se refiere a una solución que resiste cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados de ácido-base. Preferiblemente, los amortiguadores empleados son amortiguadores farmacéuticamente aceptables. La frase "amortiguador farmacéuticamente
15 aceptable", se refiere a una solución que es segura para usar en formulaciones de insulina y que tiene el efecto de controlar el pH de la composición farmacéutica al pH deseado. En modalidades preferidas, el amortiguador tiene un pH en el intervalo desde aproximadamente 6.0 hasta aproximadamente
20 8.5. Más preferiblemente, el amortiguador tiene un pH en el intervalo desde aproximadamente 7.0 hasta aproximadamente 8.0. Amortiguadores farmacéuticamente aceptables para controlar el pH de las composiciones de la presente invención en este intervalo incluyen, pero no se limitan a, agentes
25 tales como amortiguadores de fosfato, acetato, citrato,

arginina, TRIS e histidina, así como también a combinaciones de los mismos. "TRIS" se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-1,3,-propandiol, y a cualquier sal del mismo farmacológicamente aceptable. La base libre y la forma de clorhidrato (es decir, TRIS-HCl), son dos formas comunes de TRIS. El TRIS también es conocido en la técnica como trimetilol aminometano, trometamina, y tris(hidroximetil)aminometano. Preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende desde aproximadamente 2.5 mM hasta aproximadamente 50 mM de amortiguador de fosfato o TRIS. Más preferiblemente, composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 20 mM de amortiguador de fosfato o TRIS. Aún más preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 10 mM de amortiguador de fosfato. Aún más preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende aproximadamente 5 mM de amortiguador de fosfato. Aún más preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende aproximadamente 7.5 mM y aproximadamente 50 mM de amortiguador TRIS. Aún más preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 25 mM de amortiguador

TRIS. Aún más preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende entre aproximadamente 15 mM y aproximadamente 20 mM de amortiguador TRIS. Muy preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente
5 invención comprende aproximadamente 16 mM de amortiguador TRIS.

Los compuestos y composiciones de insulina lispro PEGilada de la invención, pueden ser formulados análogamente con formulaciones conocidas de insulinas que son
10 administradas a pacientes parenteralmente. Tales formulaciones son conocidas por un experto en la técnica. Preferiblemente, los compuestos de insulina lispro PEGilada de Fórmula I, son formulados análogamente con la formulación de insulina lispro HUMALOG® o Humulin®. Por lo tanto, una
15 composición farmacéutica preferida de la presente invención puede comprender agua, un compuesto de insulina lispro PEGilada de Fórmula I, un agente de isotonicidad y un amortiguador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, una composición farmacéutica de la invención, además
20 comprende un conservador farmacéuticamente aceptable. Más preferiblemente, una composición farmacéutica de la invención, además comprende un catión divalente tal como zinc y/o cobalto, el cual puede facilitar la hexámerización de insulina. Aún más preferiblemente, una composición
25 farmacéutica de la invención, además comprende al menos un

agente estabilizante de hexámero. Además, el ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio, pueden ser agregados para ajustar el pH.

Un "agente de isotonicidad", es un compuesto que es fisiológicamente tolerado e imparte tonicidad adecuada a una formulación para prevenir el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con una composición farmacéutica administrada. El glicerol, el cual es también conocido como glicerina, es comúnmente usado como un agente de isotonicidad. Otros agentes de isotonicidad incluyen i) otros alcoholes de azúcar tales como pero no limitado a, manitol y sorbitol, ii) sales tales como pero no limitadas a, NaCl, iii) monosacáridos que incluyen, pero no se limitan a, dextrosa y iv) disacáridos que incluyen, pero no se limitan a lactosa, sacarosa y trehalosa. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir uno o más agentes de isotonicidad. Preferiblemente, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, tienen uno o más agentes de isotonicidad los cuales producen una formulación con una isotonicidad en el intervalo de aproximadamente 270 y aproximadamente 330 mOsm. Más preferiblemente, el(los) agente(s) de isotonicidad es glicerol, sorbitol, sucrosa, NaCl, trehalosa y/o manitol. Aún más preferiblemente, el agente de isotonicidad es glicerol, sorbitol, sucrosa, NaCl, y/o trehalosa. Aún más

69

preferiblemente, glicerol, sorbitol, sucrosa, NaCl, o trehalosa a una concentración desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 200 mM está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Aún más

5 preferiblemente, glicerol a una concentración desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 200 mM está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Aún más preferiblemente, glicerol a una concentración desde aproximadamente 150 hasta aproximadamente

10 180 mM está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Aún más preferiblemente, glicerol a una concentración desde aproximadamente 130 hasta aproximadamente 175 mM está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Aún más preferiblemente, NaCl a una

15 concentración desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 300 mM está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Aún más preferiblemente, NaCl a una concentración desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 200 mM está presente en las composiciones farmacéuticas de la

20 presente invención. Más preferiblemente, NaCl a una concentración de aproximadamente 150 mM está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden también contener un compuesto estabilizante

25 de hexámero. Las frases "compuesto estabilizante de

hexámero", se refiere a un compuesto de peso molecular menor, no proteináceo que estabiliza los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención en un estado de asociación hexamérica. Los iones de calcio, zinc, cobalto, cobre, níquel, hierro, magnesio, manganeso, aniones, particularmente, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato y compuestos fenólicos, particularmente fenil, conservadores fenólicos, resorcinol, 4'-hidroxiacetaniluro, 4-hidroxibenzamida, y 2,7-dihidroxinaftaleno, son compuestos estabilizantes de hexámero conocidos por moléculas de insulina. Preferiblemente, el compuesto estabilizante de hexámero es fenol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, metilparabeno, calcio, cloruro, o una combinación de dos o más de estos compuestos. Más preferiblemente, el compuesto estabilizante de hexámero es fenol, m-cresol, calcio, cloruro o una combinación de los mismos. Preferiblemente, una composición farmacéutica de la invención, comprende entre aproximadamente 1 mM y 75 mM calcio, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 50 mM calcio, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 25 mM calcio, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM calcio, entre aproximadamente 2.5 mM y aproximadamente 30 mM calcio, entre aproximadamente 2.5 mM y aproximadamente 15 mM calcio, entre aproximadamente 2.5 mM y aproximadamente 10 mM calcio, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 30 mM calcio, entre aproximadamente 5 mM y

aproximadamente 15 mM calcio. Más preferiblemente, una composición farmacéutica de la invención, comprende entre aproximadamente 2.5 mM y 10 mM de calcio.

Las formulaciones de uso múltiple de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, pueden también contener un conservador. El término "conservador", se refiere a un compuesto agregado a una formulación farmacéutica para actuar como un agente anti-microbiano. Entre conservadores conocidos en la técnica por ser efectivos y aceptables en formulaciones parenterales son están, cloruro de benzalconio, bencetonio, clorohexidina, fenol, m-cresol, alcohol bencílico, metilparabeno, propilparabeno, clorobutanol, o-cresol, p-cresol, clorocresol, nitrato fenilmercúrico, timerosal, ácido benzoico y varias mezclas de los mismos. Ciertos conservadores fenólicos, tales como metilparabeno, fenol y m-cresol, son conocidos por enlazarse a la insulina y a moléculas similares a insulina y con ello, inducir los cambios conformacionales que incrementan ya sea la estabilidad física o química, o ambos (Véase, por ejemplo, Birnbaum, D. T., et al., *Pharmaceutical. Res.* 14:25-36 (1997); Rahuel-Clermont, S., et al., *Biochemistry* 36:5837-5845 (1997)). "Conservador fenólico", incluye los compuestos fenol, m-cresol o cresol, p-cresol, clorocresol, metilparabeno, y mezclas de los mismos. El conservador usado

en las formulaciones de los compuestos de insulina lispro
PEGilada de la presente invención, puede ser un conservador
fenólico, y puede ser el mismo como, o diferente del
compuesto estabilizante de hexámero. Preferiblemente, el
5 conservador fenólico es m-cresol o fenol. Más
preferiblemente, composiciones farmacéuticas de la presente
invención comprenden fenol y/o m-cresol, a una
concentración desde aproximadamente 0.1 hasta
aproximadamente 75 mM como un conservador a un pH desde
10 aproximadamente 7.0 hasta aproximadamente pH 8.0. Aún más
preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente
invención comprende fenol y/o m-cresol a una concentración
desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 60 mM como un
conservador a un pH desde aproximadamente 7.0 hasta
15 aproximadamente pH 8.0. Aún más preferiblemente, una
composición farmacéutica de la presente invención comprende
fenol y/o m-cresol a una concentración desde aproximadamente
10 hasta aproximadamente 40 mM como un conservador a un pH
desde aproximadamente 7.0 hasta aproximadamente pH 8.0. Aún
20 más preferiblemente, una composición farmacéutica de la
presente invención comprende fenol y/o m-cresol a una
concentración de aproximadamente 30 mM a un pH desde
aproximadamente 7.0 hasta aproximadamente pH 8.0. Más
preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente
25 invención comprende fenol y/o m-cresol a una concentración

9

de aproximadamente 30 mM a un pH desde aproximadamente 7.3 hasta aproximadamente pH 7.5.

Como se mencionó anteriormente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender

5 cationes metálicos divalentes tales como zinc o cobalto, que accionan la hexámerización de insulina o de otro modo, estabilizan los compuestos de insulina. "Cation metálico divalente", significa el ión o iones que participan para formar un complejo con una multiplicidad de moléculas de

10 proteína. Los metales de transición, los metales alcalinos y los metales alcalino térreos, son ejemplos de metales que son conocidos por formar complejos con compuestos de insulina. Los metales de transición son preferidos. Preferiblemente, el catión de metal divalente es uno o más

15 de los cationes seleccionados del grupo que consiste de zinc, cobre, cobalto, níquel, manganeso, magnesio, cadmio, y hierro. Más preferiblemente, el zinc es el catión de metal divalente. El zinc es conocido por facilitar la formación de hexámeros de insulina y de varios análogos y/o derivados de

20 insulina, que incluyen insulina lispro. El papel primario de cationes divalentes tales como zinc o cobalto en composiciones farmacéuticas de la presente invención, es facilitar la formación de hexámeros de los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención y/o

25 cualquiera de otras insulinas o análogos de insulina en una

composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina lispro PEGilada de la presente invención. En la presencia de un conservador fenólico, la formación de hexámero puede ser facilitada llevando el pH de una solución

5 que comprende formulaciones farmacéuticas de la presente invención, en la región neutral en la presencia de iones de Zn(II), o agregando Zn(II) después que el pH ha sido ajustado a la región neutral. Preferiblemente, la relación de zinc a compuesto de insulina, análogo de insulina y/o

10 compuesto lispro de insulina PEGilada, es unido al límite inferior por aproximadamente 0.33, esto es, dos átomos de zinc por hexámero de insulina, hexámero análogo de insulina y/o hexámero de insulina lispro PEGilada. Más preferiblemente, la relación de zinc a compuesto de

15 insulina, análogo de insulina, y/o compuesto de insulina lispro PEGilada es desde aproximadamente 0.33 hasta aproximadamente 0.67. Aún más, el zinc puede ser usado durante el proceso si un compuesto que compite con la proteína para enlace de zinc, tal como citrato o fosfato,

20 está presente. El exceso de zinc arriba de la cantidad necesaria para hexámerización, puede ser deseable para accionar más fuertemente la hexámerización, por ejemplo, una relación de compuesto de zinc a insulina, análogo de insulina, y/o compuesto de insulina lispro PEGilada desde

25 aproximadamente 0.33 hasta aproximadamente 0.83. También,

el exceso de zinc arriba de la cantidad necesaria para hexámerización puede estar presente en una composición farmacéutica de la presente invención, y puede ser deseable para mejorar la estabilidad química y física, para mejorar la "suspendabilidad", y posiblemente para extender la acción del tiempo además. Por otro lado, cantidades excesivas de zinc en amortiguadores de citrato o fosfato, podría conducir a precipitación de citrato de zinc o fosfato de zinc, respectivamente, así como también insulina.

De conformidad con la presente invención, el zinc puede estar presente en la formulación en una cantidad desde aproximadamente 0.3 moles hasta aproximadamente 3 moles por mol de insulina, análogo de insulina y hexámero de insulina lispro PEGilada. Más preferiblemente, el zinc está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención en una cantidad desde aproximadamente 0.3 mol hasta aproximadamente 1 mol por mol de insulina total, análogo de insulina, y hexámero de insulina lispro PEGilada. Aún más preferiblemente, el zinc está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención en una cantidad desde aproximadamente 0.3 mol hasta aproximadamente 0.7 mol por mol de insulina total, análogo de insulina, y Hexámero de insulina lispro PEGilada. Más preferiblemente, el zinc está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención en una cantidad desde aproximadamente 0.3 mol hasta

aproximadamente 0.55 mol por mol de insulina, análogo de insulina, y Hexámero de insulina lispro PEGilada. El compuesto de zinc que proporciona zinc para la presente invención, puede ser cualquier compuesto de zinc
5 farmacéuticamente aceptable. La adición de zinc a las preparaciones de insulina se conoce en la técnica, como son fuentes farmacéuticamente aceptables de zinc. Preferiblemente, el zinc se proporciona como una sal, tal como sulfato de zinc, cloruro de zinc, acetato de zinc,
10 citrato de zinc, óxido de zinc o nitrato de zinc.

En una modalidad adicional de invención, la composición farmacéutica de la presente invención además comprende uno o más tensoactivos. El término "tensoactivo" como se usa en la presente, incluye agentes que reducen la
15 tensión de superficie de un líquido por adsorción en la interfaz aire-líquido. Ejemplos de tensoactivos incluyen, sin limitación, tensoactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 80 o polisorbato 20); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Triton™ (por ejemplo,
20 Triton™X-100); polietil glicol; polipropil glicol; y copolímeros de etileno y propilen glicol (por ejemplo, pluronics, PF68). Por ejemplo, el tensoactivo puede estar presente en una composición farmacéutica de la presente invención en una cantidad desde aproximadamente 0.001-0.5%,
25 por ejemplo, desde aproximadamente 0.05-0.3%.

21

Preferiblemente, el tensoactivo usado en la composición farmacéutica de la presente invención es poloxámero 188. Más preferiblemente, el tensoactivo es poloxámero 188 a una concentración entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 10 mg/mL, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg/mL, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 mg/mL, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10 mg/mL, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10 mg/mL, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 mg/mL, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 mg/mL, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 mg/mL, y entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5 mg/mL.

La invención también proporciona un compuesto de insulina lispro PEGilada de Fórmula I, o un sal del mismo farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de hipoglicemia y/o diabetes, preferiblemente, en humanos.

La invención también proporciona un compuesto de insulina lispro PEGilada de Fórmula I, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable para uso en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de hipoglicemia y/o diabetes, preferiblemente, en humanos.

Composiciones farmacéuticas que comprenden una insulina lispro PEGilada de conformidad con la presente invención, pueden ser administradas parenteralmente a pacientes en necesidad de tal tratamiento. La administración

parenteral puede ser realizada por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa similar a pluma, o inyector de impulso mecánico. Alternativamente, la administración
5 parenteral puede ser realizada por medio de una bomba de infusión.

Preparación 1

Insulina lispro GlyA1-HSCH₂CH₂CO (3) e insulina lispro LysB28-
10 HSCH₂CH₂CO- (4)

Una mmol cada una de Trt-SCH₂CH₂CO-OH, N-hidroxisuccinimida (NHS), y diisopropilcarbodiimida (DIC), se mezcla en 2 mL DMF por 30 minutos para preparar éster de Trt-SCH₂CH₂CO-NHS. Un décimo de mmol de insulina lispro se
15 disuelve en 10 mL de trietilamina al 5% (TEA) en DMSO. A la solución se agregan 0.2 mmol de Trt-SCH₂CH₂CO-NHS activado. Después de 2 horas a temperatura ambiente, se agregan 0.2 mL de etanolamina para terminar la reacción. La mezcla de reacción entonces se diluye con 90 mL de H₂O y se aplica sobre
20 una columna RP-C18 para purificación. Las fracciones deseadas de insulina lispro-LysB28-Trt-SCH₂CH₂CO (2), son combinadas y liofilizadas. Separadamente, las fracciones deseadas de insulina lispro-GlyA1-Trt-SCH₂CH₂CO (1), son combinadas y liofilizadas. Un décimo de mmol de (1) o (2) se disuelve en 5
25 mL de TFA que contiene 0.2 mL de tioanisol y 0.4 mL de

AL

triisopropil-silano. Después de 30 minutos, se remueve el TFA por evaporación y el péptido residual se toma en 50 mL de ACN al 10% en H₂O. La solución restante es aplicada a una columna RP-C18 por purificación. Las fracciones deseadas de (3) o (4) son combinadas y, opcionalmente, liofilizadas.

Preparación 2

Insulina lispro-PheB1-HSCH₂CH₂CO (7)

Un décimo de mmol de insulina lispro se disuelve en 10 mL de 5% de TEA en DMSO. A la solución se agregan 0.2 mmol de di-terc-butilcarbonato en DMSO. Después de 1 hora a temperatura ambiente, se agregan 0.2 ml de etanolamina para terminar la reacción. La mezcla de reacción es entonces diluida con 90 mL de H₂O y aplicada sobre una columna RP-C18 para purificación. Las fracciones deseadas de Boc-GlyA1, insulina lispro-Boc-LysB28, son combinadas y liofilizadas para proporcionar (5). Un décimo de (5) se disuelve en 10 mL de 5% de TEA en DMSO. A la solución se agregan 0.2 mmol de Trt-SCH₂CH₂CO-NHS activado. Después de 2 horas a temperatura ambiente, se agregan 0.2 ml de etanolamina para terminar la reacción. La mezcla de reacción es entonces diluida con 90 mL de H₂O y aplicada sobre una columna RP-C18 por purificación. Las fracciones deseadas son combinadas y liofilizadas para proporcionar Trt-SCH₂CH₂CO-PheB1, Boc-GlyA1, insulina lispro-Boc-LysB28 (6). Un décimo mmol de (6) se disuelve en 5 ml de

TFA que contiene 0.2 ml de tioanizol y 0.4 ml de triisopropilsilano. Después de 30 minutos, el TFA se remueve por evaporación y el péptido residual se toma en 50 ml de ACN al 10% en H₂O. La solución resultante se aplica a una columna
5 RP-C18 por purificación. Las fracciones deseadas son combinadas y liofilizadas para proporcionar (7).

Ejemplo 1: PEGilación de intermediarios de insulina lispro derivatizados de tiol

10 Monometoxi-PEG-MAL que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa (b), 30 kDa (a), 40 kDa (a), o 60 kDa (c), se disuelve en una mezcla 1:1 de 100 mM de amortiguador NH₄Ac (pH 4.69) y ACN. Un polvo liofilizado de una insulina lispro derivatizada de tiol, por ejemplo, el
15 compuesto (3), (4), o (7), se agrega a la solución. La reacción puede ser seguida por RP-HPLC analítico. Cuando la reacción se completa (usualmente después de aproximadamente 4 horas), la mezcla se diluye con H₂O y se aplica sobre una columna RP-HPLC por purificación. Las fracciones deseadas con
20 combinadas y liofilizadas para proporcionar los compuestos de insulina lispro PEGilada. Los compuestos de insulina lispro PEGilada ejemplares preparados como se describe en el Ejemplo 1 son mostrados abajo como (8(a)), (8(b)), (9(a)), (9(b)), (10(a)), (10(b)), y (15(c)). Preferiblemente, estos
25 compuestos de insulina lispro PEGiladas tendrán n en el

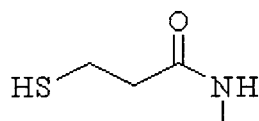
intervalo desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 1000. Más preferiblemente, estos compuestos de insulina lispro PEGiladas tendrán n en el intervalo desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 750. Más

5 preferiblemente, estos compuestos de insulina lispro PEGiladas tendrán n en el intervalo desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 550. Aún más preferiblemente, estos compuestos de insulina lispro PEGiladas tendrán n de aproximadamente 400 y aproximadamente 500. Aún más

10 preferiblemente, estos compuestos de insulina lispro PEGiladas tendrán n de aproximadamente 450 y aproximadamente 500. Más preferiblemente, estos compuestos de insulina lispro PEGiladas tendrán n de aproximadamente 450.

15

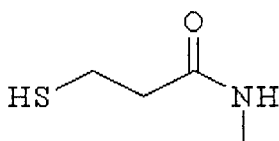
(3)



insulina lispro GlyA1[N(alfa)]

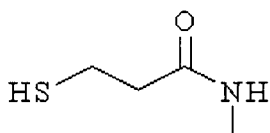
20

(4)



insulina lispro LysB28[N(epsilon)]

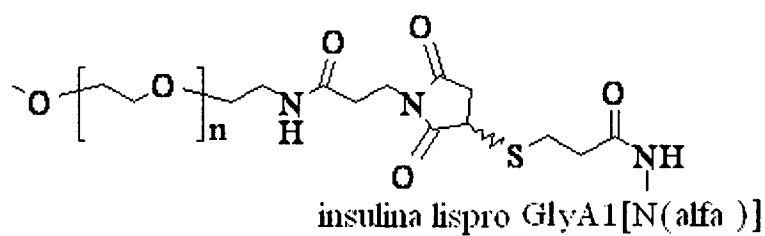
(7)



insulina lispro PheB1[N(alfa)]

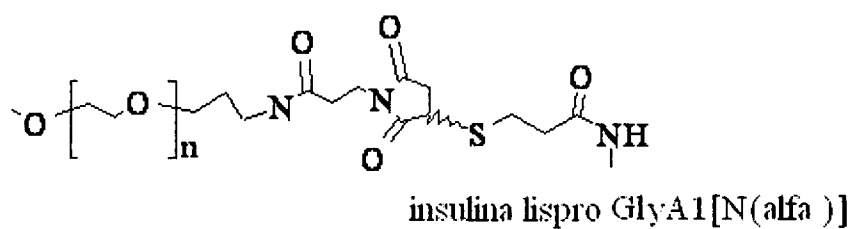
(8(a))

5



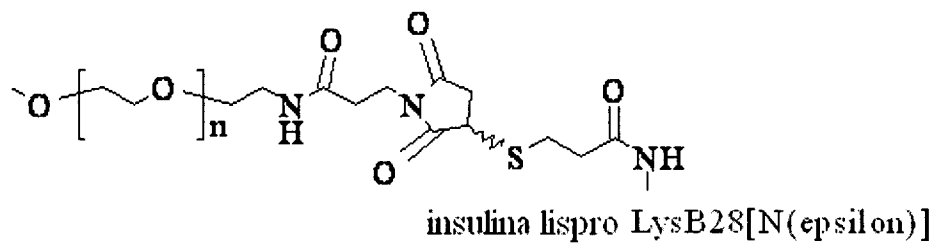
(8(b))

10



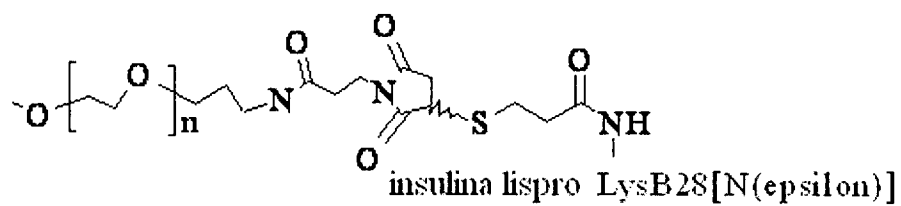
(9(a))

15



(9(b))

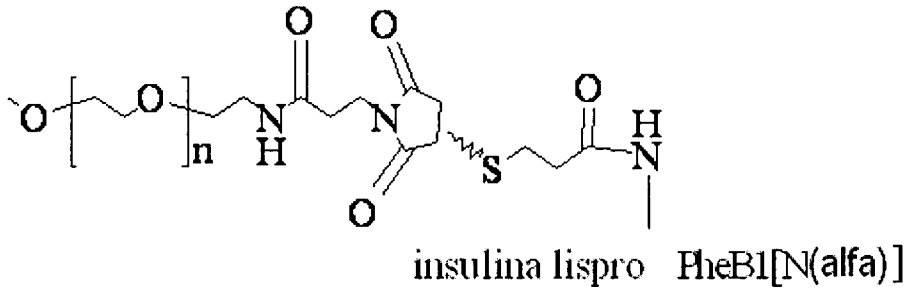
20



98

(10(a))

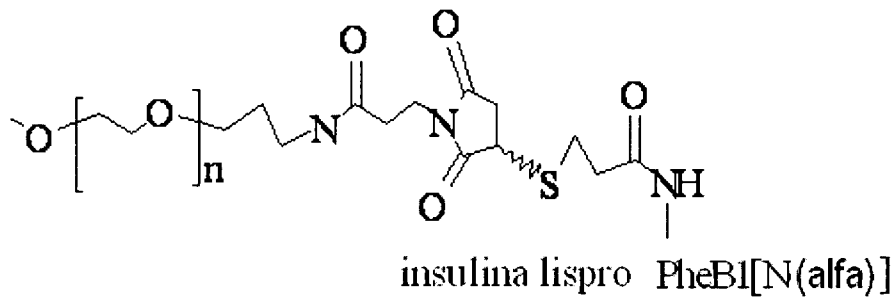
5



10

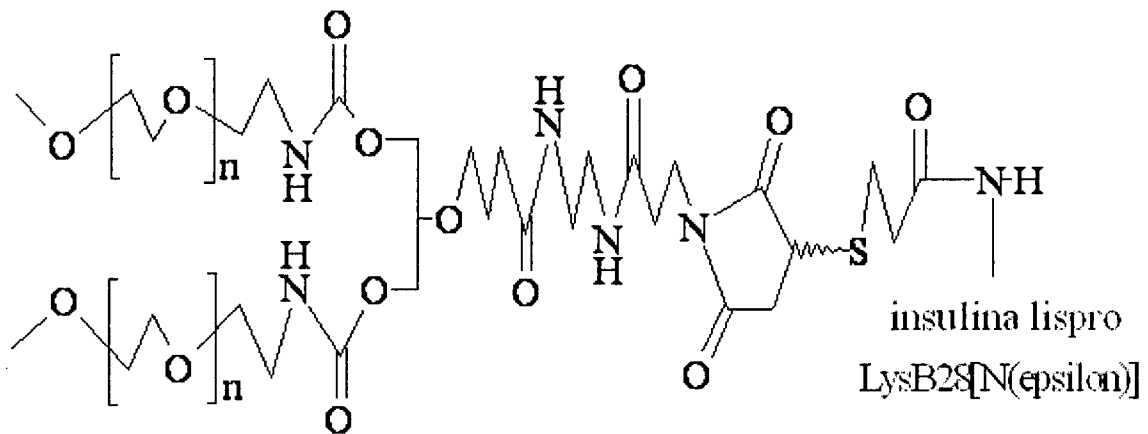
(10(b))

15



(15(c))

20



5

Ejemplo 2: PEGilación de insulina lispro usando monometoxipoli(etilen glicol) p-nitrofenil carbonato (mPEG-NPC)

Un décimo mmol de insulina lispro se disuelve en 20 ml de amortiguador de borato 0.2M, pH 10.5 y 1.98 g de mPEG-NPC que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa en 20 ml de ACN, se agrega a la solución con agitación vigorosa. La reacción se monitorea por RP-HPLC y SEC. Después de aproximadamente 4 horas, la mezcla de reacción se acidifica a pH 5-7 usando ácido acético y se aplica en una columna RP-HPLC para purificación. Las fracciones deseadas se combinaron y liofilizaron para proporcionar insulina lispro PEG20K mono-PEGILADA en un rendimiento que varía de 20 hasta 45%. Se confirmaron la identidad y pureza por RP-HPLC, SEC, y MALDI-MS. Se determina la proporción de mPEG unida en una cadena A o cadena B por las áreas de integración de cadena A y cadena B libre liberada después del tratamiento del conjugado resultante con clorhidrato de tris(2-

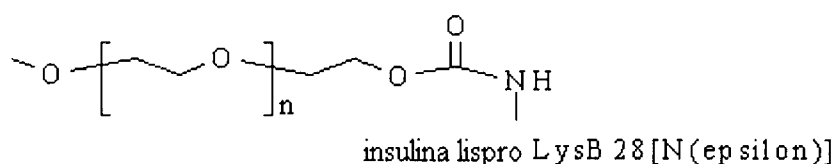
carboxietil)fosfina (TCEP). La proporción de mPEG-NCP a insulina lispro determina la distribución de producto de especies mono-PEGilada y di-PEGilada. El pH de la reacción rige la especificidad del sitio de PEGilación. Como el pH se incrementa de aproximadamente 8 hasta aproximadamente 12, el compuesto (11) llega a ser el producto principal. Cuando se conduce la reacción a pH 10.5 con mPEG-NPC que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa (n es aproximadamente 450), la proporción de (11) a (12) es aproximadamente 85:15.

La reacción de PEGilación descrita anteriormente también se puede conducir en una solución acuosa no amortiguada manteniendo el pH de la mezcla de reacción por adición continua de 0.2 M de NaOH. Cuando se conduce en una solución acuosa no amortiguada usando mPEG-NPC que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa mientras el pH se mantiene a aproximadamente pH 11.5, los productos de reacción de PEGilación (11) y (12) es una proporción de aproximadamente 92:8. Preferiblemente, el compuesto (11) puede tener n en el intervalo de aproximadamente 400 hasta aproximadamente 1000. Más preferiblemente, el compuesto (11) puede tener n en el intervalo de aproximadamente 400 hasta aproximadamente 750. Aún más preferiblemente, el compuesto

(11) puede tener n en el intervalo de aproximadamente 400 hasta aproximadamente 550. Aún más preferiblemente, el compuesto (11) puede tener n de aproximadamente 400 hasta aproximadamente 500. Aún más preferible, el compuesto (11) puede tener n de aproximadamente 450 y aproximadamente 500. Más preferible, el compuesto (11) puede tener n de aproximadamente 450.

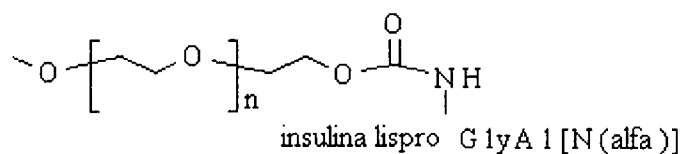
10

(11)



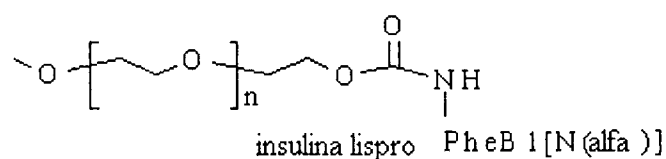
15

(12)

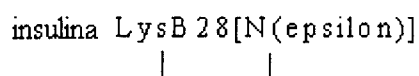


20

(13)



(14)



26

5

Ejemplo 3: Afinidad del Receptor *in vitro*

Se realizaron ensayos de enlace al receptor en
10 membranas PI preparadas a partir de células HEK 293 EBNA
establemente transfectadas que sobre-expresan el receptor de
insulina humano (hIR) o receptor IGF-1 humano (hIGF-1R). Se
determinan afinidades de enlace a partir de un ensayo de
enlace radio-ligando competitivo usando ya sea insulina (3-
15 [¹²⁵I]yodotrirosil A¹⁴) (200 Ci/mmol) o insulina [¹²⁵I]
recombinante humano similar al Factor de Crecimiento I (200
Ci/mmol). El ensayo se realiza con un método SPA usando
perlillas SPA acopladas a aglutinina de germen de trigo Tipo
A tratado con PVT PEI. Se usa amortiguado de ensayo SPA (50
20 mM de TRIS-HCl, pH 7.5, 150 mM de NaCl, 0.1% de BSA) para
todas las preparaciones del reactivo. Se prepararon
diluciones de compuestos seriales tres veces (100 nM a 2 pM)
en amortiguador de ensayo usando un robot Freedom/Evon

(Tecan), se agrega a microplacas de fondo claro de 96 cavidades (Corning/Costar) con un Multimek (Beckman Coulter). Se agregaron radioligando, membranas y perlillas SPA usando un instrumento de multigota (Titertek). Después de una incubación de 10 horas a temperatura ambiente, se determina la radioactividad usando un contador de escintilación Microbeta Trilux. Se incubaron insulina lispro no etiquetado e IGF-I no etiquetado en cada experimento como controles positivo y negativo. Se determinaron valores IC_{50} a partir de análisis de regresión no lineal logísticos de 4 parámetros. La constante de afinidad (K_i) se calcula a partir del valor IC_{50} en base a la ecuación $K_i = IC_{50} / (1 + D/K_d)$ en donde D iguala la concentración de radioligando usando en el experimento y K_d iguala el equilibrio de constante de afinidad de enlace del radioligando determinado a partir de la saturación de análisis de enlace (K_d por hIR y hIGF-IR es 0.124 y 0.130 nM, respectivamente). El K_i medio reportado es por debajo de 10^4 (K_i Log Medio), en donde K_i Log Medio = Promedio ($K_{i1} + K_{i2} + K_{i3} \dots K_{in}$) y el número de experimentos independientes (n) es mayor de dos. Sin embargo, se nota abajo con respecto a IGF-1 humano, n es dos.

Se prepararon los siguientes compuestos de insulina lispro PEGilada preparados como se describe en el Ejemplo 1

que tiene un K_i medio geométrico menos de 30 nM en el ensayo de enlace hIR descrito anteriormente: el compuesto 10(a) se prepara usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40kDa, el compuesto 8(a) preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, el compuesto 15(c) preparado usando mPEG-MAL bifucado que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 60 kDa, el compuesto 9(a) preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30 kDa, el compuesto 9(a) preparado usando mPEG-MAL lineal que tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa y el compuesto 9(b) preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de 20 kDa. En los ensayos de enlace hIR y hIGFR, el compuesto 9(a) preparado usando mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa que tiene un K_i medio geométrico de $3.07 \text{ nM} \pm .32 \text{ nM}$ ($\pm$ S.E.M; $n = 6$) y mayor que 84.3 nM (SEM = no determinado; $n = 6$), respectivamente. Adicionalmente, productos de insulina lispro PEGilada heterogéneos generados como se describe en el Ejemplo 2 usando un mPEG-NPC lineal de ya sea 40, 30 o 20 kDa también tienen un K_i medio geométrico de menos que 30 nM en el ensayo de enlace hIR descrito anteriormente. En el ensayo

de enlace descrito hIR descrito anteriormente, la insulina lispro tiene un K_i medio geométrico de $0.22 \pm .072$ nM ($\pm$ SEM; $n = 4$). En el ensayo de enlace hIGFR descrito anteriormente, todos los compuestos mencionados anteriormente tienen un K_i medio geométrico mayor que 75 nM y el IGF-1 humano tiene un K_i medio geométrico de $1.51 \pm .23$ nM ($\pm$ SEM; $n = 2$).

Estos datos muestran que la posición PEGilante B28 reduce la afinidad hIR por abajo de 10 veces, haciendo estas especies de insulina lispro PEGilada débiles en contra de hIR. Las especies de insulina lispro PEGilada también poseen propiedades de enlace IGFR-1 no medibles en este ensayo bajo estas condiciones.

Ejemplo 4: Evaluación de la Potencia de Insulina Lispro PEGilada usando un Ensayo de Célula Completa de Fosforilación del Receptor de Insulina

Los compuestos de insulina lispro PEGilada de la presente invención, se puede evaluar para actividad funcional usando DELFIA®, un método de ensayo fluorométrico de tiempo resuelto heterogéneo comercialmente disponible (Perkin-Elmer). Brevemente, las células 293HEK que sobre-expresan el receptor de insulina humano son tripsinizadas y colocadas a 60,000 células/cavidad en placas de cultivo de tejido de 96

28

cavidades Costar de media área, recubiertas con poli-D-lisina en medio libre de suero (SFM), (DMEM con 0.1% de ácido graso libre de BSA). Las placas de cultivo celular se incuban durante la noche a 37°C en un incubador de CO₂. Las placas de

5 captura mAb 8314 de cadena A del receptor anti-insulina también se preparan en la noche antes de usar la placa microtituladora de 96 cavidades de 1/2 área negra Costar, tratada durante la noche a 4°C con 30 µl de mAb 8314 de cadena A del receptor anti-insulina (Soos, M.A., et al.

10 Biochem J 235:199-208 (1986); comercialmente disponible incluidos a partir de Abcam, Inc., Cambridge, MA), diluido a 1 µg/ml en 10 mM de carbonato de sodio. Las placas de captura mAb se lavan cuatro veces con 50 mM de TRIS, pH 7.5, 150 mM de NaCl, y 0.1% de Tween (TBST) para remover cualquier mAb

15 8314 no enlazado. La placa de captura mAb 8314 después se bloquea por más de 1 hora a 4°C con BSA al 1% en TBST. Después del bloqueo, la placa de captura se lava dos veces con TBST para remover exceso de la solución BSA. Una vez que la placa de captura está en el amortiguador de bloqueo, las

20 placas de cultivo celular se remueven a partir del incubador y se equilibran a temperatura ambiente. Los compuestos de prueba son serialmente diluidos en SFM. Para estimular al autofosforilación del receptor de insulina, se agregan 50 µl

del agente de prueba diluido a la monocapa celular. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detiene aspirando los compuestos de prueba y agregando posteriormente 50 µl de un amortiguador de lisis 2x (NP40 al 2%, 10 mM de TRIS, pH 7.4, 300 mM de NaCl, inhibidor de proteasa Roche Complete™ con EDTA, y 4 mM de vanadato). Después de 30 minutos en amortiguador lisis a temperatura ambiente, se transfirieron 30 µl de lisado a la placa de captura bloqueada que contiene 30 µl de un anticuerpo PY20 anti-fosfotirosina Europio N1, Eu-N1-PY20 (Perkin Elmer), diluido a 50 ng/ml en 10 mM de Hepes, 140 mM de NaCl y Tween al 0.1%. Esta mezcla se incubó por 1 hora a temperatura ambiente seguida por 6 lavados con TBST para remover Eu-N1-PY20 y lisado celular. Después de la incubación con 50 µl de Solución Intensificadora (Perkin Elmer) por 10 minutos con agitación intermitente como la señal desarrollada. El receptor de insulina fosforilada se cuantifica usando un Wallac Victor usando Tiempo de Resolución de Fluorescencia de Europio fijo. Se calcula el nivel de fosforilación como un % de la respuesta para una dosis de estimulación máxima de insulina (100 nM). Se calculan las potencias de los análogos de insulina como la dosis EC50 usando un cuarto parámetro fijo de la respuesta a dosis. Compuestos de insulina lispro

99

PEGilada preparados como se describe en el Ejemplo 1 que tiene un EC50 de menos de 15 nM en el ensayo descrito en el Ejemplo 4, incluyen 10(a) preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, 9(a) preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, 9(a) preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30 kDa, y 9(b) preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa. En el ensayo descrito en el Ejemplo 4, el compuesto 9(a) preparado usando mPEG-MAL lineal tiene un EC50 de 10.88 nM. Productos de insulina lispro PEGilada heterogéneos generados como se describe en el Ejemplo 2 usando un mPEG-NPC lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40, hasta aproximadamente 30, o aproximadamente 20 kDa también tiene un EC50 de menos de 15 nM en el ensayo descrito en el Ejemplo 4. Una mezcla 50:50 y una 70:30 del compuesto 8(a) preparada usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa y el compuesto 9(a) preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, también tiene un EC50 de menos de 15 nM en el ensayo descrito en el Ejemplo

4. En el mismo ensayo, la insulina e insulina lispro humanas tienen un EC50 de 2.3 y 0.7 nM, respectivamente.

Los datos muestran que la posición B28 PEGilante reduce la actividad de hIR *in vitro* por aproximadamente 10 a 20 veces, haciendo estas especies de insulina lispro PEGilada agonistas débiles de hIR. Las especies de insulina lispro PEGilada también poseen propiedades de enlace IGFR-1 no medibles.

10 **Ejemplo 5. Evaluación de Potencia y Perfiles de Farmacocinética *in vivo* de Insulina Lispro PEGilada en un Modelo de Rata de Diabetes Tipo 1**

Ratas Harlan Sprague-Dawley machos de diez semanas de edad (Harlan, Indianápolis) 250-280 g de peso corporal, se dosifican intravenosamente en su vena de cola con 45 mg/kg de estreptozocotina (STZ) en Ácido Cítrico 0.5M, pH 4.5, tres días antes del inicio del estudio. Al inicio del estudio, los animales se clasificaron en grupos en base al peso corporal y glucosa de sangre. Únicamente los animales con glucosa en sangre entre 400-550 mg/dl se incluyen en el estudio. En la mañana del inicio del estudio, los animales reciben una inyección subcutánea única del compuesto de prueba a una de varias dosis predeterminadas. Periódicamente, se extraen

40

muestras de sangre por duplicado de la vena de la cola y se recolectan en tubos que contienen EDTA de disodio. Se miden los niveles de glucosa en la sangre con un glucómetro. También, se recolecta plasma a partir del muestreo de sangre de la vena y se usa un radioinmunoensayo de insulina para rata comercialmente disponible para determinar los niveles del fármaco administrado en el plasma. Se calcula el área bajo la curva para glucosa en la sangre sobre tiempo (mg*h/dl) para cada animal individual y se usa para una regresión logística de cuatro parámetros para determinar el ED50. En este ensayo, se prepara el compuesto 9(a) usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, se prepara el compuesto 9(a) usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30 kDa, y se prepara el compuesto 9(b) usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa que tiene una potencia (ED50) de 241, 138 y 69 nmol/kg, respectivamente, a partir de una curva de respuesta a dosis típica. Adicionalmente, aquellos compuestos son capaces de disminuir glucosa en la sangre en ratas tratadas con STZ a un nivel que es normal en esta variedad de ratas (100 mg/dl o por debajo) por al menos 36 horas con una inyección subcutánea única de 568 nmol/kg. La insulina

detemir por otra parte normaliza la glucosa por 5-6 horas en el ensayo anterior con una dosis única de 568 nmol/kg.

Además a la valoración de parámetros farmacodinámicos, se determinan los valores de parámetro de farmacocinética medios en ratas para compuestos de prueba usando la muestra de sangre duplicada. Se calculan los parámetros de farmacocinética usando métodos independientes del modelo (WinNonlin Pro). Los valores de parámetro de farmacocinética resultantes no muestran linealidad como función de dosis. El intervalo de valores reportados corresponde a valores de parámetro de farmacocinética generados entre la dosis mayor probada (568 nmol/kg) y la dosis menor (5.6 nmol/kg).

Los resultados de farmacocinética para el compuesto 9(b) preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa indica un tiempo a concentración máxima (T_{max}) que varía de 6-12 horas, una proporción de separación aparente de (CL/F) que varía de 0.05-0.14 l/h/kg, un volumen aparente de distribución (V/F) que varía de 0.6-7.2 l/kg y una vida media de eliminación ($t_{1/2}$) que varía de 8.5-34.5 horas.

Los resultados de farmacocinética para el compuesto 9(a) preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso

81

molecular promedio de aproximadamente 30 kDa indica una $T_{\max}$ de 12 horas, una CL/F que varía de 0.05-0.13 l/h/kg, una V/F que varía de 0.6-2.0 l/kg, y una $t_{1/2}$ que varía de 8.3-11.0 horas.

5 Los resultados de farmacocinética para el compuesto 9(a) preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa indica una $T_{\max}$ que varía de 12-24 horas, una CL/F que varía de 0.06-0.2 l/h/kg, una V/F que varía de 1.0-7.5 l/kg, y una $t_{1/2}$ que
10 varía de 11.1-48.5 horas.

Cuando la insulina lispro es similarmente administrada a ratas macho tratadas con STZ a 568 nmol/kg, se mide una $t_{1/2}$ de aproximadamente 1 hora y una CL/F de aproximadamente 1.2 l/h/kg.

15 Cuando la insulina detemir es similarmente administrada a ratas macho tratadas con STZ a dosis que varía de 18.9-568 nmol/kg, se observa una $t_{1/2}$ que varía de 1.9-3.1 horas y una CL/F de aproximadamente 0.8-1.7 l/h/kg.

Debido a las complejidades en las farmacocinéticas,
20 las proporciones CL aparentes entre detemir y compuestos insulina lispro ejemplarmente PEGilada son diferentes dependiendo de la dosis usada para la determinación. Sin embargo, los estudios descritos en el Ejemplo 5 indican que

los compuestos de insulina lispro ejemplarmente PEGilada conjugadas a 20 o 40 kDa de PEG tienen aproximadamente una separación aparentemente menor de 5 a 30 veces que la detemir en la rata diabética inducida con STZ.

5

Ejemplo 6: Evaluación de Duración *in vivo* de la Acción y Características de Farmacocinética de insulina lispro PEGilada en un Modelo de Rata de Diabetes Tipo 2

Se evaluó la actividad glucodinámica del compuesto
10 9(a) con un PEG lineal de 40 kDa en ratas macho fa/fa ZDF (n
= 4 ratas/grupo) después de una inyección subcutánea única
del vehículo control (PBS) o 517 nmol/lg de 9(a) preparado
usando un mPEG-MAL lineal que tiene un peso molecular
promedio de aproximadamente 40 kDa. Se recolectan muestras
15 seriales para caracterización tanto farmacocinética como
farmacodinámica. Una administración subcutánea única de 517
nmol/kg de 9(a) preparada usando un mPEG-MAL lineal que tiene
un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa para
ratas macho fa/fa ZDF está asociada con disminución de
20 glucosa estadísticamente significativa que es sostenida por al
menos siete días (en relación al placebo; $p > 0.05$). El
compuesto 9(a) preparado usando un mPEG-MAL lineal que tiene
un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa de

exposición también es verificable durante siete días.

Ejemplo 7: Titulación del conservador Fenólico de insulina lispro PEG-B28_(92.4%)Al_(7.6%), insulina lispro o una mezcla
5 (insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)Al_(7.6%) al 70%: insulina lispro al 30%) del mismo con fenol en la presencia de iones de cobalto

Se disuelve la insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)Al_(7.6%) o insulina lispro en una solución que contiene 20 mM de KSCN
10 y 50 mM de TRIS-ClO₄ a pH 8.0. La concentración objetivo de ya sea proteína es ~4 mg/ml, en base al contenido de proteína ($280 = 1.05 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Se disuelve cloruro de cobalto (41.9 mg) con 1 ml de agua para proporcionar una solución base con una concentración del ión de cobalto de 0.176 M. Se
15 agrega una alícuota de solución base de cobalto (~2 μ l dependiendo de la concentración de proteína) a 0.8 ml de solución de proteína de forma que la proporción final de ión de cobalto a hexámero de insulina es igual a 4. Para valorar la hexámerización, se monitorean las distorsiones en la
20 química de coordinación de cobalto a 574 nm como una función de concentración de conservador fenólico. Específicamente, se titula una solución de fenol concentrada (0.564 M) en 0.8 ml de solución de proteína usando alícuotas microtituladoras de

forma que el volumen final en el final de la titulación no excede 0.84 ml. Se agita la solución final por un mínimo de 20 minutos después de cada alícuota de fenol y se recolecta el espectro visible de la solución de 400 nm a 800 nm. La
5 absorbancia registrada a 574 nm se convierte a coeficiente de extinción molar dividiendo la absorbancia por la concentración molar de cobalto coordinada His^{B10}, es decir, la concentración de proteína hexámerica multiplicada por dos bases en el conocimiento que las porciones His^{B10} de hexámeros
10 de insulina coordina dos iones de metal divalente. Para la preparación de formulaciones de mezclas 70/30 (mole:mole) de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)Al_(7.6%) e insulina lispro, se agrega la proteína de la primera mezcla y después cobalto por titulación con conservador fenólico.

15 En insulina lispro, la secuencia natural de prolina en la posición B28 y lisina en posición B29 es reservada comparada a insulina humana tipo nativa. Esta reversión conduce a un cambio conformacional en el extremo C-terminal de la cadena B que estéricamente detienen la capacidad de los
20 monómeros de insulina lispro para formas dímeros. De esta forma, la constante de asociación de dímero se reduce por un factor de 300 comparado con el de la insulina humana tipo nativo. Los resultados, mostrados en la Tabla I, indican que

la insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)A1_(7.6%) puede sorprendentemente e inesperadamente asociarse como complejo hexámérico en la presencia de iones de metal divalentes y análogos conservadores fenólicos para condiciones de formulación usadas en Humalog®, debido a la presencia de seis porciones PEG de 20 kDa conjugadas cerca de la ya debilitada, insulina humana tipo nativa vis-a-vis, dominio de dimerización de insulina lispro. Sin embargo, mezclas 70/30 de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)A1_(7.6%) e insulina lispro también demuestra la capacidad para formar complejos hexáméricos, los cuales soportan la preparación de formulaciones extemporáneas y/o premezcladas estables de una insulina basal e insulina de acción rápida.

15

Tabla I:

20

Fenol (mM)	insulina lispro ϵ_{574nm}	insulina lispro ϵ_{574nm} PEG _{20kDa} -B28 _(92.4%) /A1 _(7.6%)	Mezcla 70/30 ϵ_{574nm}
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

La vida de anaquel química y estabilidades en uso de insulina y algunos análogos de insulina benefician la capacidad para formar complejos hexáméricos discretos en solución. La capacidad para hexámerizar insulina o insulina lispro, en la presencia de iones de metal divalente (Zn^{+2} o Co^{+2}) y conservadores fenólicos (fenol o m-cresol), disminuye la desaminación de AsnA21 y subsecuentemente minimiza la formación de partícula de peso molecular alto (HMWP).

Para valorar la capacidad de insulina lispro PEG_{20kDa}-LysB28 para formar hexámeros, insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/Al_(7.6%), con una concentración de proteína de partida en base a $A_{276nm} = 8.6$ mg de insulina lispro/ml o 38.2 mg de conjugado de insulina lispro PEGilada/ml, a pH 6.7 es dializada en agua durante la noche a 4.6 mg/ml o 20.6 mg de conjugado de proteína PEGilada/ml. Se prepara una solución base amortiguada 4x a pH 7.0, con las concentraciones finales del amortiguador de fósforo a 40 mM y m-cresol a 12.8 mg/ml. Se prepara la solución base de óxido de zinc disolviendo óxido de zinc en 0.5 ml de HCl 1N, después diluyendo con agua a una concentración de zinc final de 0.097 M. Se preparan muestras de solución para análisis de dicroísmo circular (CD) próximo a UV variando concentraciones de zinc (0 hasta 400 μ M) mezclando 450 μ l de insulina PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/Al_(7.6%) a una

concentración de proteína de 4.6 mg/ml con alícuotas de solución base de zinc (el volumen máximo total de solución base de zinc agregada = 2.5 μ l o equivalente a 4 iones de zinc por hexámero de insulina PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%)), y 150 μ l de la solución base amortiguada de fosfato 4x. El pH final se ajusta, si es necesario a pH ~7.0. La asociación hexamérica de la insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)A1_(7.6%) o insulina lispro se monitorea en el dicroísmo circular próximo a UV a 20 nm, una región sensible a cambios de disulfuro, usando una celda de 0.2 cm. El residuo medio elípticamente se traza contra una proporción de moles de zinc por moles de hexámero.

Los resultados, mostrados en la Tabla II, además indican que la insulina PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%) puede sorprendentemente e inesperadamente asociarse como complejo hexamérico en la presencia de iones de metal divalente y conservador fenólico en condiciones de formulación análogas a aquellas de Humalog[®], debido a la presencia de seis porciones PEG de 20 kDa conjugadas cerca de la ya debilitada, en relación a insulina humana tipo nativa, dominio de insulina lispro.

También se investigan el impacto de hexámerización y enlace de ligando en estabilidad térmica de insulina PEG_{20kDa}-B28_(92.4%)/A1_(7.6%) en hexámero que promueve las

formulaciones de prueba con experimentos de desnaturalización
térmica CD. La longitud de onda usada para los estudios de
desnaturalización térmica es 240 nm, debido a que se
encuentra que el cambio de señal total es mayor a 240 nm que
5 la 250 nm usada en los estudios de enlace Zn^{2+} , aún la
absorbancia de solución total sería lo suficientemente baja
para los datos CD de alta calidad a ser obtenidos. Se
recolectan los datos de exploración térmica a 240 nm en un
tubo de 1 mm de 5°C hasta aproximadamente 95°C (temperatura
10 final variada ligeramente para cada muestra), con una
proporción de exploración y datos montados de 1°C/minuto,
ancho de banda de 1.5 nm y tiempo de respuesta de 8 segundos.
Los datos de desnaturalización térmica se trazan tanto como
señal en bruto (mdeg a 240 nm) así como la fracción
15 desdoblada aparente (F_{unf}), la cual se da por:
$$F_{desd}(T) = [Y_{obs}(T) - Y_{nat}(T)] / [Y_{desd}(T) - Y_{nat}(T)]$$
 en donde $Y_{obs}(T)$ es la
señal observada como una función de temperatura, y $Y_{nat}(T)$ y
 $Y_{desd}(T)$ son extrapolaciones lineales de las líneas bases
nativa y desdoblada, respectivamente. La temperatura del
20 principio del desdoblamiento se define como la temperatura a
la cual F_{desd} empieza a incrementar a partir de la línea base
nativa ($F_{desd} = 0$), y la temperatura del punto medio es la
temperatura a la cual $F_{desd} = 0.5$.

Los experimentos de desnaturalización térmica CD se realizan esencialmente como se describe anteriormente, indicando que la estabilidad térmica de hexámeros de insulina $\text{PEG}_{20\text{kDa}}\text{-B28}_{(92.4\%)}\text{/A1}_{(7.6\%)}$ es sustancialmente reducida comparada a los hexámeros de insulina lispro cuando ambas son similarmente formuladas en 16 mM de TRIS, pH 7.2, 3.1 mg/ml de m-cresol y zinc. Además, los estudios de desnaturalización térmica CD detectan una concentración de ión de calcio y cloruro significativa dependiente del incremento en temperatura de fusión para insulina lispro $\text{PEG}_{20\text{kDa}}\text{-B28}_{(92.4\%)}\text{/A1}_{(7.6\%)}$ (datos no mostrados). Más específicamente, la temperatura de inicio del desdoblamiento se observa ser $\sim 30^\circ\text{C}$ en 16 mM de TRIS, pH 7.2, 3.1 mg/ml de m-cresol y zinc, pero incrementa dramáticamente a $\sim 50^\circ\text{C}$ en la misma formación que tiene 75 mM de cloruro de calcio. Se observa un efecto similar como la r en la adición de NaCl (25 nM a 150 nM de NaCl) en lugar de cloruro de calcio a la formulación. Por lo tanto, el calcio y/o cloruro pueden ser excipientes que promueven hexámero muy útiles en composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de insulina lispro $\text{PEG}_{20\text{kDa}}\text{-B28}_{(92.4\%)}\text{/A1}_{(7.6\%)}$ para incrementar la estabilidad química y/o física de la composición farmacéutica en almacenaje.

fb

Tabla II: Cambios de Elipticidad en Residuo Medio (MRE) como una función de proporción Zn/hexámero

5	Zn por hexámero (mol/mol)	MRE insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(96%)/A1_(4%) (grados cm² dmol⁻¹ residuo⁻¹)	MRE Insulina lispro (grados cm² dmol⁻¹ residuo⁻¹)
	0	-116.103	-172.545
	0.5	-135.764	-209.347
	1	-158.861	-268.082
10	1.5	-190.81	-315.972
	2	-213.12	-378.179
	3	-255.23	-426.872
	4	-298.729	-471.587

15 **Ejemplo 9: Generación de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(-95%)/A1_(-5%)**

Se mezcla una solución amortiguadora que contiene 150 mM de fosfato de sodio dibásico y 50 mM de EDTA con 150 mM de fosfato de sodio tribásico para proporcionar una solución amortiguadora con un pH entre 10.85 y 11.10 a una temperatura entre aproximadamente 4 y 6°C. A una temperatura entre aproximadamente 4 y 6°C, los cristales de insulina lispro (30-60 mg/ml) lentamente se agregan al amortiguador con agitación suave para evitar la formación de aglomerados

durante la disolución del cristal.

Se disuelve monometoxipoli(etilen glicol) p-nitrofenil carbonato (mPEG-NPC) que tiene PEG de un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa $\pm$ 5 aproximadamente 2 kDa a una concentración de 60-120 mg/ml en agua enfriada (4-6°C) colocando la cantidad requerida de agua enfriada en un recipiente, agitándola para crear un vórtice, y lentamente verter el polvo de mPEG-NPC en el ojo del vórtice para asegurar la adecuada y rápida dispersión. El 10 polvo de mPEG-NPC es un polvo fino y en dispersión se liberan considerables burbujas de aire en el recipiente. La solución mPEG-NPC en el recipiente se deja des-airear entre 30 a 60 minutos, dependiendo del volumen.

La solución de insulina lispro preparada 15 anteriormente se transfiere a un recipiente enchaquetado mecánicamente agitado. El recipiente es instrumentado para medición de temperatura y pH. Se proporciona agitación por un impulsor estándar que opera a un número Reynolds en el régimen turbulento. La solución mPEG-NPC (PEG) se mide en el 20 recipiente a proporción para dar un tiempo de adición PEG total de entre 3 a 5 horas. La temperatura de la chaqueta se mantiene entre 4°C y 6°C, y el mezclado se continúa. El pH de la reacción se mantiene entre 10.85 a 11.10 por la adición de

67

la cantidad requerida de los 150 mM de amortiguador tribásico de fosfato de sodio. Se agrega el PEG hasta que la proporción molar PEG:insulina lispro final está en el intervalo de entre 2.5 a 4.5.

5 Al final de la adición de PEG, la temperatura de la chaqueta se eleva dentro de los 60 minutos a entre 25°C y 30°C, y la mezcla de reacción se incuba a esta temperatura por aproximadamente 3 a aproximadamente 6 horas, mientras se mantiene el pH a entre aproximadamente 10.7 hasta
10 aproximadamente 11.0. Al final del periodo de incubación, la mezcla de reacción se apaga por la adición de amortiguador 2x (100 mM de ácido acético/acetato de sodio, pH 4.0) y se diluye con el mismo amortiguador 2x para ajustar su conductividad (2.5 mS/cm) y concentración (3-5 mg/ml).

15 La mezcla de reacción se purifica usando una columna empacada de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) con una resina apropiada (por ejemplo, resina de Sefarosa SP de Flujo Rápido). La columna se empaca con resina para una altura de lecho entre aproximadamente 15 a
20 aproximadamente 30 cm, equilibrada con 100 mM de Acetato de Na (amortiguador A) y cargada con la mezcla de reacción diluida (5-8 gm producto/l de resina) a pH inferior (2.5-3.5) a una velocidad de flujo apropiada de entre aproximadamente

50 a aproximadamente 90 cm/h. El producto mono-PEGilado y la proteína sin reaccionar preferentemente enlazada en la resina, mientras los derivados multi-PEGilados y exceso de reactivos en su mayor parte pasan a través de la columna. Se
5 usa el amortiguador A, con concentración de sal diluida (20-30 mM) para lavar afuera cualquier derivado multi-PEGilado débilmente absorbido, seguido por gradiente de elución usando un amortiguador (8-12 CV) con concentración de sal incrementada (50-70 mM) para preferencialmente remover el
10 producto PEGilado lejos de la resina, mientras se mantiene la proteína sin reaccionar en la columna. El producto se recolecta (3-5 CV) y la columna se lava con amortiguador A con alta concentración de sal (100 mM) para remover la proteína sin reaccionar.

15 El flujo principal de la columna CEX (3-5 CV) a 3-5 mg/ml se somete a una filtración de flujo tangencial para incrementar su concentración a 40-80 mg/ml usando una membrana de lámina plana estándar (valor límite de peso molecular 3-5 kDa). El proceso se lleva a cabo vía una
20 concentración inicial, seguido por intercambios de amortiguador y concentración final a la concentración requerida. El flujo que opera a lo largo del proceso se mantiene entre 10-20 litros por metro cuadrado del área de

filtro por hora (LMH) y presión de transmembrana (TMP) entre aproximadamente 15 a aproximadamente 30 psi.

La solución de ingrediente farmacéutico activo de volumen concentrado final se congela a una temperatura apropiada (-20°C hasta -70°C) y se almacena a una temperatura apropiada (-20°C hasta -70°C).

10 **Ejemplo 10: Perfiles de Farmacocinética de Insulina Lispro PEGilada en Perros.**

Se dosifican subcutáneamente perros Beagle hembras de dos a cuatro años de edad, 7-10 kg de peso corporal, con 18.9 nmol/kg de compuestos de prueba ejemplares. 15 Periódicamente, muestras de sangre se extraen de la vena cefálica o safena y se recolectan en tubos que contienen EDTA de disodio. Se recolecta el plasma del muestreo de la sangre de la vena y se usa un radioinmunoensayo de insulina comercialmente disponible para determinar los niveles del 20 fármaco administrado en el plasma. Se determinan los perfiles y parámetros de farmacocinética para cada uno de los siguientes compuestos ejemplares, preparados esencialmente como se describe en el Ejemplo 2: el compuesto 11 preparado

usando un mPEG-NPC lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa, aproximadamente 30 kDa y aproximadamente 20 kDa.

Se calculan los parámetros de farmacocinética
5 usando métodos de modelo independiente (WinNonlin Pro.). El compuesto 11 se prepara usando un mPEG-NPC lineal que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa que exhibe un tiempo de concentración máximo (T_{max}) de aproximadamente 12 horas, una velocidad de separación
10 aparente (CL/F) de aproximadamente 0.046 l/h/kg, una concentración máxima (C_{max}) de aproximadamente 14 nM, y una vida media de eliminación ($t_{1/2}$) de aproximadamente 14 horas.

El compuesto 11 preparado usando un mPEG-NPC lineal
15 que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 30 kDa exhibe una T_{max} de aproximadamente 24 horas, una CL/F de aproximadamente 0.027 l/h/kg, una C_{max} de aproximadamente 18 nM, y una $t_{1/2}$ de aproximadamente 23 horas.

El compuesto 11 preparado usando un mPEG-NPC lineal
20 que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 40 kDa exhibe una T_{max} de aproximadamente 24 horas, una CL/F de aproximadamente 0.026 l/h/kg, una C_{max} de aproximadamente 15 nM, y una $t_{1/2}$ de aproximadamente 20 horas.

89

La insulina detemir es similarmente administrada a
perros beagle hembras a una dosis de 18.9 nmol/kg, y exhibe
una T_{max} de aproximadamente 1.3 horas, una CL/F de
aproximadamente 0.12 l/h/kg, una C_{max} de aproximadamente 23
5 nM, y una $t_{1/2}$ de aproximadamente 3.5 horas.

La Tabla III lista los parámetros comparables en el
perro. La RIA específico a insulina utilizada para estos
estudios detecta tanto insulina lispro PEGilada como insulina
endógena.

10

Tabla III. Parámetros PK para insulina lispro PEGilada en
15 perros

Parámetro	Compuesto 11 PEG 20kDa	Compuesto 11 PEG 30kDa	Compuesto 11 PEG 40kDa	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

20

Dosis subcutánea 18.9 nmol/kg; n = 3/grupo

Ejemplo 11: Proyección de "aplanado" medio y dosis en humanos

Un criterio clave para terapia de insulina basal intensificada es la capacidad para lograr un perfil verdaderamente plano, sensible a una dosificación diaria en pacientes. El aplanado suficiente se define como una

5 proporción de caída del pico (PT) de < 2 . Para propósitos de comparación, las proporciones PT se calculan a partir del intervalo de perfiles PK publicados a partir de ~4-9 para detemir y ~1.2-2.6 para glargina. Los datos de PK de rata y

10 18.9 nmol/kg de compuestos ejemplares e insulina detemir se fija a modelos PK de 1-CMT, formado en parametrizado en términos de k_a , CL/F y V/F . Cada parámetro PK (P) después se

15 fija a una ecuación alométrica de la forma $P = aBW^b$, en donde b se fija a -0.25, 0.75 y 1 para k_a , CL/F y V/F , respectivamente, y a es un parámetro fijado. Se obtienen

estimados humanos medios para cada parámetro PK, y simulaciones generan perfiles medios después de la dosificación diaria en humanos. Debido a las similitudes entre los conjugados de insulina lispro PEGilada de 30 kDa y

20 40 kDa, las simulaciones se muestran únicamente para insulina lispro PEGilada de 20 kDa, insulina lispro PEGilada de 40kDa e insulina detemir. Las simulaciones generadas indican que las proporciones de caída del pico (PT) para compuestos de

insulina lispro PEGilada de 20 kDa y 40 kDa son dramáticamente más plana que para insulina detemir. Los resultados de estimulaciones se muestran en la Figura 1.

5 Una estrategia para estimación de la dosis humana de una insulina lispro PEGilada requerida para eficacia es usar un comparado clínico conocido (insulina detemir) como un control interno en el modelo de eficacia de la rata, con la suposición que la potencia relativa entre la insulina lispro
10 PEGilada e insulina detemir en el modelo de rata es similar a la potencia relativa en la clínica. La dosis diaria requerida de insulina lispro PEGilada en la clínica se puede obtener usando la siguiente ecuación:

$$15 \quad \frac{Dosis_{det}}{Dosis_{PEG}} = \frac{EC_{50,det}}{EC_{50,PEG}} \times \frac{CL/F_{det}}{CL/F_{PEG}}$$

La proporción de potencia relativa para cada uno de los conjugados de insulina lispro PEGilada se puede obtener en la Tabla IV. Las proporciones de separación aparente
20 relativa para insulina lispro/detemir PEGilada en la rata, perro y humano (proyectada) se recopilan en la Tabla V.

Tabla IV. Potencia en base a la concentración relativa de conjugados insulina lispro PEGilada e insulina detemir en la rata

5	Compuesto 11	Proporción de potencia en insulina detemir/lispro PEGilada
	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

10 Tabla V. Proporciones CL/F relativas para compuestos de insulina determir/insulina lispro PEGilada

15	Compuesto 11	CL/F de Rata	CL/F de Perro	CL/F de Humano (Proyectado)
	Insulina lispro PEG-20 kDa	5.5	2.6	3.3
	Insulina lispro PEG -40 kDa	4.8	4.6	4.1

Usando los estimados de potencia relativa de la Tabla IV y los estimados CL/F relativos de la Tabla V, las proyecciones de dosis media para conjugados de insulina lispro PEGilada en humanos es 4.2 y 6.9 nmol/kg para los compuestos de insulina lispro PEGilada de 20 kDa y 40 kDa, respectivamente. Estas proyecciones se basan en una dosis

91

clínica diaria media de 18.5 nmol/kg de insulina detemir como se reporta para pacientes diabéticos de Tipo 2 en la etiqueta detemir. Cuando se consideran tanto acción como potencia de acción, la predicción de dosis clínica media máxima es ~3 veces menos que la insulina detemir. En el mejor caso, el estimado de dosis clínica media para el conjugado de insulina lispro PEGilada de 20 kDa, 30 kDa y 40 kDa es aproximadamente 20 y aproximadamente 45 veces menos que la insulina detemir.

10 **Ejemplo 12: Proporciones de Infusión de Glucosa después de la Administración Única en Voluntarios Saludables: Insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(≥~95%)/A1_(≤~5%) y Administración de Glargina**

Se conduce un estudio de primera dosis humana de tres partes usando una dosis única de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(≥~95%)/A1_(≤~5%) (LY) preparada esencialmente como se describe en el Ejemplo 9. La parte A incluye tres periodos de estudio, en la cual el sujeto recibe una inyección subcutánea (SC) de la dosis LY en el primer periodo, seguido por una inyección de dosis de insulina glargina (0.5 U/kg) en el segundo periodo, y después seguido por una inyección de otra dosis LY en el tercer periodo. La parte B es una etiqueta abierta, dosis única, dos periodos de estudio por duplicado en los cuales los sujetos reciben una dosis única de LY en ambos

periodos, utilizando agarres de glucosa de 24 y 36 horas. La parte C es una etiqueta abierta, dos periodos, dosis única, secuencia fija, estudio de comparador controlado en el cual los sujetos reciben una dosis SC de 0.5 mg/kg única de LY en un periodo y una dosis SC de 0.8 U/kg única de insulina glargina en el otro periodo. Los sujetos experimentan un procedimiento de agarre de glucosa por 24 horas en cada periodo en las Partes A y C y una duración más larga (hasta 36 horas) de procedimiento de agarre de glucosa en cada periodo en la Parte B. Se administra LY subcutáneamente como una dosis única en las Partes A, B y C como sigue:

Dosis parte A: 0.0025, 0.0125, 0.075, 0.325 mg/kg de peso corporal

Dosis parte B: 0.15, 0.225 mg/kg

15 Dosis parte C: 0.5 mg/kg

Se administra a los sujetos una dosis única del compuesto de insulina lispro PEGilada o una dosis única de insulina glargina (0.5 U/kg) como un comparador y otra dosis única de LY en el 3er periodo. En todos los periodos de tratamiento, los sujetos sufren un procedimiento de agarre euglicémico por hasta 24/36 horas después de cada inyección del compuesto de insulina. Se ajustan las proporciones de infusión de glucosa (GIR) para mantener la euglicémica, con e

q2

GIR documentado durante un tiempo, proporcionando la medición GD de acción de insulina. La meta del agarre de glucosa euglicémica es para mantener la euglicémica a través de la infusión de glucosa después de la administración de una dosis de un compuesto de insulina. Se asume que la secreción de insulina endógena y glucosa hepática resulta ser mínima y que cualquier glucosa que es translocada fuera del espacio de glucosa (es decir, glucosa metabolizada) es la secuencia directa de la insulina exógena administrada. La GIR en este caso puede ser la medición glucodinámica (GD) de la acción de insulina durante un tiempo. Se realizan todos los estudios de agarre de glucosa después de un ayuno durante la noche de aproximadamente 8 horas. En la mañana del estudio, se coloca un pequeño catéter en una vena de un brazo, idealmente en la fosa ante-cubital, para administración de solución de dextrosa al 20% (amortiguada a casi pH neutral) bajo el control de una bomba volumétrica. Se coloca otro catéter, idealmente en la muñeca o mano para muestreo de glucosa venosa. Esta área se calienta con un dispositivo de calentamiento a aproximadamente 55-60°C para muestreo de sangre venosa arterializada. Se obtienen muestras de sangre en el lado del lecho para determinación inmediata de concentraciones de glucosa en sangre completa usando una

técnica de oxidasa de glucosa automatizada. Después del muestreo de sangre basal y un periodo de estabilización de aproximadamente 30 minutos, cada sujeto recibe una dosis del compuesto de insulina administrado subcutáneamente. El inicio
5 de la inyección subcutánea de un compuesto de insulina se define como tiempo cero. Después de la terminación de la dosificación, en conjunto con el muestreo de sangre frecuente para medición de glucosa en sangre, la glucosa se infunde intravenosamente a una velocidad variable para mantener la
10 euglicemia por hasta 24 o 36 horas después de la administración de insulina.

El muestreo de sangre ocurre aproximadamente cada 10 minutos por aproximadamente 30 minutos antes de la dosificación y continúa cada 5-10 minutos por las primeras 2
15 horas después de la dosificación (con la opción para muestrear más frecuentemente como cada 2.5 minutos), y después se reduce a intervalos de 10-30 minutos hasta el final de agarre.

La duración del agarre de glucosa, la velocidad de
20 infusión de glucosa se ajusta para mantener una concentración de glucosa en la sangre objetivo pre-determinada para el sujeto individual. Preferiblemente, la concentración objetivo se cierra para la glucosa de sangre en ayuno. La meta del

procedimiento de agarre de glucosa es para mantener las concentraciones de glucosa en sangre dentro de +5% del valor objetivo de pre-dosis, el cual se define como 5 mg/dl debajo de la glucosa en sangre en ayuno media. De esta forma, las

5 concentraciones de glucosa en sangre se mantienen constantes mientras el GIR es variado. Por lo tanto, la velocidad de infusión de glucosa variante refleja la actividad del compuesto de prueba de insulina. Se documentan los niveles de glucosa en sangre del muestreo y cambios de velocidad de

10 infusión en todo el agarre.

Se conduce un estudio esencialmente como se describe en el Ejemplo 12 demostrando, en humanos que LY tiene características de una insulina "basal" ideal: una duración prolongada de acción, una vida media aparente que

15 varía de 24-44 horas y características basales, es decir, una proporción de caída del pico de menos de 2 (Figura 2). Adicionalmente, la duración de acción para LY es mayor que el de insulina glargina (Figura 2). La variabilidad dentro del sujeto en los glucodinámicos es menos del 30% (datos no

20 mostrados) lo cual es similar a, o mejor que la glargina. Finalmente, los datos glucodinámicos de la Parte C del estudio (0.5 mg/kg) resulta en un perfil GIR para LY que es "el punto más importante", GD mantenido por más de 36 horas,

y excede la respuesta GIR del pico para glargina (0.5 U/kg; datos no mostrados).

Ejemplo 13: Estabilidad Química y Física de Composiciones
5 Farmacéuticas de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28 ($\geq 95\%$)/A1 ($\leq 5\%$)

Como se describe en los Ejemplos 7 y 8 anteriores, la insulina lispro PEG_{20kDa}-B28 ($\geq 95\%$)/A1 ($\leq 5\%$) se puede asociar como un complejo hexámérico en la presencia de iones de metal divalente y conservador fenólico en condiciones de formulación análogas a aquellas de Humalog®. Por lo tanto, se conducen estudios de estabilidad química y física en formulaciones de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28 similar a las formulaciones de solución comercial de insulina lispro (es decir, formulaciones de solución Humalog®). La estabilidad química de una formulación farmacéutica de prueba se considera aceptable si no se detectan cambios significantes en varias propiedades analíticas a partir del punto de tiempo inicial para el periodo de almacenaje indicado a diferentes temperaturas. La estabilidad física de una formulación farmacéutica de prueba se considera aceptable si en la valoración visual no se observan partículas y en mediciones por microscopía fluorescente de Tioflavina T no se observa formación de gel o fibrilla.

Se preparan formaciones de insulina lispro PEG_{20kDa}-

B28 que contiene 0.5 mol de zinc por mol de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28, 16 mg/ml de glicerina, 3.15 mg/ml de m-cresol, amortiguado con ya sea citrato o fosfato a pH 7.0 a pH 6.5, respectivamente, y se prueba para estabilidad tanto química
5 como física. Se prueban formulaciones similares sin zinc para evaluar el impacto de zinc en estabilidad. Las muestras a 35°C forman partículas de gel después de aproximadamente 1 mes de almacenaje y las muestras a 25°C muestran número
10 significativo de formación de partículas/burbujas después de aproximadamente dos meses de almacenaje. Tanto citrato como fosfato amortiguado, así como formulaciones con zinc/sin zinc muestran estabilidad química/física similar en las
condiciones aceleradas a 35°C aunque las muestras amortiguadas de citrato parecen ser las peores que las
15 muestras amortiguadas de fosfato cuando se valoran visualmente. La formulación de control de insulina lispro permanece clara. Las formulaciones amortiguadas tanto de citrato como de fosfato demuestran una estabilidad química aceptable a 5°C por al menos 13 meses.

20 Investigaciones subsecuentes indican que el conservador fenólico, m-cresol, promueven la gelificación cuando se combinan con insulina lispro PEG_{20kDa}-B28 compuesta y expuesta a temperatura elevadas (>25°C). Interesantemente,

cuando se agrega m-cresol a mPEG solo (activado o no activado), las partículas de gel no resulta en la exposición a alta temperatura.

Cuando las formulaciones prototípicas de insulina lispro no confiere estabilidad aceptable a compuestos de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28 a temperaturas elevadas, se desarrollan las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28 ($\geq 95\%$)/A1 ($\leq 5\%$) que demuestra estabilidad química y física intensificada y adecuadas para comercialización como una formulación farmacéutica parenteralmente administrada.

Las siguientes formulaciones de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28 ($\geq 95\%$)/A1 ($\leq 5\%$) (15 mg/ml) demuestran estabilidad química y física aceptable por una semana a 40°C, por un mes a 30°C, por tres meses a 25°C y durante ocho meses a 5°C:

- 1) 16 mM de amortiguador TRIS, pH 7.0-8.0, 10 mM de cloruro de calcio, 20 mg/ml de azúcar (sacarosa o trehalosa), 3 mg/ml (28 mM) de m-cresol y 0.5 mol de zinc por 1.0 mol de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28 ($\geq 95\%$)/A1 ($\leq 5\%$)
- 2) 16 mM de amortiguador TRIS, pH 7.0-8.0, 10 mM de cloruro de calcio, 3 mg/ml de poloxámero, 3 mg/ml (28 mM) de m-cresol y 0.5 moles de zinc por 1.0 moles de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28 ($\geq 95\%$)/A1 ($\leq 5\%$)

3) 5 mM de amortiguador de fosfato, pH 7.0, 13 mM de glicerina, 3 mg/ml (28 mM) de m-cresol, 3 mg/ml de poloxámero, 0.3 moles de zinc por 1.0 moles de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(≥~95%)/Al_(≤~5%)

5 Las formulaciones de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(≥~95%)/Al_(≤~5%) que contienen excipientes que promueven hexámero, por ejemplo, zinc, m-cresol y calcio, generalmente exhiben mayor estabilidad química y física, especialmente a temperaturas elevadas. Además al cloruro de calcio y/o NaCl

10 para formulaciones de insulina lispro PEG_{20kDa}-B28_(≥~95%)/Al_(≤~5%) que contienen zinc y m-cresol además intensifican la estabilidad física de las formulaciones expuestas a temperaturas de 40°C o mayor. Además, las formulaciones amortiguadas de fosfato y citrato generalmente exhiben menos

15 estabilidad física que las formulaciones amortiguadas con TRIS.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de insulina lispro PEGilada de la fórmula:

5 P-[(A)-(B)], o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, caracterizado porque:

A es la cadena A de insulina lispro (SEC ID NO: 1);

B es la cadena B de insulina lispro (SEC ID NO: 3);

y

10 P es un PEG que tiene un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 20 kDa hasta aproximadamente 40 kDa, y en donde A y B son apropiadamente reticulados y P está unido vía un enlace covalente de uretano o tioéter al grupo alfa-amino de la glicina en la posición 1 de A, el
15 grupo alfa-amino de la fenilalanina en la posición 1 de B, o el grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de B.

2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el PEG se une vía un enlace covalente de uretano o tioéter al grupo epsilon-amino
20 de la lisina en la posición 28 de B.

3. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, adicionalmente caracterizado porque tiene una K_i para el receptor de insulina humana de aproximadamente 30 nM o menos.

25 4. El compuesto de conformidad cualquiera de las

db

reivindicaciones 1 a 2, adicionalmente caracterizado porque tiene una K_i para el receptor de insulina humana de aproximadamente 20 nM o menos.

5. El compuesto de conformidad cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 a 2, adicionalmente caracterizado porque tiene una K_i para el receptor de insulina humana de aproximadamente 10 nM o menos.

6. El compuesto de conformidad cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 5, adicionalmente caracterizado porque
10 tiene una vida media de eliminación mayor de aproximadamente 6 horas en ratas tratadas con STZ dosificadas a aproximadamente 568 nmol/kg.

7. El compuesto de conformidad cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque es suficiente
15 para reducir la glucosa en la sangre a por debajo de 100 mg/dL en una rata tratada con STZ por un periodo que varía desde aproximadamente 4 horas hasta al menos aproximadamente 36 horas después de una inyección subcutánea única del compuesto a una dosis de aproximadamente 568 nmol/kg.

20 8. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque es suficiente para reducir la glucosa en la sangre a por debajo de 100 mg/dL en una rata tratada con STZ por un periodo que varía desde aproximadamente 4 horas hasta al menos aproximadamente
25 48 horas después de una inyección subcutánea única del

compuesto a una dosis de aproximadamente 568 nmol/kg.

9. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, adicionalmente caracterizado porque tiene una vida media de eliminación mayor de aproximadamente
5 30 horas en un humano en una dosis subcutánea única a aproximadamente 0.225 mg/kg.

10. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, adicionalmente caracterizado porque tiene una vida media de eliminación mayor de aproximadamente
10 36 horas en humanos en una dosis subcutánea única a aproximadamente 0.225 mg/kg.

11. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el PEG tiene un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 17.5 kDa
15 a aproximadamente 25 kDa.

12. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el PEG tiene un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 25 kDa.

20 13. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el enlace covalente es un enlace de uretano.

14. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, adicionalmente caracterizado porque
25 tiene un pico de farmacocinética, farmacodinámica, o actividad

97

a través de la relación de menos de 2 en la administración parenteral a un paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto.

15 15. El uso de un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para uso en terapia.

16. El uso de un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de
10 hipoglicemia o diabetes.

17. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

15 18. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 17, caracterizada porque más de aproximadamente 95% de los compuestos de insulina lispro PEGilada son mono-PEGilados.

19. La composición farmacéutica de conformidad con
20 cualquiera de las reivindicaciones 17 a 18, caracterizada porque más de aproximadamente 90% de los compuestos de insulina lispro PEGilada tienen un PEG covalentemente unido al grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de B.

20. La composición farmacéutica de conformidad con
25 cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, caracterizada

porque adicionalmente comprende un amortiguador TRIS a una concentración en el intervalo desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 25 mM de TRIS, en donde el pH de la composición farmacéutica es desde aproximadamente pH 7.0 hasta aproximadamente pH 8.0 y al menos un agente de isotonicidad que produce una solución con una isotonicidad de entre aproximadamente 270 mOsm y aproximadamente 330 mOsm.

21. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, caracterizada porque adicionalmente comprende un amortiguador de fosfato a una concentración en el intervalo desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 10 mM y en donde el pH de la composición farmacéutica es desde aproximadamente pH 7.0 hasta aproximadamente pH 7.5 y al menos un agente de isotonicidad que produce una solución con una isotonicidad de entre aproximadamente 270 mOsm y aproximadamente 330 mOsm.

22. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, caracterizada porque la concentración total de compuestos de insulina lispro PEGilada es desde aproximadamente 15 mg/mL hasta aproximadamente 40 mg/mL.

23. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, caracterizada porque adicionalmente comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de insulina lispro.

yf

24. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, caracterizada porque adicionalmente comprende aproximadamente 130 mM de m-cresol, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 moles de zinc por mol de hexámeros totales de insulina, análogo de insulina, e insulina lispro PEGilada, entre aproximadamente 2.5 mM y aproximadamente 25 mM de calcio, y un tensioactivo.

25. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, caracterizada porque adicionalmente comprende un conservador fenólico farmacéuticamente aceptable y una cantidad de zinc suficiente para causar que los compuestos de insulina lispro PEGilada sean hexámerizados.

26. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, caracterizada porque adicionalmente comprende entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 150 nM de NaCl, entre aproximadamente 2.5 nM y aproximadamente 25 nM de calcio, y entre aproximadamente .5 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml de poloxámero 188.

27. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26, caracterizada porque comprende entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml de poloxámero 188.

28. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 27, caracterizada

porque comprende entre aproximadamente 0.3 y 5 moles de zinc por mol de insulina lispro PEGilada.

29. Un método para tratar hiperglicemia o diabetes en un paciente en necesidad de tal tratamiento, caracterizado porque el método comprende administrar a un paciente, una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28.

30. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque el paciente es tratado para diabetes mellitus.

31. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque el paciente es tratado para diabetes gestacional.

32. Un proceso para hacer un compuesto de insulina lispro PEGilada de la fórmula:

$P-[(A)-(B)]$, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, caracterizado porque:

A es la cadena A de insulina lispro (SEC ID NO: 1);

B es la cadena B de insulina lispro (SEC ID NO: 3);

y

P es un PEG que tiene un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 20 kDa hasta aproximadamente 40 kDa, y en donde A y B son apropiadamente reticulados y P se une vía un enlace covalente de uretano al grupo epsilon-

99

amino de la lisina en la posición 28 de B, el cual comprende hacer reaccionar el grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28 de B con monometoxipoli(etilen glicol) p-nitrofenil carbonato (mPEG-NPC) que tiene un peso molecular promedio ponderado de entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 40 kDa en un solvente acuoso a un pH de entre aproximadamente 8.5 y aproximadamente 11.5 y entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 30° por un período de tiempo entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6 horas.

10 33. El proceso de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque la relación molar de PEG:insulina lispro está en el intervalo entre aproximadamente 2.5 y aproximadamente 5.0.

15 34. El proceso de conformidad con la reivindicación 32 o 33, caracterizado porque el peso molecular promedio ponderado del mPEG-NPC es aproximadamente 20 kDa.

20 35. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, caracterizado porque el pH de la reacción se mantiene entre aproximadamente 10.5 y aproximadamente 11.5.

 36. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35, caracterizado porque la reacción se conduce entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 30°C por aproximadamente 3 horas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la diabetes. Más particularmente, la invención se refiere a compuestos de insulina lispro PEGilada que son PEGilados con
5 poli(etilenglicol) de alto peso molecular, son altamente solubles a pH fisiológico, tienen una duración de acción extendida, y se caracterizan por relaciones pico-canal de farmacocinética, farmacodinámica, y/o actividad de menos de 2. La invención también se refiere a métodos para
10 proporcionar tales moléculas, a composiciones farmacéuticas que los contienen, y a sus usos terapéuticos.

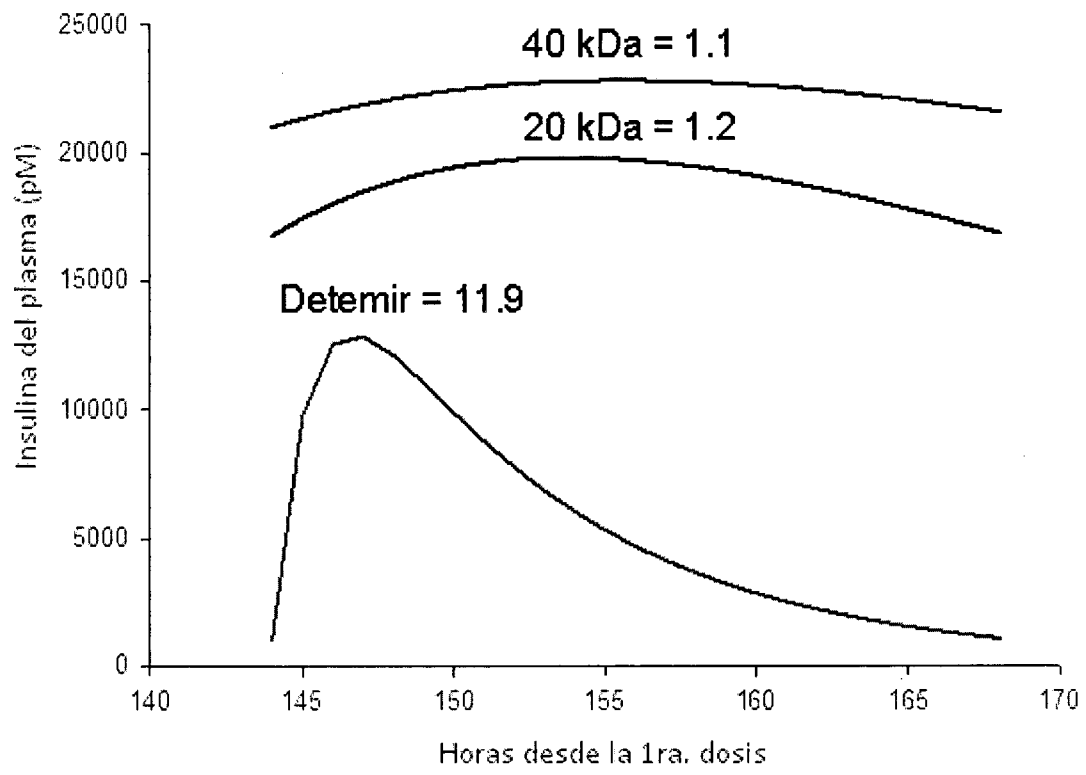


Figura 1

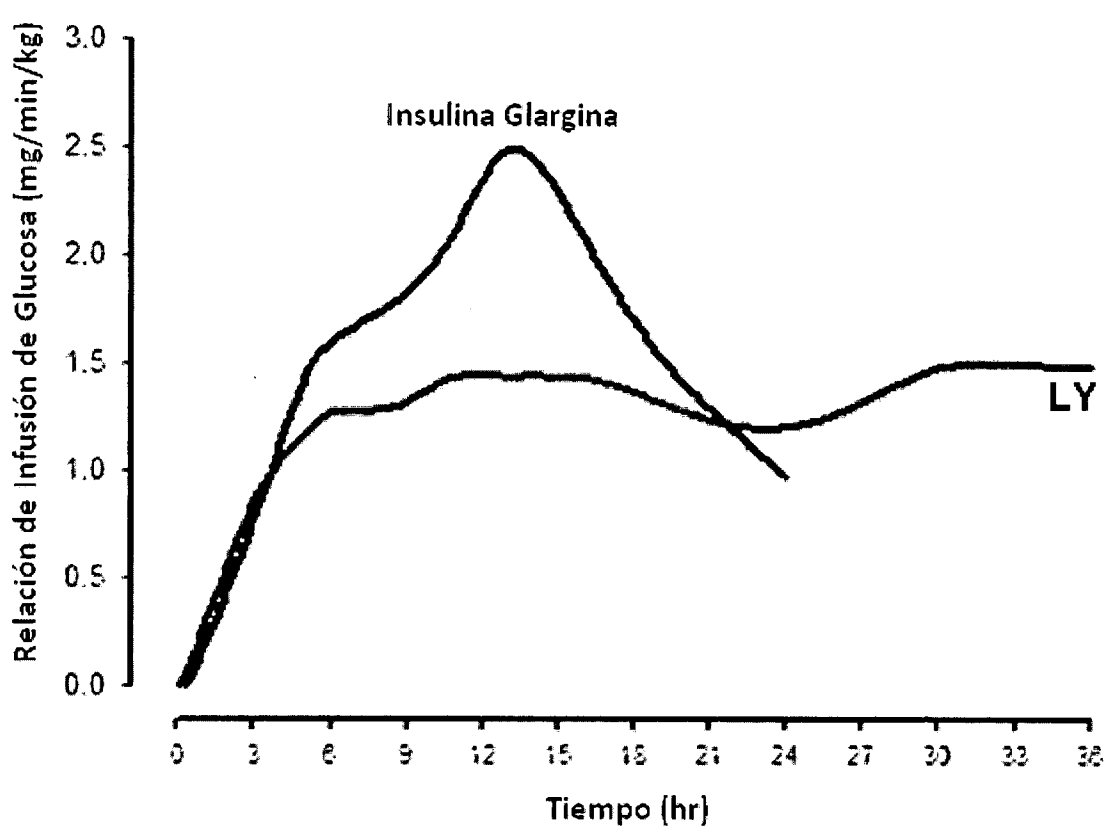


Figura 2

701

X18199_ST25 8-6-9.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company
<120> PEGYLATED INSULIN LISPRO COMPOUNDS
<130> X-18199
<150> 61/061281
<151> 2008-06-13
<150> 61/121394
<151> 2008-12-10
<160> 6
<170> PatentIn version 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> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 3
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

```

1                                     5          X18199_ST25 8-6-9.txt          15
                                     10
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr
          20          25          30

<210> 4
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> xaa at position 1 is absent, any basic amino acid, or any
        genetically encodeable amino acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> xaa at position 22 is absent, Gly, Ser, Ala, or 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> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> xaa at position 1 is absent, any basic amino acid, or any
        genetically encodeable amino acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> xaa at position 29 is Pro, Asp, Lys, Leu, Val, or Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)

```

102

X18199_ST25 8-6-9.txt
<223> Xaa at position 30 is Lys or Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> Xaa at position 31 is absent or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> Xaa at position 32 is absent

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (33)..(33)
<223> Xaa at position 33 is absent

<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 at position 1 is absent

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> Xaa at position 29 is Pro, Asp, Lys, Leu, Val, or Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> Xaa at position 30 is Lys or Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> Xaa at position 31 is absent or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE

103

A es la cadena A de insulina lispro (SEC ID NO:1);

B es la cadena B de insulina lispro (SEC ID NO:3);

Y

P es un PEG que tiene un peso molecular en el
5 intervalo desde aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 40
kDa, y en donde A y B son apropiadamente reticulados y P está
unido ya sea directamente o indirectamente vía un enlace
covalente al grupo alfa-amino de la glicina en la posición 1
de A, el grupo alfa-amino de la fenilalanina en la posición 1
10 de B, o el grupo epsilon-amino de la lisina en la posición 28
de B.

La presente invención también proporciona
composiciones que comprenden una pluralidad de compuestos de
insulina lispro mono y di-PEGilados, en donde más de
15 aproximadamente 75% de los compuestos de insulina lispro
PEGilada en la composición, son compuestos mono-PEGilados de
Fórmula I.

La presente invención también proporciona
composiciones que comprenden compuestos de Fórmula I de
20 insulina mono-PEGilada, en donde más de aproximadamente 50%
de los compuestos mono-PEGilados en la composición, tienen un
PEG covalentemente unido ya sea directamente o
indirectamente, al grupo epsilon-amino de la lisina en la
posición 28 de la cadena B.

25 La presente invención también proporciona

composiciones farmacéuticas que comprenden insulina lispro
PEGilada de Fórmula I y uno o más conservadores, agentes de
isotonicidad, iones metálicos o amortiguadores,
farmacéuticamente aceptables. En ciertas modalidades de la
5 invención, composiciones farmacéuticas que comprenden una
insulina lispro PEGilada de Fórmula I, y uno o más
conservadores, agentes de isotonicidad, iones metálicos o
amortiguadores farmacéuticamente aceptables, además
comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un
10 análogo de insulina.

La presente invención también proporciona los
métodos para tratar hiperglicemia, diabetes mellitus o
diabetes gestacional que comprende, administrar a un paciente
una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición
15 farmacéutica que comprende, un compuesto de insulina lispro
PEGilada de la presente invención.

La presente invención también incluye el uso de un
compuesto de insulina lispro PEGilada de la presente
invención para terapia.

20 La presente invención también incluye el uso de un
compuesto de insulina lispro PEGilada de la presente
invención para la manufactura de un medicamento para el
tratamiento de hipoglicemia, diabetes mellitus o diabetes
gestacional.

105

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1, representa gráficamente perfiles PK
humanos estimulados para insulina lispro PEG-B28 de 20 kDa,
insulina lispro PEG-B28 de 40 kDa, e insulina detemir, basado
5 en escalación alométrica

106

la presente invención en una cantidad desde aproximadamente 0.3 mol hasta aproximadamente 0.7 mol por mol de insulina total, análogo de insulina, y Hexámero de insulina lispro PEGilada. Más preferiblemente, el zinc está presente en las composiciones farmacéuticas de la presente invención en una cantidad desde aproximadamente 0.3 mol hasta aproximadamente 0.55 mol por mol de insulina, análogo de insulina, y Hexámero de insulina lispro PEGilada. El compuesto de zinc que proporciona zinc para la presente invención, puede ser cualquier compuesto de zinc farmacéuticamente aceptable. La adición de zinc a las preparaciones de insulina se conoce en la técnica, como son fuentes farmacéuticamente aceptables de zinc. Preferiblemente, el zinc se proporciona como una sal, tal como sulfato de zinc, cloruro de zinc, acetato de zinc, citrato de zinc, óxido de zinc o nitrato de zinc.

En una modalidad adicional de invención, la composición farmacéutica de la presente invención además comprende uno o más tensoactivos. El término "tensoactivo" como se usa en la presente, incluye agentes que reducen la tensión de superficie de un líquido por adsorción en la interfaz aire-líquido. Ejemplos de tensoactivos incluyen, sin limitación, tensoactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 80 o polisorbato 20); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Triton™ (por ejemplo, Triton™X-100); polietil glicol; polipropil glicol; y

107

copolímeros de etileno y propilen glicol (por ejemplo, pluronics, PF68). Por ejemplo, el tensoactivo puede estar presente en una composición farmacéutica de la presente invención en una cantidad desde aproximadamente 0.001-0.5%,
5 por ejemplo, desde aproximadamente 0.05-0.3%. Preferiblemente, el tensoactivo usado en la composición farmacéutica de la presente invención es poloxámero 188. Más preferiblemente, el tensoactivo es poloxámero 188 a una concentración entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 10
10 mg/mL, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg/mL, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 mg/mL, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10 mg/mL, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10 mg/mL, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 mg/mL, entre
15 aproximadamente 2 y aproximadamente 5 mg/mL, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 mg/mL, y entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5 mg/mL.

La invención también proporciona un compuesto de insulina lispro PEGilada de Fórmula I, o un sal del mismo
20 farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de hipoglicemia y/o diabetes, preferiblemente, en humanos.

La invención también proporciona un compuesto de insulina lispro PEGilada de Fórmula I, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable para uso en la manufactura de un
25 medicamento para el tratamiento de hipoglicemia y/o diabetes,

108

preferiblemente, en humanos.

Composiciones farmacéuticas que comprenden una insulina lispro PEGilada de conformidad con la presente invención, pueden ser administradas parenteralmente a
5 pacientes en necesidad de tal tratamiento. La administración parenteral puede ser realizada por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa similar a pluma, o inyector de impulso mecánico. Alternativamente, la administración
10 parenteral puede ser realizada por medio de una bomba de infusión.

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

SEP 08 2010

ELI LILLY AND COMPANY
PATENT DIVISION

PCT

To:

ELI LILLY AND COMPANY
Lilly Corporate Center
Indianapolis IN 46285
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Davis, P.

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

03.09.2010

Applicant's or agent's file reference
X18199 ✓

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2009/046704 ✓International filing date (day/month/year)
09.06.2009 ✓Priority date (day/month/year)
13.06.2008 ✓Applicant
ELI LILLY AND COMPANY

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Brell, Stefan

Tel. +49 89 2399-7271



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference X18199	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/US2009/046704	International filing date (day/month/year) 09.06.2009	Priority date (day/month/year) 13.06.2008	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K38/28			
Applicant ELI LILLY AND COMPANY			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>4</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☒ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☒ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 2010-04-08		Date of completion of this report 03.09.2010	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Deleu, Laurent Telephone No. +49 89 2399-2834 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2009/046704

110

Box No. 1 Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1, 2, 4-23, 25-48 as originally filed
3, 24 filed with the demand for preliminary international examination

Sequence listings, SEQ ID NO

1-6 as originally filed

Claims, Numbers

1-21 filed with telefax on 12-08-2010

Drawings, Sheets

1/2, 2/2 as originally filed

- ☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
 4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2009/046704

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. II Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66.7(a)).
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66.7(b)).
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rule 64.1). Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

see separate sheet

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-21</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-21</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-21</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2009/046704

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)
and /or
2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☒ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
 - ☐ to this Authority as an amendment on
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

see separate sheet

- * If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."

Re Item II

Priority

The present application claims the priority dates of 13.06.2008 and 10.12.2008 based on the US applications US 61/061,281 and US 61/121,394, respectively. The claims on file appear to enjoy the priority date of 13-06-2008.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Cited Documents

Reference is made to the following documents:

- D1 EP 1 172 114 A (NOVO NORDISK AS [DK]) 16 January 2002 (2002-01-16)
- D2 GREENWALD R B ET AL: "Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 55, no. 2, 10 February 2003 (2003-02-10) , pages 217-250, XP002275066 ISSN: 0169-409X
- D3 GREENWALD R B: "PEG drugs: an overview" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 74, no. 1-3, 6 July 2001 (2001-07-06) , pages 159-171, XP004297521 ISSN: 0168-3659
- D4 WO 2006/097521 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 21 September 2006 (2006-09-21)
- D5 WO 2008/015099 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 7 February 2008 (2008-02-07)
- D6 EP 1 845 105 A (WUXI GRANDCHAMP PHARMACEUTICAL [CN]) 17 October 2007 (2007-10-17)
- D7 WO 2006/124529 A (LILLY CO ELI [US]; GLAESNER WOLFGANG [US]; MAYER JOHN PHILIP [US]; MIL) 23 November 2006 (2006-11-23)

112

2 Novelty (Article 33(2) PCT)

None of the available prior art documents discloses a PEGylated lispro compound, wherein the PEG has a molecular weight in the range from about 17.5 kDa to about 40 kDa and is attached via an urethane covalent bond to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain.

Therefore the subject-matter of claims 1-21 appears to be new.

3 Inventive step (Article 33(3) PCT)

D1 discloses a pharmaceutical composition comprising 3 to 20 mM insulin lispro, m-cresol, 2 to 4 moles of zinc per mole of hexamer of insulin, 0.001% by weight to 1% by weight of poloxamer 188 and 40 mM chloride (see D1, claims 1-20).

The only difference between the insulin compound of claims 1-5, the composition of claims 9-13 and that of D1 is that a high molecular weight polyethylene glycol (PEG) is attached via a urethane covalent bond to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B chain. The effect of this difference is that the modified insulin lispro has an extended time action profile with a peak to trough ratio of less than 2. Thus the problem underlying claims 1-5 and 9-13 may be regarded as the provision of an insulin lispro for once-daily injection with low peak to trough ratio.

It is well known in the art that high molecular weight PEG grafting improves the plasma circulating half life of a pharmaceutical compound (see D2, pages 223-227; D3, pages 161-164). D6 and D7 disclose improved exendin-4 and GLP-1, respectively, wherein the improved compound is grafted with a high molecular weight PEG attached via an amino acid residue at the C-terminus of the peptide (see D6, paragraph [0010], pages 16-22; D7, examples 1-6, claims 1-5). None of the documents D2, D3, D6 and D7 discloses or suggests that pegylated insulin lispro would have an extended plasma circulating half life.

D4 discloses pegylated single-chain insulin, wherein the PEG group is attached to a lysine residue at any of the position within the B-chain. This includes a lysine residue in position B28. Said PEG grafting improves the insulin pharmaceutical properties such as half life in serum, prolonged profile of action, while maintaining a potency which is comparable to that of human

insulin (see D4, pages 2-4 and 36). However D4 does not teach or suggest that the pegylation of position B28 is preferred or is associated with unexpected effects or properties of the modified insulin.

D5 describes PEGylated insulins having additional residues added to the C- or N-terminus of the A- or B-chain. However D5 teaches away from PEGylated insulins having a Lysine residue (see D5, page 9, lines 3-7).

Therefore the person skilled in the art facing the problem of providing a modified insulin lispro with improved pharmacokinetics, in particular extended half-life, may find in D2-D7 the motivation to modify the insulin lispro of D1 by covalently binding PEG. However none of the documents would prompt the skilled person to select the covalent attachment of PEG via a urethane bond to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of B.

The description discloses that said selection is associated with the surprising and unexpected property of having a low peak to trough ratio. Therefore the subject-matter of claims 1-5 and 9-13 involves an inventive step. As a consequence claims 6-8 and 14-21 are considered inventive.

This opinion takes account of the surprising properties disclosed in the present application, in particular of the compound 11. However should all PEGylated insulin lispro obtained by applying the teaching of D2-D4 to the compound of D1, share the same properties as that of the compound of the invention, the subject-matter of the claims would not involve an inventive step.

4 **General comments**

Claims 14-16 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents

Application No	Publication date	Filing date	Priority date (<i>valid</i>
Patent No	(<i>day/month/year</i>)	(<i>day/month/year</i>)	<i>claim</i>)

113

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2009/046704

(day/month/year)

PCT/EP2008/050156 17/07/2008

9/01/2008

12/01/2007

WO 2009/152128

PCT/US2009/046704

SUBSTITUTE PAGE -3-

A is the A-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 1);

B is the B-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 3); and

5 P is a PEG having a molecular weight in the range from about 20 kDa to about 40 kDa, and wherein the A and B are properly cross-linked and P is attached either directly or indirectly via a covalent bond to the alpha-amino group of the glycine at position 1 of A, the alpha-amino group of the phenylalanine at position 1 of B, or the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of B.

The present invention also provides compositions comprising a plurality of mono- and di-PEGylated insulin lispro compounds wherein greater than about 75% of the
10 PEGylated insulin lispro compounds in the composition are mono-PEGylated compounds of Formula I.

The present invention also provides compositions comprising mono-PEGylated insulin compounds of Formula I wherein greater than about 50% of the mono-PEGylated compounds in the composition have a PEG covalently attached either directly or
15 indirectly to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain.

The present invention also provides pharmaceutical compositions comprising a PEGylated insulin lispro of Formula I and one or more pharmaceutically acceptable preservatives, isotonicity agents, metal ions, or buffers. In certain embodiments of the invention, pharmaceutical compositions comprising a PEGylated insulin lispro of
20 Formula I and one or more pharmaceutically acceptable preservatives, isotonicity agents, metal ions, or buffers further comprise a therapeutically effective amount of an insulin analog.

The present invention also provides methods of treating hyperglycemia, diabetes mellitus or gestational diabetes comprising administering to a patient a therapeutically
25 effective amount of a pharmaceutical composition comprising a PEGylated insulin lispro compound of the present invention.

The present invention also includes the use of a PEGylated insulin lispro compound of the present invention for therapy.

The present invention also includes the use of a PEGylated insulin lispro
30 compound of the present invention for the manufacture of a medicament for the treatment of hyperglycemia, diabetes mellitus, or gestational diabetes.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

35 Figure 1 graphically depicts simulated human PK profiles for 20 kDa PEG-B28-insulin lispro, 40 kDa-PEG-B28-insulin lispro, and insulin detemir, based on allometric

AMENDED SHEET

WO 2009/152128

PCT/US2009/046704

SUBSTITUTE PAGE -24-

the present invention in an amount from about 0.3 mole to about 0.7 mole per mole of total insulin, insulin analog, and PEGylated insulin lispro hexamer. Most preferably, zinc is present in the pharmaceutical compositions of the present invention in an amount from about 0.3 mole to about 0.55 mole per mole of insulin, insulin analog, and PEGylated insulin lispro hexamer. The zinc compound that provides zinc for the present invention may be any pharmaceutically acceptable zinc compound. The addition of zinc to insulin preparations is known in the art, as are pharmaceutically acceptable sources of zinc. Preferably, zinc is provided as a salt, such as zinc sulfate, zinc chloride, zinc acetate, zinc citrate, zinc oxide, or zinc nitrate.

In a further embodiment of the invention the pharmaceutical composition of the present invention further comprises one or more surfactants. The term "surfactant" as used herein, includes agents that reduce the surface tension of a liquid by adsorption at the air-liquid interface. Examples of surfactants include, without limitation, nonionic surfactants, such as polysorbates (e.g., polysorbate 80 or polysorbate 20); poloxamers (e.g., poloxamer 188); Triton™ (e.g., Triton™ X-100); polyethyl glycol; polypropyl glycol; and copolymers of ethylene and propylene glycol (e.g., pluronics, PF68). For example, the surfactant can be present in a pharmaceutical composition of the present invention in an amount from about 0.001-0.5%, e.g., from about 0.05-0.3%. Preferably, the surfactant used in the pharmaceutical composition of the present invention is poloxamer 188. More preferably, the surfactant is poloxamer 188 at a concentration between about 0.5 and about 10 mg/mL, between about 1 and about 10 mg/mL, between about 2 and about 10 mg/mL, between about 3 and about 10 mg/mL, between about 4 and about 10 mg/mL, between about 1 and about 5 mg/mL, between about 2 and about 5 mg/mL, between about 3 and about 5 mg/mL, and between about 4 and about 5 mg/mL.

The invention also provides a PEGylated insulin lispro compound of Formula I or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in the treatment of hyperglycemia and/or diabetes, preferably, in humans.

The invention also provides a PEGylated insulin lispro compound of Formula I or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in the manufacture of a medicament for the treatment of hyperglycemia and/or diabetes, preferably, in humans.

Pharmaceutical compositions comprising a PEGylated insulin lispro according to the present invention may be administered parenterally to patients in need of such a treatment. Parenteral administration may be performed by subcutaneous, intramuscular or intravenous injection by means of a syringe, optionally a pen-like syringe, or mechanical driven injector. Alternatively, parenteral administration can be performed by means of an infusion pump.

AMENDED SHEET

Substitute Claim Amendments Under Article 34

1. A PEGylated insulin lispro compound of the formula:
P-[(A)-(B)], or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:
A is the A-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 1);
B is the B-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 3); and
P is a PEG having a molecular weight in the range from about 17.5 kDa to about 40 kDa, and wherein A and B are properly cross-linked and P is attached via a urethane covalent bond to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of B.
2. The compound of claim 1, wherein the PEG has a molecular weight in the range from about 17.5 kDa to about 25 kDa.
3. The compound of any one of claims 1 to 2, wherein the PEG has a molecular weight in the range from about 20 kDa to about 25 kDa.
4. The compound of any one of claims 1 to 3, wherein the PEG has a molecular weight of about 20 kDa.
5. The compound of any one of claims 1 to 4, further characterized by having a peak to trough ratio of less than 2 upon parenterally administering to a patient a therapeutically effective amount of the compound.
6. A compound of any one of claims 1 to 5 for use in therapy.
7. A compound of any one of claims 1 to 6 for use in the treatment of diabetes.
8. The use of a compound of any one of claims 1 to 7 in the manufacture of a medicament for the treatment of hyperglycemia or diabetes.
9. A pharmaceutical composition comprising a compound of any one of claims 1 to 7 and one or more pharmaceutically acceptable excipients, diluents, or carriers.
10. The pharmaceutical composition of claim 9, further comprising a TRIS buffer at a concentration in the range from about 10 mM to about 25 mM TRIS wherein the pH of said pharmaceutical composition is from about pH 7.0 to about pH 8.0 and at least one isotonicity agent, wherein the composition has an isotonicity between about 270 mOsm and about 330 mOsm.
11. The pharmaceutical composition of claim 9, further comprising a phosphate buffer at a concentration in the range from about 5 mM to about 10 mM and wherein the pH of said pharmaceutical composition is from about pH 7.0 to about pH 7.5 and at least one isotonicity agent, wherein the composition has an isotonicity between about 270 mOsm and about 330 mOsm.
12. The pharmaceutical composition of any one of claims 9 to 11, comprising PEGylated insulin lispro compound at a concentration from about 15 mg/mL to about 40 mg/mL, zinc at a concentration from about 0.3 mole to about 0.7 mole of zinc per

1151

Substitute Claim Amendments Under Article 34

mole of PEGylated insulin lispro hexamer, and m-cresol at a concentration from about 10 mM to about 40 mM at a pH from about 7.0 to about 8.0.

13. The pharmaceutical composition of any one of claims 9 to 12, further comprising a therapeutically effective amount of insulin lispro.

14. A method of treating hyperglycemia or diabetes in a patient in need of such a treatment, said method comprising administering to a patient a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a compound of any one of claims 1 to 7.

15. The method of claim 14, wherein the patient is treated for diabetes mellitus.

16. The method of claim 14, wherein the patient is treated for gestational diabetes.

17. A process of making a PEGylated insulin lispro compound of the formula:

P-[(A)-(B)], or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:

A is the A-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 1);

B is the B-chain of insulin lispro (SEQ ID NO: 3); and

P is a PEG having a molecular weight in the range from about 20 kDa to about 40 kDa, and wherein A and B are properly cross-linked and P is attached via an urethane covalent bond to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of B which comprises reacting the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of B with monomethoxypoly(ethylene glycol) p-nitrophenyl carbonate (mPEG-NPC) having a weight average molecular weight of between about 20 kDa and about 40 kDa in an aqueous solvent at a pH between about 8.5 and about 11.5 and at between about 25°C and about 30°C for a period of time between about 3 and about 6 hours.

18. The process of claim 17 having a PEG:insulin lispro molar ratio between about 2.5 and about 5.0.

19. The process of claim 17 or 18 wherein the weight average molecular weight of the mPEG-NPC is about 20 kDa.

20. The process of any one of claims 17 to 19 wherein the pH of the reaction is maintained at between about 10.5 and about 11.5.

21. The process of any one of claims 17 to 20 wherein the reaction is conducted at between about 25°C and about 30 °C for about 3 hours.

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

Remitente: AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para: ELI LILLY AND COMPANY Atn: Sharp, Robert, L. División de Patentes Apartado postal 6288 Indianápolis IN 46206-6288 ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PCT NOTIFICACION DE LA TRANSMISION DEL INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL Y DE LA OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL, O DE LA DECLARACION (Regla 44.1 del PCT)
Referencia del expediente del solicitante o apoderado: X18199	Fecha de expedición (día/mes/año) 13/10/2009
Solicitud Internacional No. PCT/US2009/046704	PARA CONTINUAR LA TRAMITACION Ver puntos 1 y 4
Solicitante ELI LILLY AND COMPANY	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 09/06/2009

1. ☒ Se notifica al solicitante que el informe de búsqueda internacional y la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional se han elaborado y se transmiten adjuntos.

Presentación de modificaciones y de una declaración, según el Artículo 19:

El solicitante tiene derecho, si así lo desea, a modificar las reivindicaciones de la solicitud internacional (ver la Regla 46):

¿Cuándo? El plazo para la presentación de dichas modificaciones es normalmente de dos meses desde la fecha de la transmisión del informe de búsqueda internacional. No obstante, para más detalles, ver las notas que figuran en la hoja adjunta.

¿Dónde? Directamente antes la Oficina Internacional de la OMPI
 34, Chemin des Colombettes
 1211 Ginebra 20, Suiza
 Fax No.: (41-22) 338.82.70
 En las notas de la hoja adjunta, **figuran instrucciones más detalladas**

2. ☐ Se notifica al solicitante que no se elaborará el informe de búsqueda internacional y que la declaración a tal efecto en virtud del Artículo 17.2(a), y la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional se adjuntan a esta notificación.

3. ☐ **Con relación a la protesta** que pudiera formularse, de conformidad con la Regla 40.2, respecto del pago de una o más tasas adicionales, se notifica al solicitante que:

☐ la protesta, así como la decisión relativa a la misma, han sido remitidas a la Oficina Internacional conjuntamente con la petición del solicitante de que los textos de la protesta y la decisión en cuestión sean notificados a las oficinas designadas.

☐ todavía no se ha adoptado decisión alguna sobre la protesta; el solicitante será notificado en cuanto se adopte.

4. **Se recuerda** al solicitante que;

La Oficina publicará la solicitud internacional lo antes posible después de haber transcurrido **18 meses** desde la fecha de prioridad. Si el solicitante desea enviar o diferir la publicación, deberá hacer llegar a la Oficina Internacional una declaración de retirada de la solicitud internacional o de la reivindicación de prioridad, de conformidad con las Reglas 90bis.1 y 90bis.3, respectivamente, antes de finalizar los preparativos técnicos de la publicación internacional.

El solicitante podrá enviar la Oficina Internacional comentarios a la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional. La Oficina Internacional enviará copia de tales comentarios a todas las oficinas designadas a menos que se establezca o se haya establecido un informe de examen preliminar internacional. Estos comentarios se pondrán a disposición del público pero no antes de la expiración del plazo de 30 meses desde la fecha de prioridad.

En el plazo de **19 meses** a contar desde la fecha de prioridad, pero únicamente en lo relativo a algunas oficinas designadas, el solicitante deberá presentar una petición de examen preliminar internacional si desea diferir la entrada en la fase nacional hasta un plazo de **30 meses** a contar desde la fecha de prioridad (en algunas oficinas, incluso más tarde); en caso contrario, el solicitante deberá cumplir en un plazo de **20 meses** a partir de la fecha de prioridad con los actos prescritos para la entrada en la fase nacional ante esas oficinas designadas.

En lo que respecta a otras oficinas designadas, el plazo de **30 meses** (o más) se aplicará igualmente aunque no se haya presentado una petición de examen preliminar internacional en el plazo de 19 meses.

Ver el anexo al formulario PCT/IB/301 y, para más detalles sobre los plazos aplicables, oficina por oficina, ver la *Guía del Solicitante PCT*, capítulos nacionales y la página de Internet de la OMPI.

Nombre y dirección postal de la Autoridad de Búsqueda Internacional Oficina Europea de Patentes, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70)340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70)340-3016	Funcionario Autorizado Pauline Bensau
---	--

NOTAS RELATIVAS AL FORMULARIO PCT/ISA/220

Estas notas están destinadas a dar las instrucciones esenciales sobre la presentación de modificaciones según el Artículo 19. Se basan en los requisitos previstos en el Tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT), en el Reglamento de Ejecución y en las Instrucciones Administrativas del PCT. En caso de divergencia entre las presentes notas y dichos requisitos, prevalecerán estos últimos. Para una información más amplia, puede consultarse también la *Guía del Solicitante PCT*, publicada por la OMPI.

En las presentes notas, los términos "Artículo", "Regla" e "Instrucción" se refieren a las disposiciones del PCT, de su reglamento de Ejecución y de las Instrucciones Administrativas, respectivamente.

INSTRUCCIONES RELATIVAS A LAS MODIFICACIONES SEGUN EL ARTICULO 19

Después de la recepción del informe de búsqueda internacional y de la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional, el solicitante tiene la posibilidad de modificar por una vez las reivindicaciones de la solicitud internacional. No obstante, hay que señalar que como todas las partes de la solicitud internacional (reivindicaciones, descripción y dibujos) se pueden modificar durante el procedimiento de examen preliminar internacional, por lo general, no es necesario presentar modificaciones de las reivindicaciones según el Artículo 19 salvo, por ejemplo, en el caso de que el solicitante quiera que éstas se publiquen con la finalidad de obtener una protección provisional o porque tenga alguna otra razón para modificar las reivindicaciones antes de la publicación internacional. Además, hay que señalar que la protección provisional solo es posible en algunos Estados (ver *Guía del solicitante PCT*, Volumen I/A, Anexos B1 y B2).

Se llama la atención al solicitante sobre el hecho de que no se permite la modificación de las reivindicaciones según el Artículo 19 cuando la Autoridad de Búsqueda Internacional haya declarado, según el Artículo 17.2), que no se ha establecido el informe de búsqueda internacional (ver *Guía del solicitante PCT*, Volumen I/A, párrafo 296).

¿Qué partes de la solicitud internacional se pueden modificar?

Según el Artículo 19, las reivindicaciones exclusivamente.

Durante la fase internacional, las reivindicaciones también se pueden modificar (o volver a modificarse) según el Artículo 34 ante la Autoridad de Examen Preliminar Internacional. La descripción y los dibujos solo pueden modificarse según el Artículo 34 ante la Autoridad de Examen Preliminar Internacional.

Al entrar en la fase nacional, todas las partes de la solicitud internacional se pueden modificar según el Artículo 28 o, si es el caso, según el Artículo 41.

¿Cuándo? En el plazo de dos meses a partir de la fecha de transmisión del informe de búsqueda internacional o de 16 meses desde la fecha de prioridad, aplicándose el plazo que expire más tarde. Conviene señalar, no obstante, que las modificaciones recibidas por la Oficina Internacional después de la expiración del plazo aplicable se considerarán recibidas dentro de plazo si se reciben antes de finalizar las preparaciones técnicas de la publicación internacional (Regla 46.1).

¿Dónde no se presentan las modificaciones?

Las modificaciones solo se pueden depositar en la Oficina Internacional y no en la Oficina receptora, ni tampoco en la Autoridad de Búsqueda Internacional (Regla 46.2).

Si se presenta o se ha presentado una petición de examen preliminar internacional, ver más adelante.

¿Cómo? Suprimiendo una o más reivindicaciones completas, o añadiendo una o más reivindicaciones nuevas o modificando el texto de una o más reivindicaciones tal y como fueron depositadas.

Debe presentarse una hoja de sustitución por cada hoja de reivindicaciones que, como consecuencia de la modificación o de las modificaciones, difiera de la hoja inicialmente presentada.

Todas las reivindicaciones que figuren en una hoja de sustitución deben estar numeradas en números arábigos. Cuando se suprima una reivindicación, no será obligatorio reenumerar las restantes reivindicaciones. En los casos en los que las reivindicaciones se reenumeren, deberá hacerse correlativamente (Instrucción administrativa 205.b)).

Las modificaciones deben efectuarse en el idioma en que se publicará la solicitud internacional.

¿Qué documentos deben/pueden acompañar a las modificaciones?

Carta (Instrucción administrativa 205.b)):

Las modificaciones se deben acompañar de una carta.

La carta no se publicará junto con la solicitud internacional y las reivindicaciones modificadas. No se debe confundir con la "Declaración según el Artículo 19.1" (ver más adelante, bajo "Declaración según Artículo 19.1").

La carta se debe redactar en inglés o francés, a elección del solicitante. No obstante, si el idioma de la solicitud internacional es el inglés, la carta debe estar redactada en inglés; si el idioma de la solicitud internacional es el francés, la carta debe estar redactada en francés.

NOTAS RELATIVAS AL FORMULARIO PCT/ISA/220 (Continuación)

La carta deberá indicar las diferencias entre las reivindicaciones tal como fueron presentadas y las reivindicaciones tal como hayan sido modificadas. La carta deberá indicar, en concreto, para cada reivindicación que figure en la solicitud internacional (se da por supuesto que las indicaciones idénticas relativas a varias reivindicaciones se pueden agrupar) si:

- i) la reivindicación no ha sido modificada;
- ii) la reivindicación ha sido suprimida;
- iii) la reivindicación es nueva;
- iv) la reivindicación sustituye a una o más reivindicaciones originales;
- v) la reivindicación es el resultado de la división de una reivindicación original.

Los siguientes ejemplos ilustran cómo se deben explicar las modificaciones en la carta anexa:

1. [Cuando originalmente eran 48 reivindicaciones y después de la enmienda de algunas reivindicaciones son 51]:
"Reivindicaciones 1 a 29, 31, 32, 34, 35, 37 a 48 reemplazadas por las reivindicaciones enmendadas que llevan los mismos números; reivindicaciones 30, 33 y 36 no modificadas; nuevas reivindicaciones 49 a 51 añadidas".
2. [Cuando originalmente eran 15 reivindicaciones y después de la enmienda de algunas reivindicaciones son 11]:
"Reivindicaciones 1 a 15 reemplazadas por las reivindicaciones enmendadas 1 a 11".
3. [Cuando originalmente eran 14 reivindicaciones y las enmiendas consisten en cancelar algunas reivindicaciones y añadir nuevas reivindicaciones]:
"Reivindicaciones 1 a 6, y 14 no modificadas; reivindicaciones 7 a 13 canceladas; nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17 añadidas". O
"Reivindicaciones 7 a 13 canceladas; nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17 añadidas; todas las demás reivindicaciones no modificadas".
4. [Cuando se hacen realizan diversos tipos de enmiendas]:
"Reivindicaciones 1 a 10 no modificadas; reivindicaciones 11 a 13, 18 y 19 suprimidas; reivindicaciones 14 a 16 reemplazadas por la reivindicación modificada 14; reivindicación 17 subdividida en las reivindicaciones modificadas 15 a 17; nuevas reivindicaciones 20 y 21 añadidas".

"Declaración según el Artículo 19.1" (Regla 46.4)

Las modificaciones podrán ir acompañadas de una declaración explicando las modificaciones e indicando la incidencia que éstas últimas pudieran tener sobre la descripción y los dibujos (que no pueden modificarse en virtud del Artículo 19.1)).

La declaración se publicará junto con la solicitud internacional y las reivindicaciones modificadas.

Se debe redactar en el idioma en que se publicará la solicitud internacional.

Debe ser breve, no excediendo las 500 palabras si se redacta o se traduce al inglés.

La declaración no se deberá confundir con, ni sustituir a, la carta que indica las diferencias entre las reivindicaciones originales y las reivindicaciones modificadas. Se deberá presentar en una hoja aparte e identificarse como tal mediante un título, preferiblemente: "Declaración según el Artículo 19.1)".

La declaración no deberá contener ningún comentario denigrante sobre el informe de búsqueda internacional o sobre la relevancia de las citas que figuren en él. Sólo podrá hacer referencia a citas relevantes para una reivindicación determinada que figuren en el informe de búsqueda internacional en relación con una modificación de esta reivindicación.

Consecuencia del hecho de que una petición de examen preliminar internacional haya sido ya presentada.

Si, en el momento de la presentación de unas modificaciones y, en su caso, de una declaración, efectuadas en virtud del Artículo 19, se ha presentado ya una petición de examen preliminar internacional, el solicitante, preferentemente a la vez que presenta las modificaciones (y la declaración, si es el caso) ante la Oficina Internacional, deberá presentar ante la Administración encargada del examen preliminar internacional una copia de dichas modificaciones (y de la declaración, en su caso) y, si se le requiere, una traducción de dichas modificaciones a los fines del procedimiento ante dicha Administración (ver Reglas 55.3.a) y 62.2, primer párrafo). Para más información, ver las Notas al formulario de petición de examen preliminar internacional (PCT/IPEA/401).

Si se ha presentado una solicitud de examen preliminar internacional, la opinión escrita de la Administración encargada de la búsqueda internacional se considerará como la opinión escrita de la Administración encargada del examen preliminar internacional, a excepción de ciertos casos en los que la Administración encargada del examen preliminar internacional no haya actuado como Administración encargada de la búsqueda internacional y cuando se haya notificado a la Oficina Internacional en virtud de la Regla 66.1bis.b). Si se ha presentado la solicitud, el solicitante deberá enviar a la Administración encargada del examen preliminar internacional una contestación a la opinión escrita junto con las modificaciones, en su caso, antes del plazo de tres meses desde la fecha de emisión del formulario PCT/ISA 220 o antes de los 22 meses desde la fecha de prioridad, aplicándose el plazo que expire más tarde (Regla 43bis.1.c)).

Consecuencias con respecto a la traducción de la solicitud internacional para entrar en la fase nacional

Se llama la atención del solicitante sobre el hecho de que algunas Oficinas designadas o elegidas exigen, al entrar en la fase nacional, la presentación de una traducción de las reivindicaciones modificadas en virtud de lo dispuesto en el Artículo 19, en lugar de la traducción de las reivindicaciones tal como fueron presentadas, o además de ésta.

Para más información sobre los requisitos de cada Oficina designada/elegida, véase el volumen II de la *Guía del Solicitante PCT*.

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(Artículo 18 y Reglas 43 y 44 del PCT)

Referencia al expediente del solicitante o del mandatario X18199	PARA ACCION ADICIONAL Véase Forma PCT/ISA/220 así como, en donde aplique el inciso 5 posterior	
No. de solicitud internacional PCT/US2009/046704	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 09/06/2009	(Fecha de Prioridad) (La más cercana) (día/mes/año) 13/06/2008
Solicitante ELI LILLY AND COMPANY		

Este reporte de búsqueda internacional ha sido preparado por esta Autoridad de la Búsqueda Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 18. Se transmite una copia a la Oficina Internacional.

Este reporte de búsqueda internacional consiste de un total de 5 hojas

☒ También está acompañado de una copia de cada documento de la técnica anterior citado en este reporte.

1. Bases del Reporte

a. Con respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se realizó en las bases de

☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otra manera bajo este punto.

☐ una traducción de la solicitud internacional en _____, la cual está en el idioma de una traducción proporcionada para el propósito de búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b))

b. ☐ Este reporte de búsqueda internacional se ha establecido tomando en cuenta la rectificación de un error obvio autorizado o notificado para esta autoridad bajo la regla 91 (Regla 43.6bis(a)).

c. ☒ Con respecto a cualquier secuencia de nucleótido y/o aminoácido descrita en la solicitud internacional, véase, Cuadro No. I

2. ☐ Se encontró que ciertas reivindicaciones no son localizables (ver el Cuadro II).

3. ☐ La unidad de la invención es deficiente (ver el Cuadro III).

4. Con respecto al título,

☒ el texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante,

☐ esta Autoridad ha establecido que el texto sea como sigue:

†

5. Con respecto al resumen,

☒ el texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto, de acuerdo con la Regla 38.2(b), tal como aparece en el Cuadro IV. El solicitante puede, dentro de un mes a partir de la fecha de envío por correo de este reporte de búsqueda internacional, proporcionar comentarios a esta autoridad.

6. Con respecto a los dibujos

a. La figura de los dibujos que se va a publicar con el resumen es la Figura No. 2.

☒ como lo sugirió el solicitante.

☐ como se selecciona por esta autoridad, porque al solicitante le faltó sugerir una figura.

☐ como se selecciona por esta autoridad, porque esta figura caracteriza mejor la invención.

b. ☐ ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. Solicitud Internacional

PCT/US2009/046704

Recuadro No. 1 Secuencia(s) de nucleótido y/o aminoácido (continuación del punto 1.b de la primera hoja)

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótido y/o aminoácido descrita en la solicitud internacional y necesaria para la invención reclamada, la búsqueda internacional se realiza en la base de:

a. tipo de material

☒ un listado de secuencia

☐ cuadro(s) relacionados con el listado de secuencia

b. formato de material

☒ en papel

☒ en forma electrónica

c. tiempo de presentación/suministro

☒ contenido en la solicitud internacional según como se presenta

☒ presentado junto con la solicitud internacional en forma electrónica

☐ suministrado posteriormente a esta autoridad con el fin de búsqueda

2. ☒ Además, en el caso de que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o cuadro relacionado con esto se haya presentado o suministrado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias posteriores o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud tal como se presenta o no proseguir más allá de la solicitud como se presenta, según sea apropiado, se suministran.

3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de Solicitud Internacional
 PCT/US2009/046704

A. CLASIFICACION DEL ASUNTO RELACIONADO
 INV. A61K38/28 A61K47/48
 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o tanto la clasificación nacional como la IPC.

B. CAMPOS BUSCADOS
 Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por los símbolos de clasificación)
 A61K
 Documentación buscada diferente de la documentación mínima, al grado que estos documentos se incluyen en los campos buscados.

Base de datos, electrónica, consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, donde se puede practicar, términos de búsqueda usados).
 EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search, FSTA

C. DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES		
Categoría*	Citación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los pasos pertinentes	Pertinente para la reivindicación No.
Y	EP 1 172 114 A (NOVO NORDISK AS [DK]) 16 de Enero de 2002 (2002-01-06) Reivindicaciones 1-20; ejemplos 1-3	1-36
Y	GREENWALD R B ET AL: "Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, Vol. 55, no. 2 10 de Febrero de 2003 (2003-02-10), páginas 217-250, XP002275066 ISSN : 0169-409X Página 223 – página 227 ----- --/---	1-14, 17-28

☒ Documentos adicionales se listan en la continuación del cuadro C.
 ☒ Los miembros de la familia de patentes se listan en el anexo

* Categoría especial de los documentos citados:		
"A"	Documento que define el estado general de la técnica, que no se considera que es de pertinencia particular	"T" Documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o la fecha de prioridad, y que no provoca conflicto con la solicitud, pero se cita para entender el principio o teoría que trata la invención
"E"	Documento anterior, pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional	"X" Documento de pertinencia particular; la invención reivindicada no se puede considerar nueva o no se puede considerar que comprende un etapa inventiva cuando el documento se toma solo
"L"	Documento que puede crear dudas de la reivindicación(es) de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra situación u otra razón especial (como se especifique)	"Y" Documento de pertinencia particular; la invención reivindicada no se puede considerar que comprende una etapa inventiva cuando el documento se combina con uno o más de estos documentos, estas combinaciones son obvias para una persona experta en la técnica
"O"	Documento que se refiere a una descripción oral, uso, exhibición u otro medio	"&" Documento miembro de la familia de patentes
"P"	Documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero después de la fecha de prioridad reivindicada	

Fecha de la actual terminación de la búsqueda internacional 5 de Octubre de 2009	Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional 13/10/2009
Nombre y dirección postal de la ISA/ Oficina Europea de Patentes, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado Deleu, Laurent

119

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. Solicitud Internacional
 PCT/US2009/046704

DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES (continuación)		
Categoría*	Citación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los pasajes pertinentes	Pertinente para la Reivindicación No.
Y	GREENWALD R B: "PEG drugs: an overview" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Vol. 74, no. 1-3, 6 de Julio 2001 (2001-07-06), páginas 159-171, XP004297521 ISSN: 0168-3659 El documento completo -----	1-14 17-28
Y	WO 2006/097521 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 21 de septiembre de 2006 (2006-09-21) Página 3 – página 7; reivindicaciones 1-26 -----	1-36
Y	WO 2008/015099 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 7 de Febrero de 2008 (2008-02-07) Página 30 – página 35; -----	1-36
Y	EP 1 845 105 A (WUXI GRANDCHAMP PHARMACEUTICAL [CN]) 17 de Octubre de 2007 (2007-10-17) Páginas 3,4 – páginas 16-22 -----	1-13
	W0 2006/124529 A (LILLY CO ELI [US]; GLAESNER WOLFGANG [US]; MAYER JOHN PHILIP [US]: MIL) 23 de noviembre de 2006 (2006-11-23) Página 3 – página 4; reivindicaciones 1-9; ejemplo 1 -----	1-36
Y	WO 2007/075534 A (NEKTAR THERAPEUTICS AL CORP [US]; BOSSARD MARY J [US]; FANG ZHIHAO [US]) 5 de julio de 2007 (2007-07-05) Ejemplos 16,17 -----	1-13
P,Y	WO 2008/084051 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 17 de julio de 2008 (2008-07-17) Citada en la solicitud Página 22 – página 28 -----	1-36
A	US 2006/171920 A1 (SHECHTER YORAM [IL] ET AL) 3 de agosto de 2006 (2006-08-03) Ejemplo 18 -----	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre los miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.:

PCT/US2009/046704

Documento de la patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembros de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 1172114 A	16-01-2002	NINGUNO	
WO 2006097521 A	21-09-2006	EP 1863840 A1 JP 2008533100 T	12-12-2007 21-08-2008
WO 2008015099 A	07-02-2008	EP 2049149 A2	22-04-2009
EP 1845105 A	17-10-2007	CA 2603630 A1 WO 2006074600 A1 CN 1976948 A JP 2008526899 T	20-07-2006 20-07-2006 06-06-2007 24-07-2008
WO 2006124529 A	23-11-2006	AU 2006247734 A1 CA 2608311 A1 CN 101166545 A EA 200702487 A1 EP 1881850 A1 JP 2008540565 T KR 20080025361 A US 2009215981 A1	23-11-2006 23-11-2006 23-04-2008 28-04-2008 30-01-2008 20-11-2008 20-03-2008 27-08-2009
WO 2007075534 A	05-07-2007	EP 1968644 A2 JP 2009519961 T	17-09-2008 21-05-2009
WO 2008084051 A	17-07-2008	NINGUNO	
US 2006171920 A1	03-08-2006	NINGUNO	

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

120

De la AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

PCT

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(Regla 43bis.1 del PCT)

Para: ver forma PCT/ISA/220		Fecha de envío (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)																
Referencia de archivo del solicitante o mandatario ver forma PCT/ISA/220		PARA ACCION ADICIONAL Véase párrafo 2 posterior																
No. de solicitud internacional: PCT/US2009/046704	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 09.06.2009	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 13.06.2008																
Clasificación de Patente Internacional (IPC) o Clasificación nacional e IPC INV. A61K38/28 A61K47/48																		
Solicitante ELI LILLY AND COMPANY																		
1. Esta opinión contiene las indicaciones que están relacionadas con los siguientes ítems: <table><tr><td>☒ Recuadro No. I</td><td>Base de la opinión</td></tr><tr><td>☐ Recuadro No. II</td><td>Prioridad</td></tr><tr><td>☐ Recuadro No. III</td><td>Ningún establecimiento del reporte con respecto a la novedad, etapa inventiva, o aplicabilidad industrial</td></tr><tr><td>☐ Recuadro No. IV</td><td>Carencia de unidad de la invención</td></tr><tr><td>☒ Recuadro No. V</td><td>Declaración razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, etapa inventiva o aplicabilidad Industrial; las citas y explicaciones que soportan tal declaración.</td></tr><tr><td>☒ Recuadro No. VI</td><td>Ciertos documentos citados</td></tr><tr><td>☐ Recuadro No. VII</td><td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td></tr><tr><td>☐ Recuadro No. VIII</td><td>Ciertas observaciones en la solicitud internacional.</td></tr></table> 2. ACCION ADICIONAL Si se hace una solicitud para el examen preliminar internacional, esta opinión se considerará como una opinión escrita de la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ("IPEA") excepto que esto no se aplica donde el solicitante elige una Autoridad diferente de esta para que sea la IPEA y la IPEA elegida ha notificado al Bureau Internacional bajo la Regla 66.1bis(b) que estas opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional no será considerada. Si esta opinión es considerada, como se proporcionó anteriormente, para ser una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar a la IPEA una respuesta escrita junto, donde sea apropiado, con enmiendas, antes de la expiración de 3 meses a partir de la fecha de envío de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la expiración de 22 meses a partir de la fecha de prioridad, sea cual sea expira más tarde. Para opciones adicionales, véase Forma PCT/ISA/220. 3. Para detalles adicionales, véase notas para la Forma PCT/ISA/220.			☒ Recuadro No. I	Base de la opinión	☐ Recuadro No. II	Prioridad	☐ Recuadro No. III	Ningún establecimiento del reporte con respecto a la novedad, etapa inventiva, o aplicabilidad industrial	☐ Recuadro No. IV	Carencia de unidad de la invención	☒ Recuadro No. V	Declaración razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, etapa inventiva o aplicabilidad Industrial; las citas y explicaciones que soportan tal declaración.	☒ Recuadro No. VI	Ciertos documentos citados	☐ Recuadro No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐ Recuadro No. VIII	Ciertas observaciones en la solicitud internacional.
☒ Recuadro No. I	Base de la opinión																	
☐ Recuadro No. II	Prioridad																	
☐ Recuadro No. III	Ningún establecimiento del reporte con respecto a la novedad, etapa inventiva, o aplicabilidad industrial																	
☐ Recuadro No. IV	Carencia de unidad de la invención																	
☒ Recuadro No. V	Declaración razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, etapa inventiva o aplicabilidad Industrial; las citas y explicaciones que soportan tal declaración.																	
☒ Recuadro No. VI	Ciertos documentos citados																	
☐ Recuadro No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																	
☐ Recuadro No. VIII	Ciertas observaciones en la solicitud internacional.																	
Nombre y dirección de envío de la autoridad de búsqueda internacional Oficina Europea de Patentes D-80298 Munich Tel. + 49 89 2399-0 Fax: + 49 89 2399 - 4465	Fecha de terminación de esta opinión Ver forma PCT/ISA/210	Oficial autorizado Deleu, Laurent Teléfono No. +49 89 2399-2834																

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE
BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2009/046704

Recuadro No. I Bases de la opinión

1. Con respecto al **lenguaje**, esta opinión se ha establecido en la base de:
- ☒ la solicitud internacional en el idioma como se presentó originalmente
 - ☐ una traducción de la solicitud internacional en , que es el lenguaje de una traducción provista para los propósitos de la búsqueda internacional (bajo Reglas 12.3 y 23.1(b)).
2. ☐ Esta opinión se ha establecido tomando en cuenta la rectificación de un error obvio autorizado por o notificado a esta Autoridad bajo la Regla 91 (Regla 43bis.1(a))
3. Con respecto a cualquier **secuencia de nucleótido y/o aminoácido** descrita en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido en la base de:
- a. tipo de material
 - ☒ un listado de secuencia
 - ☐ tabla(s) relacionadas al listado de secuencia
 - b. formato de material
 - ☒ en forma escrita
 - ☒ en forma electrónica
 - c. tiempo de presentación/facilitado
 - ☒ contenida en la solicitud internacional como se presentó.
 - ☒ presentada junto con la solicitud internacional en forma legible por computadora.
 - ☐ provista posteriormente a esta Autoridad para los propósitos de búsqueda.
4. ☒ Además, en el caso de que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con esto se ha presentado o provisto, las declaraciones requeridas que la información en las copias subsecuentes o adicionales es idéntico a aquella en la solicitud como se presentó o no va más allá de la solicitud como se presentó, cuando sea apropiado, donde sea provista.
5. Observaciones adicionales:

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE
BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional No.
PCT/US2009/046704

121

Recuadro No. V Declaración razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, etapa inventiva o aplicabilidad Industrial; citas y explicaciones que soportan tal declaración.

1. Declaración

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones	<u>1-36</u>
	No: Reivindicaciones	
Etapa Inventiva (EI)	Si: Reivindicaciones	
	No: Reivindicaciones	<u>1-36</u>
Aplicabilidad industrial (AI)	Si: Reivindicaciones	<u>1-36</u>
	No: Reivindicaciones	

2. Citas y explicaciones:

ver hoja separada

Recuadro No. VI Ciertos documentos citados

1. Ciertos documentos publicados (Reglas 43bis.1 y 70.10)
y/o
2. descripciones no escritas (Reglas 43bis.1 y 70.9)

Ver la forma 210

**OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD
DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
(HOJA SEPARADA)**

Solicitud internacional No.
PCT/US2009/046704

Para el Punto V

Declaración razonada con respecto a novedad, etapa inventiva o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan dicha declaración

1 Documentos citados

Se hace referencia a los documentos citados:

D1: EP-A-1 172 114 (NOVO NORDISK AS [DK]) 16 de enero de 2002
(2002-01-16)

D2: GREENWALD R B ET AL: "Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, Vol. 55, no. 2, 10 de Febrero de 2003 (2003-02-10), páginas 217-250, XP002275066 ISSN : 0169-409X

D3: GREENWALD R B: "PEG drugs: an overview" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Vol. 74, no. 1-3, 6 de Julio 2001 (2001-07-06), páginas 159-171, XP004297521 ISSN: 0168-3659

D4: WO 2006/097521 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 21 de septiembre de 2006 (2006-09-21)

D5: WO 2008/015099 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK];
KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 7 de Febrero de 2008 (2008-02-07)
D6: EP-A-1 845 105 (WUXI GRANDCHAMP PHARMACEUTICAL [CN])
17 de Octubre de 2007 (2007-10-17)
D7: WO 2006/124529 A (LILLY CO ELI [US]; GLAESNER WOLFGANG [US]:
MAYER JOHN PHILIP [US]: MIL) 23 de noviembre de 2006 (2006-11-
23)

1. Novedad (Art. 33(2) PCT)

Ninguno de los documentos de la técnica anterior disponibles describe un compuesto lispro PEGilado, en donde el PEG tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 40 kDa y se une a través de un enlace covalente uretano o tioéter al grupo alfa-amino del residuo en la posición 1 de la cadena A o la cadena B, o al grupo épsilon-amino de la lisina en la posición 28 de la cadena B.

Por lo tanto la materia objeto de las reivindicaciones 1-36 para ser nueva.

3. Etapa inventiva (Art. 33(3) PCT)

La presente solicitud no cumple los criterios del artículo 33(1) PCT, debido a que la materia objeto de las reivindicaciones 1-36 no involucra una etapa inventiva en el sentido del artículo 33(3) PCT.

**OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD
DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
(HOJA SEPARADA)**

Solicitud internacional No.
PCT/US2009/046704

D1 describe una composición farmacéutica que comprende lispro insulina 3 a 20 mM, m-cresol, 2 a 4 moles de zinc por mol de hexámero de insulina, 0.001% en peso a 1% en peso de poloxámero 188 y 40 mM de cloruro (ver D1, reivindicaciones 1-20).

La única diferencia entre los compuestos de las reivindicaciones 1-14, las composiciones de las reivindicaciones 17-28 y aquellas de D1 es que la lispro insulina es pegilada con poli(etilen glicol) de peso molecular alto. El efecto de esta diferencia es las propiedades mejoradas de la lispro insulina, por ejemplo, duración extendida de acción. De este modo, el problema subyacente en las reivindicaciones 1-14 y 17-28 se puede considerar como la provisión de composiciones mejoradas que comprenden lispro insulina.

Se sabe bien en la técnica que el injerto de PEG de peso molecular alto mejora la vida media de la circulación de plasma de un compuesto farmacéutico (ver D2, páginas 223-227; D3, páginas 161-164)

D4 describe insulina de cadena sencilla pegilada, en donde el grupo PEG se une a un residuo lisina en la posición B28. El radical PEG es de cualquier tamaño de hasta un PM de 40,000 Da. Dicho injerto de PEG mejora las propiedades farmacéuticas de insulina tal como la vida media en suero, perfil prolongado de acción, mientras mantiene una potencia que es comparable con aquella de insulina humana (ver D4, páginas 2-4 y 36). D5 describe insulina pegilada, en donde el grupo PEG se une a una lisina en el C-terminal de la cadena A o B. El PEG, por ejemplo, mPEG-MAL es de cualquier tamaño de hasta PM de 40,000 Da.

D6 y D7 describe exendina-4 y GLP-1 mejorado, respectivamente, en donde el compuesto mejorado se injerta con un PEG de alto peso molecular, preferiblemente mPEG-MAL 20 kDa o 40 kDa. El mPEG-MAL se une vía un residuo de aminoácido en el C-terminal del péptido (ver D6, párrafo [0010], páginas 16-22; D7, ejemplos 1-6, reivindicaciones 1-5). Exendina-4 y GLP-1 son péptidos pequeños para el tratamiento y/o prevención de diabetes. De este modo D6 y D7 pertenecen al mismo campo técnico como D1.

Puede ser de conocimiento general para aquellos con experiencia en la técnica que encaran el problema mencionado antes que el injerto de PEG de alto peso molecular a la lispro insulina mejora los parámetros farmacocinéticos de dicha insulina. La persona con experiencia en la técnica está dispuesta por medio de cualquiera de los documentos D4-D7 a reaccionar residuos de aminoácido en el N- o C-terminal de la insulina con PEG, en particular vía NH₂ terminal o un residuo de lisina en el C-terminal del péptido o la lisina en la posición B28 como se muestra en D4.

La persona con experiencia en la técnica que encara el problema mencionado antes esta lista para combinar la descripción de D1 con aquella de cualquiera de los documentos D4-D7, aplicando modificaciones de taller que yacen dentro de elecciones de diseño normales de la persona con experiencia en la técnica, llegando de esta manera a la materia-objeto de las reivindicaciones 1-14 y 17-28, sin el ejercicio de experiencias inventivas.

Como una consecuencia de la materia-objeto de las reivindicaciones 15, 16, 29-36 no involucra una etapa inventiva.

4. Comentarios generales

Las reivindicaciones 15, 16 y 29-31 se refieren a la materia objeto considerada por esta autoridad a ser cubierta por las provisiones de la regla 39.1(iv)/67.1(iv)PCT

La patentabilidad puede ser dependiente en la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como reivindicaciones patentables el uso de un compuesto en tratamiento médico, pero puede permitir reivindicaciones a un producto, en particular sustancias o composiciones para uso en un primer o tratamiento médico adicional.

Con referencia al ítem VI

Ciertos documentos citados

Ciertos documentos publicados

No de solicitud	Fecha de publicación	Fecha de presentación	Fecha de prioridad
No de patente	(día/mes/año)	(día/mes/año)	(día/mes/año)
PCT/EP2008/050156	17/07/2008	9/01/2008	12/01/2007

PATENT COOPERATION TREATY

124

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

ELI LILLY AND COMPANY
Attn. Sharp, Robert, L. ✓
Patent Division
P.O. Box 6288
Indianapolis IN 46206-6288
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing (day/month/year) 13/10/2009 ✓	
Applicant's or agent's file reference X18199 ✓	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US2009/046704 ✓	International filing date (day/month/year) 09/06/2009
Applicant ELI LILLY AND COMPANY	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Pauline Bensau
---	---

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

125

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43 bis.1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X18199	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2009/046704	International filing date (day/month/year) 09/06/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 13/06/2008
Applicant ELI LILLY AND COMPANY		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 2

- ☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

126

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/046704

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/046704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/28 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	EP 1 172 114 A (NOVO NORDISK AS [DK]) 16 January 2002 (2002-01-16) claims 1-20; examples 1-3	1-36
Y	GREENWALD R B ET AL: "Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 55, no. 2, 10 February 2003 (2003-02-10), pages 217-250, XP002275066 ISSN: 0169-409X page 223 - page 227	1-14, 17-28
	----- -/--	



Further documents are listed in the continuation of Box C



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 October 2009

Date of mailing of the international search report

13/10/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Deleu, Laurent

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/046704

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	✓ GREENWALD R B: "PEG drugs: an overview" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 74, no. 1-3, 6 July 2001 (2001-07-06), pages 159-171, XP004297521 ISSN: 0168-3659 the whole document	1-14, 17-28
Y	✓ WO 2006/097521 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 21 September 2006 (2006-09-21) page 3 - page 7; claims 1-26	1-36
Y	✓ WO 2008/015099 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 7 February 2008 (2008-02-07) page 30 - page 35	1-36
Y	✓ EP 1 845 105 A (WUXI GRANDCHAMP PHARMACEUTICAL [CN]) 17 October 2007 (2007-10-17) pages 3,4 - pages 16-22	1-13
Y	✓ WO 2006/124529 A (LILLY CO ELI [US]; GLAESNER WOLFGANG [US]; MAYER JOHN PHILIP [US]; MIL) 23 November 2006 (2006-11-23) page 3 - page 4; claims 1-9; example 1	1-36
Y	✓ WO 2007/075534 A (NEKTAR THERAPEUTICS AL CORP [US]; BOSSARD MARY J [US]; FANG ZHIHAO [US]) 5 July 2007 (2007-07-05) examples 16,17	1-13
P,Y	✓ WO 2008/084051 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 17 July 2008 (2008-07-17) cited in the application page 22 - page 28	1-36
A	US 2006/171920 A1 (SHECHTER YORAM [IL] ET AL) 3 August 2006 (2006-08-03) example 18	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/046704

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1172114	A	16-01-2002	NONE	
WO 2006097521	A	21-09-2006	EP 1863840 A1 JP 2008533100 T	12-12-2007 21-08-2008
WO 2008015099	A	07-02-2008	EP 2049149 A2	22-04-2009
EP 1845105	A	17-10-2007	CA 2603630 A1 WO 2006074600 A1 CN 1976948 A JP 2008526899 T	20-07-2006 20-07-2006 06-06-2007 24-07-2008
WO 2006124529	A	23-11-2006	AU 2006247734 A1 CA 2608311 A1 CN 101166545 A EA 200702487 A1 EP 1881850 A1 JP 2008540565 T KR 20080025361 A US 2009215981 A1	23-11-2006 23-11-2006 23-04-2008 28-04-2008 30-01-2008 20-11-2008 20-03-2008 27-08-2009
WO 2007075534	A	05-07-2007	EP 1968644 A2 JP 2009519961 T	17-09-2008 21-05-2009
WO 2008084051	A	17-07-2008	NONE	
US 2006171920	A1	03-08-2006	NONE	

PATENT COOPERATION TREATY

178

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

13 Apr 2010

X/8199

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2009/046704

International filing date (day/month/year)
09.06.2009

Priority date (day/month/year)
13.06.2008

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K38/28 A61K47/48

Applicant
ELI LILLY AND COMPANY

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA.



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Deleu, Laurent

Telephone No. +49 89 2399-2834



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2009/046704

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

129

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2009/046704

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-36</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-36</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-36</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)
and / or
2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)
see form 210

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Cited Documents

Reference is made to the following documents:

- D1: EP-A-1 172 114 (NOVO NORDISK AS [DK]) 16 January 2002 (2002-01-16)
- D2: GREENWALD R B ET AL: "Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 55, no. 2, 10 February 2003 (2003-02-10), pages 217-250, XP002275066 ISSN: 0169-409X
- D3: GREENWALD R B: "PEG drugs: an overview" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 74, no. 1-3, 6 July 2001 (2001-07-06), pages 159-171, XP004297521 ISSN: 0168-3659
- D4: WO 2006/097521 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 21 September 2006 (2006-09-21)
- D5: WO 2008/015099 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELDSSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 7 February 2008 (2008-02-07)
- D6: EP-A-1 845 105 (WUXI GRANDCHAMP PHARMACEUTICAL [CN]) 17 October 2007 (2007-10-17)
- D7: WO 2006/124529 A (LILLY CO ELI [US]; GLAESNER WOLFGANG [US]; MAYER JOHN PHILIP [US]; MIL) 23 November 2006 (2006-11-23)

2. Novelty (Article 33(2) PCT)

None of the available prior art documents discloses a PEGylated lispro compound, wherein the PEG has a molecular weight in the range from about 20 kDa to about 40 kDa and is attached via an urethane or thioether covalent bond to the alpha-amino group of the residue at position 1 of the A-chain or the B-chain, or to the epsilon-amino group of the lysine at position 28 of the B-chain. Therefore the subject-matter of claims 1-36 appears to be new.

3. Inventive step (Article 33(3) PCT)

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2009/046704

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-36 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

D1 discloses a pharmaceutical composition comprising 3 to 20 mM insulin lispro, m-cresol, 2 to 4 moles of zinc per mole of hexamer of insulin, 0.001% by weight to 1% by weight of poloxamer 188 and 40 mM chloride (see D1, claims 1-20).

The only difference between the compounds of claims 1-14, the compositions of claims 17-28 and that of D1 is that the insulin lispro is pegylated with high molecular weight poly(ethylene glycol). The effect of this difference is the improved properties of the insulin lispro, e.g. extended duration of action. Thus the problem underlying claims 1-14 and 17-28 may be regarded as the provision of improved compositions comprising insulin lispro.

It is well known in the art that high molecular weight PEG grafting improves the plasma circulating half life of a pharmaceutical compound (see D2, pages 223-227; D3, pages 161-164).

D4 discloses pegylated single-chain insulin, wherein the PEG group is attached to **a lysine residue in position B28**. The PEG moiety is of any size up to Mw 40.000 Da. Said PEG grafting improves the insulin pharmaceutical properties such as half life in serum, prolonged profile of action, while maintaining a potency which is comparable to that of human insulin (see D4, pages 2-4 and 36).

D5 discloses pegylated insulin, wherein the PEG group is attached to a Lysine at the C-terminus of the A- or B-chain. The PEG, e.g. mPEG-MAL is of any size up to Mw 40.000 Da.

D6 and D7 disclose improved exendin-4 and GLP-1, respectively, wherein the improved compound is grafted with a high molecular weight PEG, preferably mPEG-MAL 20 kDa or 40 kDa. The mPEG-MAL is attached via an amino acid residue at the C-terminus of the peptide (see D6, paragraph [0010], pages 16-22; D7, examples 1-6, claims 1-5). Exendin-4 and GLP-1 are small peptides for the treatment and/or prevention of diabetes. Thus D6 and D7 belong to the same technical field as D1.

It would be of general knowledge to the person skilled in the art facing the problem

mentioned above that grafting high molecular weight PEG to the insulin lispro would improve the pharmacokinetics of said insulin. The person skilled in the art would be prompted by any of the documents D4-D7 to react amino acid residues at the N- or C-terminus of the insulin with PEG, in particular via the NH2 terminus or a Lysine residue at the C-terminus of the peptide or the Lysine at position B28 as taught in D4.

The person skilled in the art facing the problem mentioned above would be prompted to combine the disclosure of D1 with that of any of documents D4-D7, applying workshop modifications which lie within the normal design choices of the person skilled in the art, thus arriving to the subject-matter of claims 1-14 and 17-28, without the exercise of inventive skills.

As a consequence the subject-matter of claims 15, 16, 29-36 does not involve an inventive step.

4. General comments

Claims 15, 16 and 29-31 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
PCT/EP2008/050156	17/07/2008	9/01/2008	12/01/2007



No. 10-160886- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 13:07:43

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALII

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 130

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
ELI LILLY AND COMPANY

REFERENCIA	Radicación No.	10 160886
	Solicitud internacional	PCT/US2009/046704
	Fecha inicio fase nacional	13/01/2011
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	

0 2239

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 160886



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (E)

11 FEB. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
ELI LILLY AND COMPANY

REFERENCIA	Radicación No.	10 160886
	Solicitud internacional	PCT/US2009/046704
	Fecha inicio fase nacional	13/01/2011
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	0 2 2 4 0

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (E)

11 FEB. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11