(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 791 683**

(51) Int. CI.:

A61K 38/28 (2006.01)
A61K 47/54 (2007.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2010 PCT/US2010/022268**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.08.2010 WO10088294**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2010 E 10736354 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 2391218**

(54) Título: **Sistemas a base de conjugados para la administración controlada de fármacos**

(30) Prioridad:

25.03.2009 US 163084 P
19.10.2009 US 252857 P
07.07.2009 US 223572 P
20.03.2009 US 162107 P
28.01.2009 US 147878 P
24.06.2009 US 219897 P
12.03.2009 US 159643 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2020

(73) Titular/es:

SMARTCELLS, INC. (100.0%)
100 Cummings Center, Suite 419E
Beverly, MA 01915, US

(72) Inventor/es:

ZION, TODD, C. y
LANCASTER, THOMAS, M.

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistemas a base de conjugados para la administración controlada de fármacos

Antecedentes

La mayoría de sistemas de administración de fármacos de liberación controlada conocidos en la técnica anterior (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 4.145.410 de Sears, que describe la liberación del fármaco a partir de cápsulas que son enzimáticamente lábiles) son incapaces de proporcionar fármacos a un paciente a intervalos y concentraciones que están en proporción directa a la cantidad de un indicador molecular (por ejemplo, un metabolito) presente en el cuerpo humano. Por tanto, en estos sistemas de la técnica anterior, los fármacos no están literalmente "controlados", sino que meramente se proporcionan en un formato de liberación lenta que es independiente de factores externos o internos.

El tratamiento de la diabetes mellitus con insulina inyectable es un ejemplo bien conocido y estudiado donde la liberación lenta descontrolada de insulina es indeseable. De hecho, es evidente que la sustitución simple de la hormona no es suficiente para evitar las secuelas patológicas asociadas con esta enfermedad. Se cree que el desarrollo de estas secuelas refleja una incapacidad de proporcionar insulina exógena proporcional a la variación de las concentraciones de glucosa en sangre experimentadas. Para resolver este problema, se han sugerido algunas estrategias biológicas y de bioingeniería para desarrollar un sistema de administración de insulina más fisiológico (por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos n.º 4.348.387 de Brownlee et al.; Las patentes de Estados Unidos números 5.830.506, 5.902.603, y 6.410.053 de Taylor et al. y la solicitud de patente con n.º de publicación de Estados Unidos n.º 2004-0202719 de Zion et al.).

Cada uno de estos sistemas se basa en la combinación de una molécula de unión a glucosa multivalente (por ejemplo, la lectina Con A) y un componente basado en azúcar que se une de forma reversible por la molécula de unión a glucosa multivalente. Desafortunadamente, Con A y muchas de las otras lectinas fácilmente disponibles tienen el potenciar de estimular la proliferación de linfocitos. Mediante la unión a receptores de carbohidratos sobre las superficies de determinados tipos de linfocitos, estas lectinas denominadas "mitógenas" pueden inducir potencialmente la mitosis de los linfocitos y hacer por tanto que proliferen. La mayoría de lectinas mitógenas, incluyendo Con A, son mitógenos selectivos de los linfocitos T. Unas pocas lectinas son menos selectivas y estimulan tanto los linfocitos T como los linfocitos B. La exposición local o sistémica *in vivo* a lectinas mitógenas puede dar como resultado inflamación, citotoxicidad, digestión de macrófagos, y reacciones alérgicas que incluyen anafilaxia. Además, se sabe que las lectinas vegetales son particularmente inmunógenas, dando lugar a un aumento de la producción de títulos elevados de anticuerpos específicos dirigidos contra lectinas. Se apreciará que las lectinas mitógenas no pueden por tanto usarse en su forma natural en métodos y dispositivos *in vivo* salvo que se tenga mucho cuidado en evitar su liberación. Por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 5.830.506, Taylor resalta los riesgos tóxicos que están implicados en la utilización de Con A y resalta la importancia y dificultad de contener Con A en un dispositivo de administración de fármacos que requiere también que las moléculas de glucosa e insulina se difundan libremente hacia dentro y hacia afuera del dispositivo.

Los riesgos y dificultades que están implicados en estos y otros usos *in vivo* de las lectinas podrían disminuir significativamente si pudiera proporcionarse un sistema de administración de fármacos controlado alternativo que no requiera lectinas.

La solicitud de patente con n.º de publicación n.º 2007-099820 divulga un conjugado que incluye un fármaco unido covalentemente con un polímero. La patente de Estados Unidos n.º 3.697.502 divulga un método para fabricar preparaciones de hierro dextrano.

Sumario

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para controlar los perfiles farmacocinéticos (PK) y/o farmacodinámicos (PD) de un fármaco tal como insulina de una manera que sea sensible a las concentraciones sistémicas de un sacárido tal como glucosa. Como se analiza en los ejemplos, los métodos se basan en parte en el descubrimiento de que cuando se modificaron determinados conjugados de insulina para incluir ligandos de sacáridos de alta afinidad, podrían prepararse para presentar perfiles de PK/PD que respondieran a cambios de concentración de los sacáridos incluso en ausencia de una molécula de unión a sacárido multivalente exógena tal como Con A. Este hallazgo fue inesperado y proporciona una oportunidad sin precedentes para generar sistemas de fármacos sensibles a sacáridos exentos de lectinas simples. En otro aspecto, la divulgación proporciona conjugados ilustrativos y métodos para preparar los mismos. En general, estos conjugados incluyen un fármaco y uno o más ligandos separados que incluyen cada uno un sacárido. En determinadas realizaciones, los ligandos pueden competir con un sacárido (por ejemplo, glucosa o manosa) por su unión a una molécula endógena de unión a sacárido. En determinadas realizaciones, los ligandos pueden competir con glucosa o manosa por la unión a Con A. Como se describe con más detalle a continuación, en determinadas realizaciones, los ligandos y el fármaco pueden unirse covalentemente o no covalentemente a un armazón conjugado. En determinadas realizaciones, el armazón no es polimérico. En determinadas realizaciones, un

conjugado puede tener un índice de polidispersidad de uno y un MW de menos de aproximadamente 20.000 Da. En determinadas realizaciones, el conjugado es de acción prolongada (es decir, presenta un perfil de PK que es más sostenido que la insulina humana recombinante soluble o IHR).

Como se analiza con más detalle a continuación, debe entenderse que los métodos se pueden utilizar para administrar fármacos en respuesta a sacáridos diferentes de la glucosa. En particular, como se analiza en los ejemplos, se ha comprobado que los conjugados ilustrativos responden a sacáridos exógenos tales como alfa-metil manosa y L-fucosa. En determinadas realizaciones, esto se puede usar para preparar conjugados que se pueden controlar mediante la administración de uno de estos sacáridos exógenos (es decir, en vez de o además de controlarse mediante fluctuaciones en la glucosa endógena).

Definiciones

Las definiciones de grupos funcionales específicos, términos químicos y términos generales usados a lo largo de la memoria descriptiva se describen con más detalle a continuación. Para los fines de la esta invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª ed., portada interior y los grupos funcionales específicos se definen normalmente como se describe en la misma. Además, los principios generales de la química orgánica, así como los restos funcionales específicos y la reactividad, se describen en Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith y en March March's Advanced Organic Chemistry, 5ª edición, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., Nueva York, 1989; Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3ª Edición, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

Acilo - Como se usa en el presente documento, el término "acilo", se refiere a un grupo que tiene la fórmula general -$C(=O)R^{X1}$, -$C(=O)OR^{X1}$, -$C(=O)$-O-$C(=O)R^{X1}$, -$C(=O)SR^{X1}$, -$C(=O)N(R^{X1})_2$, -$C(=S)R^{X1}$, -$C(=S)N(R^{X1})_2$ y -$C(=S)S(R^{X1})$, -$C(=NR^{X1})R^{X1}$, -$C(=NR^{X1})OR^{X1}$, -$C(=NR^{X1})SR^{X1}$ y -$C(=NR^{X1})N(R^{X1})_2$, en el que R^{X1} es hidrógeno; halógeno; hidroxilo sustituido o sin sustituir; tiol sustituido o sin sustituir; amino sustituido o sin sustituir; acilo sustituido o sin sustituir; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; alquilo cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; alquenilo cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; alquinilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, oxi alifático, oxi heteroalifático, alquiloxi, heteroalquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, tioxi alifático, tioxi heteroalifático, alquiltioxi, heteroalquiltioxi, ariltioxi, heteroariltioxi, amino mono o dialifático, amino mono o diheteroalifático, mono o dialquilamino, mono o diheteroalquilamino, mono o diarilamino, o mono o diheteroarilamino; o dos grupos R^{X1} tomados juntos forman un anillo heterocíclico de 5 a 6 miembros. Los ejemplos de grupos acilo incluyen aldehídos (-CHO), ácidos carboxílicos (-CO_2H), cetonas, haluros de acilo, ésteres, amidas, iminas, carbonatos, carbamatos y ureas. Los sustituyentes acilo incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los sustituyentes descritos en el presente documento, que den como resultado la formación de un resto estable (por ejemplo, alifático, alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalifático, heterocíclico, arilo, heteroarilo, acilo, oxo, imino, tiooxo, ciano, isociano, amino, azido, nitro, hidroxilo, tiol, halo, amino alifático, amino heteroalifático, alquilamino, heteroalquilamino, arilamino, heteroarilamino, alquilarilo, arilalquilo, oxi alifático, oxi heteroalifático, alquiloxi, heteroalquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, tioxi alifático, tioxi heteroalifático, alquiltioxi, heteroalquiltioxi, ariltioxi, heteroariltioxi, aciloxi, y similares, cada uno de los cuales puede o no estar sustituido adicionalmente).

Alifático - Como se usa en el presente documento, el término "alifático" o la expresión "grupo alifático" indica un resto hidrocarburo opcionalmente sustituido que puede ser de cadena lineal (es decir, no ramificado), ramificado o cíclico ("carbocíclico") y puede estar completamente saturado o puede contener una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático. A menos que se especifique otra cosa, los grupos alifáticos contienen 1-12 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-6 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-4 átomos de carbono, y en otras realizaciones más, los grupos alifáticos contienen 1-3 átomos de carbono. Los grupos alifáticos adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos alquilo, alquenilo y alquinilo lineales o ramificados, e híbridos de los mismos, tales como (cicloalquil)alquilo, (cicloalquenil)alquilo o (cicloalquil)alquenilo.

Alquenilo - Como se usa en el presente documento, el término "alquenilo" indica un grupo monovalente opcionalmente sustituido obtenido a partir de un resto alifático de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. En ciertas realizaciones, el grupo alquenilo empleado en la invención contiene 2-6 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, el grupo alquenilo empleado en la invención contiene 2-5 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el grupo alquenilo empleado en la invención contiene 2-4 átomos de carbono. En otra realización, el grupo alquenilo empleado contiene 2-3 átomos de carbono. Los grupos alquenilo incluyen, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, y similares.

Alquilo - Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a radicales hidrocarburo saturados, opcionalmente sustituidos, de cadena lineal o ramificada obtenidos a partir de un resto alifático que contiene entre 1-6 átomos de carbono mediante la retirada de un solo átomo de hidrógeno. En algunas realizaciones, el grupo alquilo

empleado en la invención contiene 1-5 átomos de carbono. En otra realización, el grupo alquilo empleado contiene 1-4 átomos de carbono. En otras realizaciones más, el grupo alquilo contiene 1-3 átomos de carbono. En otra realización más, el grupo alquilo contiene 1-2 carbonos. Los ejemplos de radicales alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, sec-pentilo, iso-pentilo, *terc*-butilo, n-pentilo, neopentilo, n-hexilo, sec-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-decilo, n-undecilo, dodecilo y similares.

Alquinilo - Como se usa en el presente documento, el término "alquinilo" se refiere a un grupo monovalente opcionalmente sustituido obtenido a partir de un resto alifático de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. En ciertas realizaciones, el grupo alquinilo empleado en la invención contiene 2-6 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, el grupo alquinilo empleado en la invención contiene 2-5 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el grupo alquinilo empleado en la invención contiene 2-4 átomos de carbono. En otra realización, el grupo alquinilo empleado contiene 2-3 átomos de carbono. Los grupos alquinilo representativos incluyen, pero sin limitación, etinilo, 2-propinilo (propargilo), 1-propinilo, y similares.

Arilo - Como se usa en el presente documento, el término "arilo" usado solo o como parte de un resto mayor como en "aralquilo", "aralcoxi" o "ariloxialquilo", se refiere a sistemas de anillo monocíclicos y bicíclicos opcionalmente sustituidos que tienen una un total de cinco a 10 miembros de anillo, en los que al menos un anillo en el sistema es aromático y en los que cada anillo en el sistema contiene de tres a siete miembros de anillo. El término "arilo" puede usarse indistintamente con la expresión "anillo de arilo". En determinadas realizaciones de la presente invención, "arilo" se refiere a un sistema de anillo aromático que incluye, pero sin limitación, fenilo, bifenilo, naftilo, antracilo y similares, que pueden portar uno o más sustituyentes.

Arilalquilo - Como se usa en el presente documento, el término "arilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo (por ejemplo, un grupo aromático o heteroaromático).

Cadena de hidrocarburo bivalente - Como se usa en el presente documento, la expresión "cadena de hidrocarburo bivalente" (también denominada un "grupo alquileno bivalente") es un grupo polimetileno, es decir, $-(CH_2)_z-$, en el que z es un número entero positivo de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 12, de 1 a 8, de 1 a 6, de 1 a 4, de 1 a 3, de 1 a 2, de 2 a 30, de 2 a 20, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4, o de 2 a 3. Una cadena de hidrocarburo bivalente sustituida es un grupo polimetileno en el que uno o más átomos de hidrógeno de metileno están reemplazados por un sustituyente. Los sustituyentes adecuados incluyen los descritos a continuación para un grupo alifático sustituido.

Carbonilo - Como se usa en el presente documento, el término "carbonilo" se refiere a un resto monovalente o bivalente que contiene un doble enlace carbono-oxígeno. Los ejemplos no limitantes de grupos carbonilo incluyen aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, éster, amida, enonas, haluros de acilo, anhídridos, ureas, carbamatos, carbonatos, tioésteres, lactonas, lactamas, hidroxamatos, isocianatos y cloroformiatos.

Cicloalifático - Como se usa en el presente documento, los términos "cicloalifático", "carbociclo" o "carbocíclico", usados solos o como parte de un resto mayor, se refieren a sistemas de anillos alifáticos cíclicos, monocíclicos o bicíclicos, saturados o parcialmente insaturados, opcionalmente sustituidos, según se describe en el presente documento, que tienen de 3 a 10 miembros. Los grupos cicloalifáticos incluyen, sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, cicloheptenilo, ciclooctilo, ciclooctenilo y ciclooctadienilo. En algunas realizaciones, el cicloalquilo tiene 3-6 carbonos.

Halógeno: Como se usa en el presente documento, los términos "halo" y "halógeno" se refieren a un átomo seleccionado entre flúor (flúor, -F), cloro (cloro, -Cl), bromo (bromo, -Br) y yodo (yodo, -I).

Heteroalifático: Como se usa en el presente documento, el término "heteroalifático" o la expresión "grupo heteroalifático", indican un resto hidrocarburo opcionalmente sustituido que tiene, además de átomos de carbono, de uno a cinco heteroátomos, que puede ser de cadena lineal (es decir, no ramificados, ramificado o cíclico ("heterocíclico") y puede estar completamente saturado o puede contener una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático. A menos que se especifique otra cosa, los grupos heteroalifáticos contienen 1-6 átomos de carbono en los que 1-3 átomos de carbono están opcional e independientemente reemplazados por heteroátomos seleccionados entre oxígeno, nitrógeno y azufre. En algunas realizaciones, los grupos heteroalifáticos contienen 1-4 átomos de carbono, en los que 1-2 átomos de carbono están opcional e independientemente reemplazados por heteroátomos seleccionados entre oxígeno, nitrógeno y azufre. En otras realizaciones más, los grupos heteroalifáticos contienen 1-3 átomos de carbono, en los que 1 átomo de carbono está opcional e independientemente reemplazado por un heteroátomo seleccionado entre oxígeno, nitrógeno y azufre. Los grupos heteroalifáticos adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos heteroalquilo, heteroalquenilo y heteroalquinilo lineales o ramificados.

Heteroaralquilo - Como se usa en el presente documento, el término "heteroaralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un heteroarilo, en el que las porciones de alquilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidas independientemente.

Heteroarilo- Como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" usado solo o como parte de un resto mayor, por ejemplo, "heteroaralquilo" o "heteroaralcoxi", se refiere a un grupo opcionalmente sustituido que tiene de 5 a 10 átomos en el anillo, preferentemente 5, 6 o 9 átomos en el anillo; que tiene 6, 10 o 14 electrones π compartidos en una matriz cíclica; y que tienen, además de átomos de carbono, de uno a cinco heteroátomos. Los grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, tienilo, furanilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, indolizinilo, purinilo, naftiridinilo y pteridinilo. Los términos "heteroarilo" y "heteroar-", como se usa en el presente documento, también incluyen grupos en los que un anillo heteroaromático está condensado a uno o más anillos arilo, carbocíclicos o heterocíclicos, donde el radical o punto de unión está en el anillo heteroaromático. Los ejemplos no limitantes incluyen indolilo, isoindolilo, benzotienilo, benzofuranilo, dibenzofuranilo, indazolilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, quinolilo, isoquinolilo, cinnolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, 4*H*-quinolizinilo, carbazolilo, acridinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, tetrahidroquinolinilo y tetrahidroisoquinolinilo. Un grupo heteroarilo puede ser mono o bicíclico. El término "heteroarilo" puede usarse indistintamente con las expresiones "anillo heteroarilo", "grupo heteroarilo" o "heteroaromático", cualquiera de dichas expresiones incluye anillos que están opcionalmente sustituidos.

Heteroátomo - Como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" se refiere a nitrógeno, oxígeno o azufre, e incluye cualquier forma oxidada de nitrógeno o azufre y cualquier forma cuaternizada de un nitrógeno básico. El término "nitrógeno" también incluye un nitrógeno sustituido.

Heterocíclico - Como se usa en el presente documento, las expresiones "heterociclo", "heterociclilo", "radical heterocíclico" y "anillo heterocíclico" se usan indistintamente y se refieren a un resto heterocíclico estable, opcionalmente sustituido, monocíclico de 5 a 7 miembros o bicíclico de 7 a 10 miembros que está saturado o parcialmente insaturado y que tiene, además de átomos de carbono, uno o más heteroátomos, como se ha definido anteriormente. Un anillo heterocíclico puede estar unido a su resto pendiente en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable y cualquiera de los átomos en el anillo puede estar opcionalmente sustituido. Los ejemplos de dichos radicales heterocíclicos saturados o parcialmente insaturados incluyen, sin limitación, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, pirrolidinilo, pirrolidonilo, piperidinilo, pirrolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, oxazolidinilo, piperazinilo, dioxanilo, dioxolanilo, diazepinilo, oxazepinilo, tiazepinilo, morfolinilo y quinuclidinilo. Las expresiones "heterociclo", "heterociclilo", "anillo heterociclilo", "grupo heterocíclico", "resto heterocíclico" y "radical heterocíclico" se usan indistintamente en el presente documento y también incluyen grupos en los que un anillo heterociclilo está condensado a uno o más anillos arilo, heteroarilo o carbocíclicos, tales como indolinilo, 3*H*-indolilo, cromanilo, fenantridinilo o tetrahidroquinolinilo, en los que el radical o punto de unión está en el anillo de heterociclilo. Un grupo heterociclilo puede ser mono o bicíclico. El término "heterociclilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un heterociclilo, en el que las porciones de alquilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidas independientemente.

Insaturado - Como se usa en el presente documento, el término "insaturado", significa que un resto tiene uno o más dobles o triples enlaces.

Parcialmente insaturado - Como se usa en el presente documento, la expresión "parcialmente insaturado" se refiere a un resto de anillo que incluye al menos un doble o triple enlace. La expresión "parcialmente insaturado" pretende abarcar anillos que tienen múltiples sitios de insaturación, pero no pretende incluir restos arilo o heteroarilo, como se define en el presente documento.

Opcionalmente substituido - Como se describe en el presente documento, los compuestos de la invención pueden contener restos "opcionalmente sustituidos". En general, el término "sustituido", ya esté precedido o no por el término "opcionalmente", significa que uno o más hidrógenos del resto designado están reemplazados por un sustituyente adecuado. A menos que se indique otra cosa, un grupo "opcionalmente sustituido" puede tener un sustituyente adecuado en cada posición sustituible del grupo, y cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede estar sustituida con más de un sustituyente seleccionado de un grupo específico, el sustituyente puede ser igual o diferente en cada posición. Las combinaciones de sustituyentes previstas por la presente invención son preferentemente aquellas que dan como resultado la formación de compuestos estables o químicamente factibles. El término "estable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que no se alteran de forma sustancial cuando se los somete a condiciones para permitir su producción, detección y, en ciertas realizaciones, su recuperación, purificación y uso para uno o más de los propósitos divulgados en el presente documento.

Los sustituyentes monovalentes adecuados en un átomo de carbono sustituible de un grupo "opcionalmente sustituido" son independientemente halógeno; $-(CH_2)_{0-4}R°$; $-(CH_2)_{0-4}OR°$; $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR°$; $-(Ch_2)_{0-4}CN(OR°)_2$; $-(CH_2)_{0-4}SR°$; $-(CH_2)_{0-4}Ph$, que puede estar sustituido con R°; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$ que puede estar sustituido con R°; -CH=CHPh, que puede estar sustituido con R°; $-NO_2$; -CN; $-N_3$; $-(CN_2)_{0-4}N(R°)_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R°)C(O)R°$; $-N(R°)C(S)R°$; $-(CH_2)_{0-4}N(R°)C(O)NR°_2$; $-N(R°)C(S)NR°_2$; $-(CN_2)_{0-4}N(R°)C(O)OR°$; $-N(R°)N(R°)C(O)R°$; $-N(R°)N(R°)C(O)NR°_2$; $-N(R°)N(R°)C(O)OR°$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)R°$; $-C(S)R°$; $-(CN_2)_{0-4}C(O)OR°$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR°$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR°_3$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R°$; $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR-$, SC(S)SR°; $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R°$; $-(CN_2)_{0-4}C(O)NR°_2$; $-C(S)NR°_2$; $-C(S)SR°$; $-SC(S)SR°$, $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR°_2$; $-C(O)N(OR°)R°$; $-C(O)C(O)R°$; $-C(O)CH_2C(O)R°$; $-C(NOR°)R°$; $-(CH_2)_{0-4}SSR°$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R°$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR°$; $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R°$; $-S(O)_2NR°_2$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)R°$; $-N(R°)S(O)_2NR°_2$; $-N(R°)S(O)_2R°$; $-N(OR°)R°$; -

$C(NH)NR°_2$; $-P(O)_2R°$; $-P(O)R°_2$; $-OP(O)R°_2$; $-OP(O)(OR°)_2$; $SiR°_3$; -(alquileno C_{1-4} lineal o ramificado)O-$N(R°)_2$; o -(alquileno C_{1-4} lineal o ramificado)C(O)O-$N(R°)_2$, en el que cada R° puede estar sustituido como se define a continuación y es independientemente hidrógeno, alifático C_{1-6}, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo de 5-6 miembros que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre, o, a pesar de la definición anterior, dos apariciones independientes de R°, tomadas junto con su átomo o átomos intermedios, forman un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo, mono o bicíclico, de 3-12 miembros que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre, que puede estar sustituido como se define a continuación.

Los sustituyentes monovalentes adecuados en R° (o el anillo formado tomando dos apariciones independientes de R° junto con sus átomos intermedios), son independientemente halógeno, $-(CH_2)_{0-2}R^•$, -(haloR$^•$), $-(CH_2)_{0-2}OH$, $-(CH_2)_{0-2}OR^•$, $-(CH_2)_{0-2}CH(OR^•)_2$; -O(haloR$^•$), -CN, $-N_3$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)R^•$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)OH$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)OR^•$, $-(CH_2)_{0-2}SR^•$, $-(CH_2)_{0-2}SH$, $-(CH_2)_{0-2}NH_2$, $-(CH_2)_{0-2}NHR^•$, $-(CH_2)_{0-2}NR^•_2$, $-NO_2$, $-SiR^•_3$, $-OSiR^•_3$, $-C(O)SR^•$, -(alquileno C_{1-4} lineal o ramificado)C(O)OR$^•$ o -SSR$^•$ en los que cada R$^•$ está sin sustituir o cuando está precedido por "halo" está sustituido únicamente con uno o más halógenos y se selecciona independientemente entre alifático C_{1-4}, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo de 5-6 miembros que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre. Los sustituyentes divalentes adecuados en un átomo de carbono saturado de R° incluyen =O y =S.

Los sustituyentes divalentes adecuados en un átomo de carbono saturado de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen los siguientes: =O, =S, $=NNR^•_2$, =NNHC(O)R$^•$, =NNHC(O)OR$^•$, $=NNHS(O)_2R^•$, $=NR^•$, $=NOR^•$, $-O(C(R^•_2))_{2-3}O-$ o $-S(C(R^•_2))_{2-3}S-$, en los que cada aparición independiente de R$^•$ se selecciona entre hidrógeno, alifático C_{1-6} que puede estar sustituido como se define a continuación, o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo sin sustituir de 5-6 miembros que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre. Los sustituyentes divalentes adecuados que se enlazan a carbonos sustituibles próximos de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen: $-O(CR^•_2)_{2-3}O-$, en los que cada aparición independiente de R$^•$ se selecciona entre hidrógeno, alifático C_{1-6} que puede estar sustituido como se define a continuación, o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo sin sustituir de 5-6 miembros que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre.

Los sustituyentes adecuados en el grupo alifático de R$^•$ incluyen halógeno, -R$^•$, -(haloR$^•$), -OH, -OR$^•$, -O(haloR$^•$), -CN, -C(O)OH, -C(O)OR$^•$, $-NH_2$, -NHR$^•$, $-NR^•_2$ o $-NO_2$, en los que cada R$^•$ está sin sustituir o cuando está precedido por "halo" está sustituido únicamente con uno o más halógenos, y es independientemente alifático C_{1-4}, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo de 5-6 miembros que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre.

Los sustituyentes adecuados en un nitrógeno sustituible de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen $-R^†$, $-NR^†_2$, $-C(O)R^†$, $-C(O)OR^†$, $-C(O)C(O)R^†$, $-C(O)CH_2C(O)R^†$, $-S(O)_2R^†$, $-S(O)_2NR^†_2$, $-C(S)NR^†_2$, $-C(NH)NR^†_2$ o $-N(R^†)S(O)_2R^†$; en los que cada R† es independientemente hidrógeno, alifático C_{1-6} que puede estar sustituido como se define a continuación, -OPh no sustituido o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo no sustituido de 5-6-miembros que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre, o, a pesar de la definición anterior, dos apariciones independientes de R†, tomados junto con su átomo o átomos intermedios forman un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo, mono o bicíclico, de 3-12 miembros que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre.

Los sustituyentes adecuados en el grupo alifático de R† son independientemente halógeno, -R$^•$, -(haloR$^•$), -OH, -OR$^•$, -O(haloR$^•$), -CN, -C(O)OH, -C(O)OR$^•$, $-NH_2$, -NHR$^•$, $-NR^•_2$ o $-NO_2$, en los que cada R$^•$ está sin sustituir o cuando está precedido de "halo" está sustituido únicamente con uno o más halógenos, y es independientemente alifático C_{1-4}, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo de 5-6 miembros que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre.

Grupo protector adecuado - Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo protector adecuado", se refiere a grupos protectores de amino o a grupos protectores de hidroxilo dependiendo de su ubicación dentro del compuesto e incluye los descritos en detalle en Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999.

Los grupos protectores de amino adecuados incluyen carbamato de metilo, carbamato de etilo, carbamato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc), carbamato de 9-(2-sulfo)fluorenilmetilo, carbamato de 9-(2,7-dibromo)fluoroenilmetilo, carbamato de 2,7-di-*t*-butil-[9-(10,10-dioxo-10,10,10,10-tetrahidrotioxantil)]metilo (DBD-Tmoc), carbamato de 4-metoxifenacilo (Phenoc), carbamato de 2,2,2-tricloroetilo (Troc), carbamato de 2-trimetilsililetilo (Teoc), carbamato de 2-feniletilo (hZ), carbamato de 1-(1-adamantil)-1-metiletilo (Adpoc), carbamato de 1,1-dimetil-2-haloetilo, carbamato de 1,1-dimetil-2,2-dibromoetilo (DB-*t*-BOC), carbamato de 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetilo (TCBOC), carbamato de 1-metil-1-(4-bifenilil)etilo (Bpoc), carbamato de 1-(3,5-di-*t*-butilfenil)-1-metiletilo (*t*-Bumeoc), carbamato de 2-(2'- y 4'-piridil)etilo (Pyoc), carbamato de 2-(*N,N*-diciclohexilcarboxamido)etilo, carbamato de *t*-butilo (BOC), carbamato de 1-adamantilo (Adoc), carbamato de vinilo (Voc), carbamato de alilo (Alloc), carbamato de 1-isopropilalilo (Ipaoc), carbamato de cinamilo (Coc), carbamato de 4-nitrocinamilo (Noc), carbamato de 8-quinolilo, carbamato de *N*-

hidroxipiperidinilo, carbamato de alquilditio, carbamato de bencilo (Cbz), carbamato de *p*-metoxibencilo (Moz), carbamato de *p*-nitobencilo, carbamato de *p*-bromobencilo, carbamato de *p*-clorobencilo, carbamato de 2,4-diclorobencilo, carbamato de 4-metilsulfinilbencilo (Msz), carbamato de 9-antrilmetilo, carbamato de difenilmetilo, carbamato de 2-metiltioetilo, carbamato de 2-metilsulfoniletilo, carbamato de 2-(*p*-toluenosulfonil)etilo, carbamato de [2-(1,3-ditianil)]metilo (Dmoc), carbamato de 4-metiltiofenilo (Mtpc), carbamato de 2,4-dimetiltiofenilo (Bmpc), carbamato de 2-fosfonioetilo (Peoc), carbamato de 2-trifenilfosfonioisopropilo (Ppoc), carbamato de 1,1-dimetil-2-cianoetilo, carbamato de *m*-cloro-*p*-aciloxibencilo, carbamato de *p*-(dihidroxiboril)bencilo, carbamato de 5-benzoisoxazolilmetilo, carbamato de 2-(trifluorometil)-6-cromonilmetilo (Tcroc), carbamato de *m*-nitrofenilo, carbamato de 3,5-dimetoxibencilo, carbamato de *o*-nitrobencilo, carbamato de 3,4-dimetoxi-6-nitrobencilo, carbamato de fenil(*o*-nitrofenil)metilo, derivado de fenotiazinil-(10)-carbonilo, derivado de *N'*-*p*-toluenosulfonilaminocarbonilo, derivado de *N'*-fenilaminotiocarbonilo, carbamato de *t*-amilo, tiocarbamato de *S*-bencilo, carbamato de *p*-cianobencilo, carbamato de ciclobutilo, carbamato de ciclohexilo, carbamato de ciclopentilo, carbamato de ciclopropilmetilo, carbamato de *p*-deciloxibencilo, carbamato de 2,2-dimetoxicarbonilvinilo, carbamato de *o*-(*N,N*-dimetilcarboxamido)bencilo, carbamato de 1,1-dimetil-3-(*N,N*-dimetilcarboxamido)propilo, carbamato de 1,1-dimetilpropinilo, carbamato de di(2-piridil)metilo, carbamato de 2-furanilmetilo, carbamato de 2-yodoetilo, carbamato de isobornilo, carbamato de isobutilo, carbamato de isonicotinilo, carbamato de *p*-(*p'*-metoxifenilazo)bencilo, carbamato de 1-metilciclobutilo, carbamato de 1-metilciclohexilo, carbamato de 1-metil-1-ciclopropilmetilo, carbamato de 1-metil-1-(3,5-dimetoxifenil)etilo, carbamato de 1-metil-1-(*p*-fenilazofenil)etilo, carbamato de 1-metil-1-feniletilo, carbamato de 1-metil-1-(4-piridil)etilo, carbamato de fenilo, carbamato de *p*-(fenilazo)bencilo, carbamato de 2,4,6-tri-*t*-butilfenilo, carbamato de 4-(trimetilamonio)bencilo, carbamato de 2,4,6-trimetilbencilo, formamida, acetamida, cloroacetamida, tricloroacetamida, trifluoroacetamida, fenilacetamida, 3-fenilpropanamida, picolinamida, 3-piridilcarboxamida, derivado de *N*-benzoilfenilalanilo, benzamida, *p*-fenilbenzamida, *o*-nitofenilacetamida, *o*-nitrofenoxiacetamida, acetoacetamida, (*N'*-ditiobenciloxicarbonilamino)acetamida, 3-(*p*-hidroxifenil)propanamida, 3-(*o*-nitrofenil)propanamida, 2-metil-2-(*o*-nitrofenoxi)propanamida, 2-metil-2-(*o*-fenilazofenoxi)propanamida, 4-clorobutanamida, 3-metil-3-nitrobutanamida, o-nitrocinnamida, derivado de *N*-acetilmetionina, *o*-nitrobenzamida, *o*-(benzoiloximetil)benzamida, 4,5-difenil-3-oxazolin-2-ona, *N*-ftalimida, *N*-ditiasuccinimida (Dts), *N*-2,3-difenilmaleimida, *N*-2,5-dimetilpirrol, aducto de *N*-1,1,4,4-tetrametildisililazaciclopentano (STABASE), 1,3-dimetil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituida, 1,3-dibencil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituida, 3,5-dinitro-4-piridona 1-sustituida, *N*-metilamina, *N*-alilamina, *N*-[2-(trimetilsilil)etoxi]metilamina (SEM), *N*-3-acetoxipropilamina, *N*-(1-isopropil-4-nitro-2-oxo-3-pirrolin-3-il)amina, sales de amonio cuaternario, *N*-bencilamina, *N*-di(4-metoxifenil)metilamina, *N*-5-dibenzosuberilamina, *N*-trifenilmetilamina (Tr), *N*-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amina (MMTr), *N*-9-fenilfluorenilamina (PhF), *N*-2,7-dicloro-9-fluorenilmetilenoamina, *N*-ferrocenilmetilamino (Fcm), *N'*-óxido de *N*-2-picolilamino, *N*-1,1-dimetiltiometilenoamina, *N*-bencilidenoamina, *N*-*p*-metoxibencilidenoamina, *N*-difenilmetilenoamina, *N*-[(2-piridil)mesitil]metilenoamina, *N*-(*N',N'*-dimetilaminometileno)amina, *N,N'*-isopropilidenodiamina, *N*-*p*-nitrobencilidenoamina, *N*-salicilidenamina, *N*-5-clorosalicilidenamina, *N*-(5-cloro-2-hidroxifenil)fenilmetilenoamina, *N*-ciclohexilidenoamina, *N*-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)amina, derivado de *N*-borano, derivado de ácido *N*-difenilborínico, *N*-[fenil(pentacarbonilcromo- o tungsteno)carbonil]amina, quelato de *N*-cobre, quelato de *N*-cinc, *N*-nitroamina, *N*-nitrosoamina, *N*-óxido de amina, difenilfosfinamida (Dpp), dimetiltiofosfinamida (Mpt), difeniltiofosfinamida (Ppt), fosforamidatos de dialquilo, fosforamidato de dibencilo, fosforamidato de difenilo, bencenosulfenamida, o-nitrobencenosulfenamida (Nps), 2,4-dinitrobencenosulfenamida, pentaclorobencenosulfenamida, 2-nitro-4-metoxibencenosulfenamida, trifenilmetilsulfenamida, 3-nitropiridinasulfenamida (Npys), *p*-toluenosulfonamida (Ts), bencenosulfonamida, 2,3,6,-trimetil-4-metoxibencenosulfonamida (Mtr), 2,4,6-trimetoxibencenosulfonamida (Mtb), 2,6-dimetil-4-metoxibencenosulfonamida (Pme), 2,3,5,6-tetrametil-4-metoxibencenosulfonamida (Mte), 4-metoxibencenosulfonamida (Mbs), 2,4,6-trimetilbencenosulfonamida (Mts), 2,6-dimetoxi-4-metilbencenosulfonamida (iMds), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonamida (Pmc), metanosulfonamida (Ms), β-trimetilsililetanosulfonamida (SES), 9-antracenosulfonamida, 4-(4',8'-dimetoxinaftilmetil)bencenosulfonamida (DNMBS), bencilsulfonamida, trifluorometilsulfonamida y fenacilsulfonamida.

Los grupos protectores de hidroxilo adecuados incluyen metilo, metoxilmetilo (MOM), metiltiometilo (MTM), *t*-butiltiometilo, (fenildimetilsilil)metoximetilo (SMOM), benciloximetilo (BOM), *p*-metoxibenciloximetilo (PMBM), (4-metoxifenoxi)metilo (*p*-AOM), guaiacolmetilo (GUM), *t*-butoximetilo, 4-penteniloximetilo (POM), siloximetilo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 2,2,2-tricloroetoximetilo, bis(2-cloroetoxi)metilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo (SEMOR), tetrahidropiranilo (THP), 3-bromotetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, 1-metoxiciclohexilo, 4-metoxitetrahidropiranilo (MTHP), 4-metoxitetrahidrotiopiranilo, S,S-dióxido de 4-metoxitetrahidrotiopiranilo, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxi piperidin-4-ilo (CTMP), 1,4-dioxan-2-ilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofuranilo, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-octahidro-7,8,8-trimetil-4,7-metanobenzofuran-2-ilo, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 1-metil-1-metoxietilo, 1-metil-1-benciloxietilo, 1-metil-1-benciloxi-2-fluoroetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 2-(fenilselenil)etilo, *t*-butilo, alilo, *p*-clorofenilo, *p*-metoxifenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, *p*-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, *o*-nitrobencilo, *p*-nitrobencilo, *p*-halobencilo, 2,6-diclorobencilo, *p*-cianobencilo, *p*-fenilbencilo, 2-picolilo, 4-picolilo, *N*-óxido de 3-metil-2-picolilo, difenilmetilo, *p,p*'-dinitrobenzhidrilo, 5-dibenzosuberilo, trifenilmetilo, α-naftildifenilmetilo, *p*-metoxifenildifenilmetilo, di(*p*-metoxifenil)fenilmetilo, tri(*p*-metoxifenil)metilo, 4-(4'-bromofenaciloxifenil)difenilmetilo, 4,4',4"-tris(4,5-dicloroftalimidofenil)metilo, 4,4',4"-tris(levulinoiloxifenil)metilo, 4,4',4"-tris(benzoíloxifenil)metilo, 3-(imidazol-1-il)bis(4',4"-dimetoxifenil)metilo, 1,1-bis(4-metoxifenil)-1'-pirenilmetilo, 9-antrilo, 9-(9-fenil)xantenilo, 9-(9-fenil-10-oxo)antrilo, 1,3-benzoditiolan-2-ilo, S,S-dióxido de benzoisotiazolilo, trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), dimetilisopropilsililo (IPDMS), dietilisopropilsililo (DEIPS), dimetilhexilsililo, *t*-butildimetilsililo (TBDMS), *t*-butildifenilsililo (TBDPS), tribencilsililo, tri-*p*-xililsililo, trifenilsililo,

difenilmetilsililo (DPMS), *t*-butilmetoxifenilsililo (TBMPS), formiato, benzoilformiato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, trifluoroacetato, metoxiacetato, trifenilmetoxiacetato, fenoxiacetato, *p*-clorofenoxiacetato, 3-fenilpropionato, 4-oxopentanoato (levulinato), 4,4-(etilenoditio)pentanoato (levulinoilditioacetal), pivaloato, adamantoato, crotonato, 4-metoxicrotonato, benzoato, *p*-fenilbenzoato, 2,4,6-trimetilbenzoato (mesitoato), alquilcarbonato de metilo, carbonato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc), alquilcarbonato de etilo, alquilcarbonato de 2,2,2-tricloroetilo (Troc), carbonato de 2-(trimetilsilil)etilo (TMSEC), etilcarbonato de 2-(fenilsulfonilo) (Psec), etilcarbonato de 2-(trifenilfosfonio) (Peoc), alquilcarbonato de isobutilo, alquilcarbonato de vinilo, alquilcarbonato de alilo, alquilcarbonato de *p*-nitrofenilo, alquilcarbonato de bencilo, alquilcarbonato de *p*-metoxibencilo, alquilcarbonato de 3,4-dimetoxibencilo, alquilcarbonato de *o*-nitrobencilo, alquilcarbonato de *p*-nitrobencilo, alquiltiocarbonato de *S*-bencilo, carbonato de 4-etoxi-1-naftilo, ditiocarbonato de metilo, 2-yodobenzoato, 4-azidobutirato, 4-nitro-4-metilpentanoato, *o*-(dibromometil)benzoato, 2-formilbencenosulfonato, 2-(metiltiometoxi)etilo, 4-(metiltiometoxi)butirato, 2-(metiltiometoximetil)benzoato, 2,6-dicloro-4-metilfenoxiacetato, 2,6-dicloro-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxiacetato, 2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxiacetato, clorodifenilacetato, isobutirato, monosuccinoato, (*E*)-2-metil-2-butenoato, *o*-(metoxicarbonil)benzoato, α-naftoato, nitrato, *N,N,N',N'*-tetrametilfosforodiamidato de alquilo, *N*-fenilcarbamato de alquilo, borato, dimetilfosfinotioílo, 2,4-dinitrofenilsulfenato de alquilo, sulfato, metanosulfonato (mesilato), bencilsulfonato y tosilato (Ts). Para proteger 1,2- o 1,3-dioles, los grupos protectores incluyen metilenacetal, etilideno acetal, 1-*t*-butiletilideno cetal, 1-feniletilideno cetal, (4-metoxifenil)etiliden acetal, 2,2,2-tricloroetiliden acetal, acetónida, ciclopentilideno cetal, ciclohexilideno cetal, cicloheptiliden cetal, bencilideno acetal, *p*-metoxibencilideno acetal, 2,4-dimetoxibenciliden cetal, 3,4-dimetoxibenciliden acetal, 2-nitrobenciliden acetal, metoximetilen acetal, etoximetileno acetal, ortoéster de dimetoximetileno, ortoéster de 1-metoxietilideno, ortoéster de 1-etoxietilidina, ortoéster de 1,2-dimetoxietilideno, ortoéster de α-metoxibencilideno, derivado de 1-(*N,N*-dimetilamino)etilideno, derivado de α-(*N,N'*-dimetilamino)bencilideno, ortoéster de 2-oxaciclopentilideno, grupo di-*t*-butilsilileno (DTBS), derivado de 1,3-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxanilideno) (TIPDS), derivado de tetra-*t*-butoxidisiloxano-1,3-diilideno (TBDS), carbonatos cíclicos, boronatos cíclicos, boronato de etilo y boronato de fenilo.

En cualquier caso, cuando se muestra una variable química (por ejemplo, un grupo R) unida a un enlace que cruza un enlace de anillo, esto significa que una o más de dichas variables están unidas opcionalmente al anillo que tiene el enlace cruzado. Cada grupo R en dicho anillo se puede unir en cualquier posición adecuada, esto generalmente se entiende que significa que el grupo está unido en lugar de un átomo de hidrógeno en el anillo precursor. Esto incluye la posibilidad de que dos grupos R puedan unirse al mismo átomo de anillo. Además, cuando más de un grupo R está presente en un anillo, cada uno puede ser igual o diferente que otros grupos R unidos a él, y cada grupo se define independientemente de otros grupos que puedan estar unidos en otra parte de la misma molécula, incluso aunque puedan estar representados por el mismo identificador.

Biodegradable - Como se usa en el presente documento, el término "biodegradable" se refiere a moléculas que se degradan (es decir, pierden al menos parte de su estructura covalente) en condiciones fisiológicas o endosómicas. Las moléculas biodegradables no son necesariamente hidrolíticamente degradables y pueden requerir una acción enzimática para degradarse.

Biomolécula - Como se usa en el presente documento, el término "biomolécula" se refiere a moléculas (por ejemplo, polipéptidos, aminoácidos, polinucleótidos, nucleótidos, polisacáridos, azúcares, lípidos, nucleoproteínas, glucoproteínas, lipoproteínas, esteroides, metabolitos, etc.) tanto de origen natural como creadas artificialmente (por ejemplo, mediante métodos sintéticos o recombinantes) que se encuentran comúnmente en células y tejidos. Las clases específicas de biomoléculas incluyen, aunque no de forma limitativa, enzimas, receptores, neurotransmisores, hormonas, citoquinas, modificadores de la respuesta celular tales como factores de crecimiento y factores quimiotácticos, anticuerpos, vacunas, haptenos, toxinas, interferones, ribozimas, agentes antisensoriales, plásmidos, ADN y ARN.

Fármaco - Como se usa en el presente documento, el término "fármaco" se refiere a moléculas pequeñas o biomoléculas que alteran, inhiben, activan, o afectan de otra forma un evento biológico. Por ejemplo, los fármacos pueden incluir, aunque no de forma limitativa, sustancias anti-SIDA, sustancias antineoplásicas, antibióticos, sustancias antidiabéticas, inmunosupresores, sustancias antivíricas, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioideos, hipnóticos, antihistamínicos, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivos, relajantes musculares y sustancias anti-Parkinson, antiespasmódicos y contractores musculares incluyendo bloqueantes de los canales, mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparasitarios y/o antiprotozoarios, moduladores de las interacciones entre la célula y la matriz extracelular, incluidos los inhibidores del crecimiento celular y las moléculas antiadherentes, agentes vasodilatadores, inhibidores del ADN, ARN o la síntesis de proteínas, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, factores antiangiogénicos, factores antisecretores, anticoagulantes y/o agentes antitrombóticos, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, antieméticos, y agentes de formación de imágenes. Puede encontrarse un listado más completo de fármacos ilustrativos adecuados para su uso en la presente invención en "Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications" por Axel Kleemann y Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999; el "Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals", editado por Susan Budavari et al., CRC Press, 1996, y la United States Pharmacopeia-25/National Formulary-20, publicado por la United States Pharmcopeial Convention, Inc., Rockville MD, 2001.

Exógena - Como se usa en el presente documento, una molécula "exógena" es una que no está presente a niveles significativos en un paciente salvo que se administre al paciente. En determinadas realizaciones el paciente es un mamífero, por ejemplo, un ser humano, un perro, un gato, una rata, un minicerdo, etc. Como se usa en el presente documento, una molécula no está presente a niveles significativos en un paciente si el suero normal de este tipo de paciente incluyen menos de 0,1 mM de la molécula. En determinadas realizaciones, el suero normal del paciente puede incluir menos de 0,08 mM, menos de 0,06 mM, o menos de 0,04 mM de la molécula.

Hiperramificada - Como se usa en el presente documento, una estructura "hiperramificada" es una estructura covalente que incluye al menos una rama ramificada (por ejemplo, una estructura dendrimérica). Una estructura hiperramificada puede incluir subestructuras poliméricas y/o no poliméricas.

Suero normal - Como se usa en el presente documento, "suero normal" es el suero obtenido combinando cantidades aproximadamente iguales de la porción líquida de la sangre completa coagulada de cinco o más pacientes no diabéticos. Un paciente humano no diabético es uno seleccionado aleatoriamente de 18-30 años de edad que no presenta síntomas diabéticos en el momento de extraer la sangre.

Polímero - Como se usa en el presente documento, un "polímero" o "estructura polimérica" es una estructura que incluye una cadena de monómeros unidos covalentemente. Un polímero puede prepararse de un tipo de monómero o más de un tipo de monómero. El término "polímero" por tanto abarca copolímeros, incluidos copolímeros en bloque en los que se agrupan diferentes tipos de monómeros por separado en el polímero completo. Un polímero puede ser lineal o ramificado.

Polinucleótido - Como se usa en el presente documento, un "polinucleótido" es un polímero de nucleótidos. Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico", y oligonucleótido se pueden usar indistintamente. El polímero puede incluir nucleósidos naturales (es decir, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina), análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, dihidrouridina, metilpseudouridina, 1-metil adenosina, 1-metil guanosina, N6-metil adenosina, y 2-tiocitidina), bases modificadas químicamente, bases modificadas biológicamente (por ejemplo, bases metiladas), bases intercaladas, azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, 2'-O-metilcitidina, arabinosa, y hexosa), o grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos y enlaces de 5' -N-fosforamidita).

Polipéptido - Como se usa en el presente documento, un "polipéptido" es un polímero de aminoácidos. Los términos "polipéptido", "proteína", "oligopéptido" y "péptido" pueden usarse indistintamente. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no se producen en la naturaleza, pero que se pueden incorporar a una cadena polipeptídica) y/o análogos de aminoácidos como se conocen en la técnica. Asimismo, uno o más de los restos de aminoácidos en un polipéptido puede estar modificado, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química tal como un grupo hidrato de carbono, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo ácido graso, un enlazador de conjugación, funcionalización u otra modificación, etc. Estas modificaciones pueden incluir la ciclación del péptido, la incorporación de D-aminoácidos, etc.

Polisacárido - Como se usa en el presente documento, un "polisacárido" es un polímero de sacáridos. Los términos "polisacárido", "carbohidrato", y "oligosacárido", se pueden usar de manera indistinta. El polímero puede incluir sacáridos naturales (por ejemplo, arabinosa, lixosa, ribosa, xilosa, ribulosa, xilulosa, alosa, altrosa, galactosa, glucosa, gulosa, idosa, manosa, talosa, fructosa, psicosa, sorbosa, tagatosa, manoheptulosa, sedoheptulosa, octolosa, y sialosa) y/o sacáridos modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, 2'-desoxirribosa, y hexosa). Los disacáridos ilustrativos incluyen sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, gentiobiosia, isomaltosa, kojibiosa, laminaribiosa, manobiosa, melibiosa, nigerosa, rutinosa, y xilobiosa.

Molécula pequeña - Como se usa en el presente documento, El término "molécula pequeña" se refiere a moléculas, tanto si son de origen natural como creadas artificialmente (por ejemplo, mediante síntesis química), que tienen un peso molecular relativamente bajo. Normalmente, las moléculas pequeñas son monoméricas y tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 1500 Da. Las moléculas pequeñas preferidas son biológicamente activas ya que producen un efecto local o sistémico en animales, preferentemente mamíferos, más preferentemente, seres humanos. En determinadas realizaciones preferidas, la molécula pequeña es un fármaco. Preferentemente, aunque no necesariamente, el fármaco es uno que ya ha sido considerado seguro y eficaz para su uso por la agencia gubernamental o el organismo regulador apropiados. Por ejemplo, los fármacos para uso humano relacionados por la FDA a tenor de Ley 21 de Código de Normativa Federal Apartados 330.5, 331 a 361 y 440 a 460; la FDA enumera fármacos para su uso veterinario a tenor de la Ley 21 del Código de Normativa Federal Apartados 500 a 589, se consideran todos aceptables para su uso de acuerdo con la presente invención.

Tratar - Como se usa en el presente documento, El término "tratar" (o "que trata", "tratado", "tratamiento", etc.) se refiere a la administración de un conjugado de la presente divulgación a un sujeto que lo necesita con el objetivo de aliviar, mitigar, alterar, mejorar, restablecer o alterar una dolencia (por ejemplo, diabetes), un síntoma o síntomas de

una dolencia (por ejemplo, hiperglucemia), o la predisposición hacia una dolencia.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Comparación entre cromatogramas RP-HPLC obtenidos para (a) un conjugado ilustrativo sintetizado usando TSAT-C6 como bastidor, AEM como el ligando, y NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina como el fármaco (conjugado **I-1**) y (b) un conjugado de insulina-glucógeno sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 32.

Figura 2: Ensayo de estabilidad acelerada (AST) del conjugado **I-1** (□), conjugado **I-16** (Δ), y IHR (♦) en tampón PBS. Los conjugados demuestran una estabilidad muy potenciada sobre el IHR de calidad farmacéutica.

Figura 3: Resultados de estabilidad química del ensayo de estabilidad acelerada (AST): (a) estabilidad del conjugado RP-HPLC AST y (b) datos de CL/EM respecto de los conjugados de AST.

Figura 4: Bioactividad *in vivo* en ratas Sprague-Dawley (SD) macho no diabéticas (n=4), para conjugados recientes (▲) y conjugados de AST a las 72 h (○). La bioactividad de los conjugados de AST a las 72 h fue indistinguible de la de los conjugados recientes ($p > 0,21$ para todos los puntos temporales).

Figura 5: Perfil de depresión de glucosa en sangre en ratas SD macho no diabéticas, (n = 3) para insulina-dextrano inyectados por vía subcutánea (▲) (70 K) a una dosis de ~ 20 U de equivalentes de insulina/kg.

Figura 6: Perfil de depresión de glucosa en sangre en ratas SD macho no diabéticas, (n = 3) para insulina-glucógeno inyectados por vía subcutánea (■) (Tipo II oyster) a una dosis de ~ 2,5 U de equivalentes de insulina/kg.

Figura 7: Niveles de glucosa en sangre resultantes de una dosis subcutánea de 3,5 U equivalentes de insulina/kg de conjugado I-1 de insulina TSAT-C6-AEM-2 (♦) e insulina humana recombinante soluble (IRH) (□) en ratas SD macho no diabéticas. Cada conjunto de datos representa el promedio y la desviación estándar para n = 6 ratas.

Figura 8: Concentraciones de insulina en suero resultantes de una dosis subcutánea de 3,5 U equivalentes de insulina/kg de un conjugado **I-1** de insulina TSAT-C6-AEM-2 (♦) e insulina humana recombinante soluble (IRH) (□) en ratas SD macho no diabéticas. Cada conjunto de datos representa el promedio y la desviación estándar para n = 6 ratas.

Figura 9: Gráfico de niveles de insulina sérica (♦) y (○) glucosa en sangre tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas, en tiempo 0 Con el conjugado **I-7** de insulina TSAT-C6-AEM-2 (sustituido con B29) (5 U/kg). Los datos representan el promedio y la desviación estándar para n = 3 ratas.

Figura 10: Estructuras químicas de AEG, AEM, AEBM y AETM. La afinidad de estos ligandos basados en sacáridos por Con A aumenta como se muestra.

Figura 11: Estructuras químicas de algunos intermedios conjugados no dendriméricos ilustrativos. Los ligandos de conjugados ilustrativos que incluye un sacárido se muestran también a fines ilustrativos (AEG, AEM, AEBM, AETM, AEGA y AEF).

Figura 12: Gráfico de niveles de insulina sérica (izquierda) y glucosa en sangre (derecha) tras la inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas, en el tiempo 0 con el conjugado de insulina **I-1** TSAT-C6-AEM-2 (♦), insulina humana recombinante soluble, (○) e insulina lispro (Δ) (todas a 3,5 U/kg). Los datos representan el promedio y la desviación estándar para n = 6 ratas.

Figura 13: Gráfico de niveles de glucosa en sangre tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas, ratas SD macho (n=3 para cada formulación) a tiempo 0 con conjugados de insulina basados en TSAT-C6 con los diferentes ligandos como se muestra. La respuesta de disminución de la glucosa disminuye a medida que la afinidad del ligando aumenta.

Figura 14: Gráfico de niveles de insulina sérica (izquierda) y glucosa en sangre (derecha) tras la inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con el conjugado **I-1** TSAT-C6-AEM-2 (3,5 U/kg).

Figura 15: Gráfico de niveles de insulina sérica (izquierda) y glucosa en sangre (derecha) tras la inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con el conjugado **I-3** TSAT-C6-AEBM-2 (5 U/kg).

Figura 16: Gráfico de niveles de insulina sérica (izquierda) y glucosa en sangre (derecha) tras la inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con el conjugado **I-4** de insulina TSAT-C6-AEBM-1 AETM-1 (5 U/kg).

Figura 17: Gráfico de niveles de insulina sérica (izquierda) y glucosa en sangre (derecha) tras la inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con el conjugado **I-2** TSAT-C6-AETM-2 (5 U/kg).

Figura 18: Gráfico de niveles de insulina sérica y glucosa en sangre tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con **I-2** conjugado con TSAT-C6-AETM-2 seguido por inyección IP de alfa-metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. Alfa-metil manosa es un sacárido de muy alta afinidad que puede competir con AETM por la unión a lectinas tales como Con A. Como se muestra, el cambio en el perfil PK/PD que es el resultado de la inyección de alfa-metil manosa es muy significativo ($p<0,05$).

Figura 19: Gráfico de niveles de insulina sérica y glucosa en sangre tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con insulina humana recombinante soluble (IHR) seguido por inyección IP de alfa-metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. Como se muestra, la falta de cambio en el perfil PK/PD es el resultado de la inyección de alfa metil manosa ($p>>0,05$).

Figura 20: Gráfico de niveles de insulina sérica tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3

para cada experimento) en el tiempo 0 con el conjugado **I-2** TSAT-C6-AETM-2 seguido por inyección IP de alfa metil manosa (♦), L-fucosa (■) o solución salina (▲) después de 15 minutos. Como se muestra, alfa-metil manosa y L-fucosa parecen presentar el mismo tipo de efecto.

Figura 21: Gráfico de niveles de insulina en suero tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas en el tiempo 0 con el conjugado **I-2** TSAT-C6-AETM-2 seguido por inyección IP de glucosa (♦), galactosa (■) o solución salina (▲) después de 15 minutos. Como se muestra, la galactosa no presenta efectos en comparación con la solución salina. La glucosa parece presentar un pequeño efecto; sin embargo, esto se complica por el hecho de que la insulina exógena procedente del conjugado disminuye rápidamente la glucosa, de tal manera que no se produce el efecto sostenido observado con la alfa-metil manosa y L-fucosa.

Figura 22: Gráfico de niveles de insulina en suero y glucosa en sangre tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con la solución del conjugado **I-2** TSAT-C6-AETM-2 en 5 U/kg disueltas tanto en (a) solución salina tamponada que contenía alfa metil manosa 1M como en (b) solución salina. En (a) las ratas se inyectaron posteriormente en 15 min., con el mismo volumen de solución salina utilizado en (b) en un sitio subcutáneo diferente que el utilizado para la solución del conjugado. En (b) las ratas se inyectaron posteriormente en 15 min., con el mismo volumen de solución de alfa-metil manosa 1 M utilizado en (a) en un sitio subcutáneo diferente al utilizado para la solución del conjugado. Como se muestra, los niveles de insulina en suero no aumentan y los niveles de glucosa en sangre no disminuyen en el experimento (a) con respecto al experimento (b).

Figura 23: Gráfico de niveles de insulina en suero y glucosa en sangre tras la inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con la solución del conjugado **I-2** TSAT-C6-AETM-2 en 5 U/kg. a los 15 min, 60 min, 120 min, o 240 min después de la inyección del conjugado, se administraron a las ratas 4 g/kg por vía IP de una inyección de a-MM.

Figura 24: Gráfico de niveles de insulina sérica y glucosa en sangre tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con **I-7** conjugado con TSAT-C6-AEM-2 seguido por inyección IP de alfa-metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. Alfa-metil manosa es un sacárido de muy alta afinidad que puede competir con AEM por la unión a lectinas tales como Con A. Como se muestra, el cambio en el perfil PK/PD que es el resultado de la inyección de alfa-metil manosa es muy significativo ($p<0,05$).

Figura 25: Gráfico de niveles de insulina sérica y glucosa en sangre tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con **I-5** conjugado con TSAT-C6-GA-2 seguido por inyección IP de alfa-metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. Alfa-metil manosa es un sacárido de muy alta afinidad que puede competir con AEM por la unión a lectinas tales como Con A. Como se muestra, el cambio en el perfil PK/PD que es el resultado de la inyección de alfa-metil manosa es muy significativo.

Figura 26: Gráfico de niveles de insulina sérica y glucosa en sangre tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con **I-8** conjugado con DSS-C6-AEM-1 seguido por inyección IP de alfa-metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. Alfa-metil manosa es un sacárido de muy alta afinidad que puede competir con AEM por la unión a lectinas tales como Con A. Como se muestra, el cambio en el perfil PK/PD que es el resultado de la inyección de alfa-metil manosa no es tan significativo.

Figura 27: Gráfico de niveles de insulina sérica y glucosa en sangre tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con **I-9** conjugado con TSPE-AEM-3 seguido por inyección IP de alfa-metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. Alfa-metil manosa es un sacárido de muy alta afinidad que puede competir con AEM por la unión a lectinas tales como Con A. Como se muestra, el cambio en el perfil PK/PD que es el resultado de la inyección de alfa-metil manosa es significativo ($p<0,05$).

Figura 28: Gráfico de niveles de insulina sérica y glucosa en sangre tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con **I-10** conjugado con DSS-AETM-1 seguido por inyección IP de alfa-metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. Alfa-metil manosa es un sacárido de muy alta afinidad que puede competir con AEM por la unión a lectinas tales como Con A. Como se muestra, el cambio en el perfil PK/PD que es el resultado de la inyección de alfa-metil manosa es significativo ($p<0,05$).

Figura 29: Gráfico de niveles de insulina sérica y glucosa en sangre tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3) en el tiempo 0 con **I-11** conjugado con TSPE-AETM-3 seguido por inyección IP de alfa-metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. Alfa-metil manosa es un sacárido de muy alta afinidad que puede competir con AEM por la unión a lectinas tales como Con A. Como se muestra, el cambio en el perfil PK/PD que es el resultado de la inyección de alfa-metil manosa es significativo ($p<0,05$).

Figura 30: Gráfico de la concentración de insulina en suero en función del tiempo para inyecciones i.v. de 0,4 mg/kg de (♦) IHR y (▲) conjugado **I-6** TSAT-C6-AETM-2 en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por grupo). Los datos (promedio de n=3) se ajustaron utilizando un modelo biexponencial de dos compartimentos. El conjugado TSAT-C6-AETM-2 se eliminó del suero de forma mucho más rápida de IHR.

Figura 31: Gráficos de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre(○) tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por dosis) a tiempo 0 con el conjugado (**I-6**) TSAT-C6-AETM-2 de acción prolongada seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos. Las Formulaciones se prepararon como se describe en el Ejemplo 51: (a) 1xP-1xZ, (b) 4xP-4xZ, y (c) 10xP-4xZ.

Figura 32: Gráficos de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre(○) tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por dosis) a tiempo 0 con el conjugado (**I-6**) TSAT-C6-AETM-2 de acción prolongada seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos. Las Formulaciones se prepararon como

se describe en el Ejemplo 52: (a) 4xP-1xZ y (b) 4xP-2xZ.

Figura 33: Gráficos de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre(○) tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por dosis) a tiempo 0 con el conjugado (**I-6**) TSAT-C6-AETM-2 de acción prolongada seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos. Las Formulaciones se prepararon como se describe en el Ejemplo 52: (a) 10xP-1xZ y (b) 10xP-2xZ.

Figura 34: Gráficos de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre(○) tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por dosis) a tiempo 0 con el conjugado (**I-6**) TSAT-C6-AETM-2 de acción prolongada seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos. Las Formulaciones se prepararon como se describe en el Ejemplo 53: (a) sin cresol y (b) 4x cresol.

Figura 35: Gráficos de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre(○) tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por dosis) a tiempo 0 con el conjugado (**I-6**) TSAT-C6-AETM-2 de acción prolongada seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos. Las Formulaciones se prepararon como se describe en el Ejemplo 54: (a) sin sal, (b) 3,3x de sal, y (c) glicerol.

Figura 36: Gráficos de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre(○) tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por dosis) a tiempo 0 con el conjugado (**I-6**) TSAT-C6-AETM-2 de acción prolongada seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos. Se prepararon formulaciones que contenían cantidades crecientes de insulina sin modificar como se describe en el Ejemplo 55: (a) 1/24, (b) 1/12, y(c) 1/6.

Figura 37: Gráfico de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (○) tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por dosis) en el tiempo 0 con el conjugado **I-6** TSAT-C6-AETM-2 de acción prolongada preparado de acuerdo con el Ejemplo 56 seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos.

Figura 38: Gráfico de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (○) tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por dosis) en el tiempo 0 con el conjugado **I-6** TSAT-C6-AETM-2 de acción prolongada preparado de acuerdo con el Ejemplo 57 seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos. El material se inyectó tras el almacenamiento a 2-8 C durante (a) una semana o (b) dos semanas.

Figura 39: Gráfico de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (○) tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por dosis) en el tiempo 0 con el conjugado **I-6** TSAT-C6-AETM-2 de acción prolongada preparado de acuerdo con el Ejemplo 57 seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos. El material se inyectó tras el almacenamiento a temperatura ambiente durante (a) una semana o (b) dos semanas.

Figura 40: Gráfico de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (○) tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por dosis) en el tiempo 0 con formulaciones del conjugado de acción prolongada preparado de acuerdo con el Ejemplo 58 seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos. Los conjugados son DSS-AEM-1 (**I-8**), DSS-AETM-1 (**I-10**), TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**), C6-amida-AEM-2 (**I-17**), TSPE-AEM-3 (**I-9**), y TSPE-AETM-3 (**I-11**).

Figura 41: Gráfico de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (○) tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por dosis) en el tiempo 0 con formulaciones del conjugado de acción prolongada preparado de acuerdo con el Ejemplo 59 seguido por inyección IP de alfa-metil manosa (4 g/kg) en 240 minutos. Los conjugados son (a) TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) y (b) TSAT-C6-GA-2.

Figura 42: Gráfico de niveles de glucosa en sangre tras inyección subcutánea en ratas SD no diabéticas (normales) y diabéticas (DM) macho en el tiempo 0 con el conjugado **I-6** TSAT-C6-AETM-2 (sustituido con B29, PZI). El conjugado se administró a 5, 10 y 20 U/kg. Como se muestra, las ratas SD macho no diabéticas no muestran ninguna hipoglucemia mientras que los niveles de glucosa en ratas SD diabéticas macho mostró una respuesta proporcional a la dosis clara que duró más de 8 horas en la dosis más alta.

Figura 43: Gráfico de niveles de glucosa en sangre durante 24 horas tras inyección subcutánea en ratas SD no diabéticas (normales) y diabéticas (DM) macho en el tiempo 0 con el conjugado **I-6** TSAT-C6-AETM-2 (sustituido con B29, PZI). El conjugado se administró a 7, 14 y 28 U/kg.

Figura 44: Gráfico de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (○) tras inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (n=3 por dosis) en el tiempo 0 con el conjugado **I-17** de acción prolongada preparado de acuerdo con el Ejemplo 67 seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos.

Figura 45: Estructuras de conjugados de insulina ilustrativos. Como se describe en los ejemplos, cada uno de estos conjugados se prepararon con insulina humana natural recombinante (véase la Figura 63 para observar la estructura de la insulina humana natural). El símbolo "insulina" en el interior de un óvalo como se muestra en la Figura 45 pretende por tanto representar principalmente una insulina humana natural. Como se analiza en el presente documento, debe entenderse que la presente divulgación abarca también entre otras las versiones de estos y otros conjugados que incluyen una molécula de insulina diferente que la insulina humana natural.

Figura 46: Gráficos de la concentración de insulina en suero en función del tiempo tras inyección del conjugado **I-6** o IHR (izquierda) y el conjugado **I-6** con y sin glucosa o α-metil manosa (derecha).

Figura 47: Los dos primeros paneles muestran gráficos de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (○) tras infusión intravenosa (i.v.) constante de IHR (3,5 mU/min) o **I-6** (15 mU/min) en ratas SD macho no diabéticas (n=3). Se administró una inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos. Los siguientes tres paneles comparan los gráficos de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (○) tras infusión intravenosa (i.v.) constante de IHR (3,5 mU/min) o **I-6** (15 mU/min) en ratas SD macho no diabéticas (n=3) cuando se administró una inyección IP de glucosa (4, 2, o 1 g/kg) en 240 minutos.

Figura 48: Gráficos de la concentración de insulina en suero en función del tiempo tras inyección de conjugados

con y sin glucosa o α-metil manosa. Se infundieron las ratas por vía i.v. con una solución azucarada en t = -60 min y a lo largo del estudio. Se inyectó cada conjugado a 10 U/kg i.v. en el tiempo 0, y se midieron las concentraciones de los conjugados en el suero.

Figura 49: Composiciones de conjugados de insulina ensayados en minicerdos no diabéticos, estudios de semivida de eliminación dependientes de azúcar. Como se describe en los ejemplos, cada uno de estos conjugados se prepararon con insulina humana natural recombinante (véase la Figura 63 para observar la estructura de la insulina humana natural). El esquema de Figura 49 pretende por tanto representar principalmente una insulina humana natural. Como se analiza en el presente documento, debe entenderse que la presente divulgación abarca también entre otras las versiones de estos y otros conjugados que incluyen una molécula de insulina diferente que la insulina humana natural.

Figura 50: La semivida de eliminación de la fase β da como resultado minicerdos no diabéticos durante la infusión de glucosa, α-metil manosa o solución salina.

Figura 51: Gráfico de concentraciones en suero de (a) insulina humana recombinante (IHR) y (b) conjugado II-2 de insulina Di-Sub-AETM-2 tras una inyección intravenosa (i.v.) de 0,1 U/kg en minicerdos Yucatan no diabéticos macho provistos de puertos de acceso vascular doble (n = 3 por estudio). En cada experimento, los animales se infundieron por vía i.v. (♦) con una solución de alfa metil manosa (a-MM) (infundida al 25 % p/v a una velocidad constante de 80 ml/h) o (▲) sin solución. Los datos se representaron gráficamente como valores promedio ajustados con una curva derivada del modelo biexponencial de dos compartimentos.

Figura 52: Curvas de depresión de glucosa en sangre en minicerdos Yucatan macho no diabéticos provistos de puertos de acceso vascular doble (n = 3 por estudio) tras inyección i.v. de conjugados a 0,1 U/kg en condiciones de (a) sin infusión i.v. de azúcar o (b) infusión i.v. de alfa metil manosa (a-MM) (25 % p/v infundida a una velocidad constante de 80 ml/h). (■) IHR, (○) **I-7**, (♦) **I-6**, (▲) **I-11**, y (•) **II-2**.

Figura 53: niveles de glucosa en sangre en (a, -, símbolos cerrados) minicerdos Yucatan diabéticos con aloxano (n=3 por dosis) y (b, ----, símbolos abiertos) minicerdos Yucatan no diabéticos (n=3 por dosis) en condiciones de ayuno tras una inyección sub-Q en el tiempo 0 con conjugado **II-2** de insulina Di-Sub-AETM-2 soluble a las dosis de 0,25, 0,50, y 1,00 U/kg. Los datos se representaron gráficamente como valores promedio ± una desviación estándar. NOTA: La escala de la Figura 53(b) se ha ampliado por claridad.

Figura 54: Niveles de glucosa en sangre en (a, -, símbolos cerrados) minicerdos Yucatan diabéticos con aloxano (n=3 por dosis) y (b, ----, símbolos abiertos) minicerdos Yucatan no diabéticos (n=3 por dosis) en condiciones de ayuno después de una inyección sub-Q en el tiempo 0 con insulina humana recombinante soluble (IHR) a las dosis de (▲,Δ) 0,063 y (■,□) 0,125 U/kg. Los datos se representaron gráficamente como valores promedio ± una desviación estándar. NOTA: La escala de la Figura 54(b) se ha ampliado por claridad.

Figura 55: Conjugados de insulina adicionales para su uso en estudios de semivida de eliminación dependiente de azúcar en minicerdos no diabéticos. Como se describe en los ejemplos, cada uno de estos conjugados se prepararon con insulina humana natural recombinante (véase la Figura 63 para observar la estructura de la insulina humana natural). El esquema de Figura 55 pretende por tanto representar principalmente una insulina humana natural. Como se analiza en el presente documento, debe entenderse que la presente divulgación abarca también entre otras las versiones de estos y otros conjugados que incluyen una molécula de insulina diferente que la insulina humana natural.

Figura 56: Gráficos de la concentración de insulina en suero en función del tiempo tras la administración de IHR o del conjugado **I-6** en ratas y minicerdos.

Figura 57: Sumario de resultados de la semivida i.v.en minicerdos para conjugados de insulina adicionales.

Figura 58: Gráfico de niveles de insulina en suero tras una única inyección subcutánea de 0,25, 0,5 y 1 U/kg del conjugado II-2 de insulina en minicerdos diabéticos y normales.

Figura 59: Gráficos de los niveles de glucosa en suero tras inyecciones i.v. de IHR y los conjugados **I-6**, **II-3** y **II-2** en minicerdos con y sin infusión de a-MM.

Figura 60: Estructura de conjugados de insulina seleccionados (C3, C4, y C7) ensayados en minicerdos como controles, junto con los conjugados de insulina **I-6**, **I-12**, **II-2**, y **II-3**. Como se describe en los ejemplos, cada uno de estos conjugados se prepararon con insulina humana natural recombinante (véase la Figura 63 para observar la estructura de la insulina humana natural). El esquema de Figura 60 pretende por tanto representar principalmente una insulina humana natural. Como se analiza en el presente documento, debe entenderse que la presente divulgación abarca también entre otras las versiones de estos y otros conjugados que incluyen una molécula de insulina diferente que la insulina humana natural.

Figura 61: Gráficos de niveles de glucosa en suero tras inyecciones i.v. de IHR y los conjugados de insulina **I-6**, **I-12**, **II-2** y **C3** en minicerdos con y sin infusión de a-MM.

Figura 62: Gráficos de niveles de glucosa en suero tras inyecciones i.v. de IHR y los conjugados de insulina **C7**, **C4**, **II-3** y **II-2** en minicerdos con y sin infusión de a-MM.

Figura 63: Estructura de insulina humana natural.

Descripción detallada de diversas realizaciones

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para controlar los perfiles farmacocinéticos (PK) y/o farmacodinámicos (PD) de un fármaco tal como insulina de una manera que sea sensible a las concentraciones sistémicas de un sacárido tal como glucosa. Como se analiza en los ejemplos, los métodos se basan en parte en el descubrimiento de que cuando se modificaron determinados conjugados de insulina para incluir ligandos de sacáridos de alta afinidad, podrían prepararse para presentar perfiles de PK/PD que respondieran a cambios de

concentración de los sacáridos incluso en ausencia de una molécula de unión a sacárido multivalente exógena tal como Con A. Este hallazgo fue inesperado y proporciona una oportunidad sin precedentes para generar sistemas de fármacos sensibles a sacáridos exentos de lectinas simples. En otro aspecto, la divulgación proporciona conjugados ilustrativos y métodos para preparar los mismos. En general, estos conjugados incluyen un fármaco y uno o más ligandos separados que incluyen cada uno un sacárido. En determinadas realizaciones, los ligandos pueden competir con un sacárido (por ejemplo, glucosa o manosa) por su unión a una molécula endógena de unión a sacárido. En determinadas realizaciones, los ligandos pueden competir con glucosa o manosa por la unión a Con A. Como se describe con más detalle a continuación, en determinadas realizaciones, los ligandos y el fármaco pueden unirse covalentemente o no covalentemente a un armazón conjugado. En determinadas realizaciones, el armazón no es polimérico. En determinadas realizaciones, un conjugado puede tener un índice de polidispersidad de uno y un MW de menos de aproximadamente 20.000 Da. En determinadas realizaciones, el conjugado es de fórmula (I) o (II) como se define y describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, el conjugado es de acción prolongada (es decir, presenta un perfil de PK que es más sostenido que la insulina humana recombinante soluble o IHR).

Como se analiza con más detalle a continuación, debe entenderse que los métodos se pueden utilizar para administrar fármacos en respuesta a sacáridos diferentes de la glucosa. En particular, como se analiza en los ejemplos, se ha comprobado que los conjugados ilustrativos responden a sacáridos exógenos tales como alfa-metil manosa y L-fucosa. En determinadas realizaciones, esto se puede usar para preparar conjugados que se pueden controlar mediante la administración de uno de estos sacáridos exógenos (es decir, en vez de o además de controlarse mediante fluctuaciones en la glucosa endógena).

Conjugados

En un aspecto, la divulgación proporciona conjugados que comprenden una molécula de insulina conjugada con dos o más ligandos de sacáridos, en la que los dos o más ligandos son, cada uno de ellos, aminoetiltrimanosa (AETM), y en la que los dos o más ligandos de sacáridos separados se unen a la molécula de insulina mediante un armazón conjugado. Los ligandos son tales que, cuando el conjugado se administra a un mamífero, al menos una propiedad farmacocinética o farmacodinámica del conjugado es sensible a la concentración sérica de un segundo sacárido. En determinadas realizaciones, las propiedades de farmacocinética (PK) y/o farmacodinámica (PD) del conjugado son sensibles a la concentración sérica de un sacárido endógeno tal como glucosa. En determinadas realizaciones, las propiedades de PK y/o PD del conjugado son sensibles a la concentración sérica de un sacárido exógeno, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, manosa, L-fucosa, N-acetil glucosamina y/o alfa-metil manosa.

Como se analiza con más detalle a continuación, en determinadas realizaciones, los ligandos y el fármaco pueden unirse covalentemente o no covalentemente a un armazón conjugado.

En determinadas realizaciones, el peso molecular del conjugado exento de fármaco es menor de aproximadamente 10.000 Da. Por ejemplo, el peso molecular del conjugado exento de fármaco puede estar en el intervalo de aproximadamente 250 a aproximadamente 5.000 Da, aproximadamente 450 a aproximadamente 3.500 Da, aproximadamente 750 a aproximadamente 2.500 Da, o aproximadamente 900 a aproximadamente 2.000 Da.

En determinadas realizaciones, el peso molecular del conjugado que incluye el fármaco es menor de aproximadamente 20.000 Da. Por ejemplo, el peso molecular del conjugado que incluye el fármaco puede estar en el intervalo de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 18.000 Da, aproximadamente 4.000 a aproximadamente 15.000 Da, aproximadamente 5.000 a aproximadamente 10000 Da, o de aproximadamente 6.500 a aproximadamente 8.000 Da.

En determinadas realizaciones, el conjugado tiene un único peso molecular (es decir, tiene un índice de polidispersidad de uno).

Propiedades de PK y PD

En diversas realizaciones, el comportamiento farmacocinético y/o farmacodinámico de un conjugado (es decir, fármaco conjugado y/o fármaco que se ha liberado de un conjugado mediante degradación química o enzimática) puede modificarse mediante variaciones en la concentración sérica de un sacárido.

Por ejemplo, desde una perspectiva farmacocinética (PK), la curva de concentración sérica puede desplazarse hacia arriba cuando la concentración en suero del sacárido aumenta o cuando la concentración en suero del sacárido cruza un umbral (por ejemplo, es mayor que los niveles normales de glucosa.

En determinadas realizaciones, la curva de concentración sérica de un conjugado es sustancialmente diferente cuando se administra al mamífero en condiciones de ayuno e hiperglucemia. Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente diferente" significa que las dos curvas son estadísticamente diferentes como se determina con un test de la t de Student ($p < 0,05$). Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones de ayuno" significa que la curva de concentración en suero se obtuvo combinando datos de cinco o

más individuos no diabéticos en ayunas. En determinadas realizaciones, se seleccionó aleatoriamente un individuo humano no diabético en ayunas de 18-30 años de edad que no presenta síntomas diabéticos en el momento en que se extrae la sangre y que no ha comido en 12 horas del tiempo en el que se extrae la sangre. Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones hiperglucémicas" significa que la curva de concentración sérica se obtuvo combinando datos de cinco o más individuos no diabéticos en ayunas en los que se indujeron condiciones hiperglucémicas ($C_{máx}$ de glucosa de al menos 100 mg/dl por encima de la concentración media de glucosa observada en condiciones de ayuno) mediante la administración concurrente del conjugado y glucosa. La administración concurrente de conjugado y glucosa requiere simplemente que la $C_{máx}$ de la glucosa se produzca durante el periodo en que el conjugado está presente a un nivel detectable en el suero. Por ejemplo, se podría cronometrar una inyección (o ingestión) de glucosa para que se produzca un poco antes, al mismo tiempo o poco después de que se administre el conjugado. En determinadas realizaciones, el conjugado y la glucosa se administran por diferentes rutas o en diferentes localizaciones. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el conjugado se administra por vía subcutánea mientras que la glucosa se administra por vía oral o intravenosa.

En determinadas realizaciones, la $C_{máx}$ del suero del conjugado es mayor en condiciones hiperglucémicas en comparación con las condiciones de ayuno. De manera adicional o alternativa, en determinadas realizaciones, el área del suero bajo la curva (ABC) del conjugado es mayor en condiciones hiperglucémicas en comparación con las condiciones en ayunas. En diversas realizaciones, la tasa de eliminación en suero del conjugado es más lenta en condiciones hiperglucémicas en comparación con las condiciones en ayunas. Como se analiza en los ejemplos, los inventores han descubierto que, en determinadas realizaciones, la curva de concentración sérica de los conjugados puede ajustarse usando un modelo biexponencial de dos compartimentos con una semivida corta y una larga. La semivida larga parece ser particularmente sensible a la concentración de glucosa. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la semivida larga es más larga en condiciones hiperglucémicas en comparación con las condiciones en ayunas. En determinadas realizaciones, las condiciones en ayunas implican una $C_{máx}$ de glucosa menor de 100 mg/dl (por ejemplo, 80 mg/dl, 70 mg/dl, 60 mg/dl, 50 mg/dl, etc.). En determinadas realizaciones, las condiciones hiperglucémicas implican una $C_{máx}$ de glucosa en exceso de 200 mg/dl (por ejemplo, 300 mg/dl, 400 mg/dl, 500 mg/dl, 600 mg/dl, etc.). Se apreciará que otros parámetros PK tales como el tiempo de residencia en suero medio (MRT), el tiempo de absorción en suero medio (MAT), etc., se podrían usar en vez de o junto con cualquiera de los parámetros anteriormente mencionados.

El intervalo normal de las concentraciones de glucosa en seres humanos, perros, gatos, y ratas es de 60 a 200 mg/dl. Un experto en la materia será capaz de extrapolar los siguientes valores para especies con intervalos normales diferentes (por ejemplo, el intervalo normal de concentraciones de glucosa en cerdos en miniatura es de 40 a 150 mg/dl). Las concentraciones de glucosa 60 mg/dl se consideran hipoglucémicas. Las concentraciones de glucosa 200 mg/dl se consideran hiperglucémicas. En determinadas realizaciones, las propiedades PK del conjugado pueden ensayarse usando el método de la pinza de glucosa (véanse los ejemplos) y la curva de concentración en suero del conjugado puede ser sustancialmente diferente cuando se administra a concentraciones de glucosa de 50 y 200 mg/dl, 50 y 300 mg/dl, 50 y 400 mg/dl, 50 y 500 mg/dl, 50 y 600 mg/dl, 100 y 200 mg/dl, 100 y 300 mg/dl, 100 y 400 mg/dl, 100 y 500 mg/dl, 100 y 600 mg/dl, 200 y 300 mg/dl, 200 y 400 mg/dl, 200 y 500 mg/dl, 200 y 600 mg/dl, etc. De manera adicional o alternativa, la $T_{máx}$ en suero, la $C_{máx}$ en suero, el tiempo de residencia medio en suero (MRT), el tiempo de absorción media en suero (MAT) y/o la semivida en suero pueden ser sustancialmente diferentes en las dos concentraciones de glucosa. Como se describe a continuación, en determinadas realizaciones, se pueden usar 100 mg/dl y 300 mg/dl como concentraciones de glucosa comparativas. Debe entenderse sin embargo que la presente divulgación abarca cada una de estas realizaciones con un par alternativo de concentraciones comparativas de glucosa incluyendo, aunque no de forma limitativa, una cualquiera o más de los siguientes pares: 50 y 200 mg/dl, 50 y 300 mg/dl, 50 y 400 mg/dl, 50 y 500 mg/dl, 50 y 600 mg/dl, 100 y 200 mg/dl, 100 y 400 mg/dl, 100 y 500 mg/dl, 100 y 600 mg/dl, 200 y 300 mg/dl, 200 y 400 mg/dl, 200 y 500 mg/dl, 200 y 600 mg/dl, etc.

Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la $C_{máx}$ del conjugado es mayor cuando se administra al mamífero en la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg/dl de glucosa). En determinadas realizaciones, la $C_{máx}$ del conjugado es al menos de un 50 % (por ejemplo, al menos 100 %, al menos 200 % o al menos 400 %) mayor cuando se administra al mamífero a la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg/dl de glucosa).

En determinadas realizaciones, la ABC del conjugado es mayor cuando se administra al mamífero a la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg/dl de glucosa). En determinadas realizaciones, la ABC del conjugado es al menos del 50 % (por ejemplo, al menos por ejemplo, al menos un 100 %, al menos un 200 % o al menos un 400 %) mayor cuando se administra al mamífero a la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg/dl de glucosa).

En determinadas realizaciones, la tasa de eliminación en suero del conjugado es más lenta cuando se administra al mamífero a la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg/dl de glucosa). En determinadas realizaciones, la tasa de eliminación en suero del conjugado es al menos del 25 % (por ejemplo, al menos un 50 %, al menos un 100 %, al menos un 200 %, o al menos un 400 %) más rápida cuando se administra al mamífero a la menor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 100 frente a. 300 mg/dl de glucosa).

Como se analiza en los ejemplos, los inventores han descubierto que, en determinadas realizaciones, la curva de concentración sérica de los conjugados puede ajustarse usando un modelo biexponencial de dos compartimentos con una semivida corta y una larga. La semivida larga parece ser particularmente sensible a la concentración de glucosa. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la semivida es más larga cuando se administra al mamífero a la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg/dl de glucosa). En determinadas realizaciones, la semivida larga es al menos del 50 % (por ejemplo, al menos 100 %, al menos 200 % o al menos 400 %) más larga cuando se administra al mamífero a la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente 100 mg/dl de glucosa).

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método en el que se obtiene la curva de concentración en suero del conjugado a las dos concentraciones diferentes de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg/dl de glucosa); las dos curvas se ajustaron usando un modelo biexponencial de dos compartimentos con una semivida corta y una larga; y se comparan las semividas largas obtenidas en las dos concentraciones de glucosa. En determinadas realizaciones, este método se puede como un ensayo para ensayar o comparar la sensibilidad a la glucosa de uno o más conjugados.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método en el que se obtienen las curvas de concentración en suero de un fármaco conjugado (por ejemplo, un conjugado de insulina de la presente divulgación) y una versión sin conjugar del fármaco (por ejemplo, IHR) en las mismas condiciones (por ejemplo, condiciones en ayunas); las dos curvas se ajustaron usando un modelo biexponencial de dos compartimentos con una semivida corta y una larga; y se comparan las semividas largas obtenidas para el fármaco conjugado y el fármaco sin conjugar. En determinadas realizaciones, este método se puede usar como un ensayo para identificar conjugados que se aclaran más rápidamente que el fármaco sin conjugar.

En determinadas realizaciones, la curva de concentración en suero de un conjugado es sustancialmente la misma que la curva de concentración en suero de una versión sin conjugar del fármaco cuando se administra al mamífero en condiciones hiperglucémicas. Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente la misma" significa que no existe diferencia significativa entre las dos curvas como se determinó por un test de la t de Student ($p > 0,05$). En determinadas realizaciones, la curva de concentración en suero del conjugado es sustancialmente diferente de la curva de concentración en suero de una versión sin conjugar del fármaco cuando se administra en condiciones en ayunas. En determinadas realizaciones, la curva de concentración en suero del conjugado es sustancialmente la misma que la curva de concentración en suero de una versión sin conjugar del fármaco cuando se administra en condiciones hiperglucémicas y sustancialmente diferente cuando se administra en condiciones en ayunas. En determinadas realizaciones, las condiciones hiperglucémicas implican una $C_{máx}$ de glucosa en exceso de 200 mg/dl (por ejemplo, 300 mg/dl, 400 mg/dl, 500 mg/dl, 600 mg/dl, etc.). En determinadas realizaciones, las condiciones en ayunas implican una $C_{máx}$ de glucosa menor de 100 mg/dl (por ejemplo, 80 mg/dl, 70 mg/dl, 60 mg/dl, 50 mg/dl, etc.). Se apreciará que podrían compararse cualquiera de los parámetros PK anteriormente mencionados tal como la $T_{máx}$ en suero, la $C_{máx}$ en suero, el ABC, el tiempo de residencia medio en suero (MRT), el tiempo de absorción media en suero (MAT) y/o la semivida en suero.

Desde una perspectiva farmacodinámica (PD), la bioactividad del conjugado puede aumentar cuando aumenta la concentración de glucosa o cuando la concentración de glucosa cruza un umbral, por ejemplo, es mayor que los niveles de glucosa normales. En determinadas realizaciones, la bioactividad de un conjugado es menor cuando se administra en condiciones en ayunas en comparación con condiciones hiperglucémicas. En determinadas realizaciones, las condiciones en ayunas implican una $C_{máx}$ de glucosa menor de 100 mg/dl (por ejemplo, 80 mg/dl, 70 mg/dl, 60 mg/dl, 50 mg/dl, etc.). En determinadas realizaciones, las condiciones hiperglucémicas implican una $C_{máx}$ de glucosa en exceso de 200 mg/dl (por ejemplo, 300 mg/dl, 400 mg/dl, 500 mg/dl, 600 mg/dl, etc.).

En determinadas realizaciones, las propiedades PD del conjugado pueden ensayarse midiendo la velocidad de infusión de la glucosa (GIR) requerida para mantener una concentración de glucosa en estado estacionario. De acuerdo con dichas realizaciones, la bioactividad del conjugado puede ser sustancialmente diferente cuando se administra a concentraciones de glucosa de 50 y 200 mg/dl, 50 y 300 mg/dl, 50 y 400 mg/dl, 50 y 500 mg/dl, 50 y 600 mg/dl, 100 y 200 mg/dl, 100 y 300 mg/dl, 100 y 400 mg/dl, 100 y 500 mg/dl, 100 y 600 mg/dl, 200 y 300 mg/dl, 200 y 400 mg/dl, 200 y 500 mg/dl, 200 y 600 mg/dl, etc. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la bioactividad del conjugado es mayor cuando se administra al mamífero a la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg/dl de glucosa). En determinadas realizaciones, la bioactividad del conjugado es al menos del 25 % (por ejemplo, al menos del 50 % o al menos del 100 %) mayor cuando se administra al mamífero a la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg/dl de glucosa).

En determinadas realizaciones, el conjugado incluye una molécula de insulina como el fármaco. De acuerdo con dichas realizaciones, se puede observar el comportamiento PD de la insulina comparando el tiempo para alcanzar una concentración de glucosa en sangre mínima (T_{nadir}), la duración sobre la cual el nivel de glucosa en sangre sigue permaneciendo por debajo de un determinado porcentaje del valor inicial (por ejemplo, 70 % del valor inicial o la $T_{70\ \%\ BGL}$), etc.

En general, se apreciará que cualquiera de las características PK y PD descritas en esta sección puede determinarse de acuerdo con cualquiera de varios métodos farmacocinéticos y farmacodinámicos publicados (por ejemplo, véase Baudys et al., Bioconjugate Chem. 9:176-183, 1998 para los métodos adecuados para la administración subcutánea). Debe entenderse también que las propiedades PK y/o PD pueden medirse en cualquier mamífero (por ejemplo, un ser humano, una rata, un gato, un minicerdo, un perro, etc.). En determinadas realizaciones, las propiedades PK y/o PD se midieron en un ser humano. En determinadas realizaciones, las propiedades PK y/o PD se midieron en una rata. En determinadas realizaciones, las propiedades PK y PD se midieron en un minicerdo. En determinadas realizaciones, las propiedades PK y/o PD se midieron en un perro.

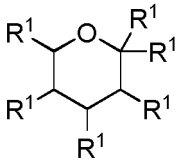
Se apreciará también que aunque lo anterior se describió en el contexto de conjugados sensibles a glucosa, las mismas propiedades y ensayos se aplican a conjugados que son sensibles a otros sacáridos que incluyen sacáridos exógenos, por ejemplo, manosa, L-fucosa, N-acetil glucosamina, alfa-metil manosa, etc. Como se describe con más detalle a continuación y en los ejemplos, en vez de comparar las propiedades PK y/o PD en condiciones en ayunas e hiperglucémicas, las propiedades PK y/o PD pueden compararse en condiciones en ayunas con y sin la administración del sacárido exógeno. Debe entenderse que pueden diseñarse conjugados que respondan a diferentes valores de $C_{máx}$ de un sacárido exógeno dado.

Ligando(s)

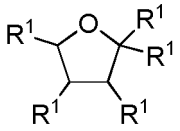
En general, los conjugados incluyen al menos dos ligandos de sacáridos. En determinadas realizaciones, los conjugados incluyen al menos dos ligandos de sacárido independientes, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más ligandos de sacáridos. Cuando están presentes más de dos ligandos, los ligandos pueden tener la misma estructura química o estructuras químicas diferentes.

En determinadas realizaciones, los ligandos pueden competir con un sacárido (por ejemplo, glucosa o manosa) por la unión a una molécula de unión de un sacárido endógeno (por ejemplo, sin limitación, proteínas A y D tensioactivas o miembros de la familia de las selectinas). En determinadas realizaciones, los ligandos pueden competir con un sacárido (por ejemplo, glucosa o manosa) por la unión a un receptor de azúcar en la superficie de la célula (por ejemplo, de forma no limitativa, receptor de manosa en la superficie de macrófagos, ligandos del transportador de la glucosa, receptores de azúcares de las células endoteliales, o receptores de azúcares de hepatocitos). En determinadas realizaciones, los ligandos pueden competir con la glucosa por la unión a una molécula endógena de unión a glucosa (por ejemplo, sin limitación, las proteínas tensioactivas Ay D o los miembros de la familia de las selectinas). En determinadas realizaciones, los ligandos pueden competir con un sacárido por la unión a una lectina no humana (por ejemplo, Con A). En determinadas realizaciones, los ligandos pueden competir con glucosa o manosa por la unión a una lectina no humana (por ejemplo, Con A. Las lectinas de unión a glucosa ilustrativas incluyen calnexina, calreticulina, el receptor de la N-acetilglucosamina, selectina, el receptor de la asialoglicoproteína, colectina (lectina de unión a manosa), receptor de manosa, agrecano, versican, aglutinina de pisum sativum (PSA), lectina de vicia faba, lectina de lens culinaris, lectina de soja, lectina de cacahuete, lectina de lathyrus ochrus, lectina de esparceta, lectina de sophora japonica, lectina de bowringia milbraedii, concanavalina A (Con A), y mitógeno de fitolaca.

En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando es de fórmula (IIIa) o (IIIb):



IIIa



IIIb

en la que:

cada R^1 es independientemente hidrógeno, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$, -O-Y, -G-Z o $-CH_2R^x$;
cada R^x es independientemente hidrógeno, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$ u -O-Y;
cada R^y es independientemente $-R^2$, $-SO_2R^2$, $-S(O)R^2$, $-P(O)(OR^2)_2$, $-C(O)R^2$, $-CO_2R^2$ o $-C(O)N(R^2)_2$;
cada Y es independientemente un monosacárido, disacárido o trisacárido;
cada G es independientemente un enlace covalente o un alquileno C_{1-9} opcionalmente sustituido, en el que una o más unidades de metileno de G están opcionalmente reemplazadas por -O-, -S-, $-N(R^2)$-, -C(O)-, -OC(O)-, -C(O)O-, $-C(O)N(R^2)$-, $-N(R^2)C(O)$-, $-N(R^2)C(O)N(R^2)$-, $-SO_2$-, $-SO_2N(R^2)$-, $-N(R^2)SO_2$- o $-N(R^2)SO_2N(R^2)$-;
cada Z es independientemente halógeno, $-N(R^2)_2$, $-OR^2$, $-SR^2$, $-N_3$, $-C{\equiv}CR^2$, $-CO_2R^2$, $-C(O)R^2$ u $-OSO_2R^2$; y
cada R^2 es independientemente hidrógeno o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre alifático C_{1-6}, fenilo, un anillo heterocíclico de 4-7 miembros que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno o azufre, o un anillo heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno o azufre.

En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando de fórmula (IIIa) o (IIIb) es un monosacárido. En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando es un disacárido. En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando es un trisacárido. En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando es un tetrasacárido. En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando comprende no más de un total de cuatro restos monosacáridos.

Como se ha definido anteriormente de una manera general, cada R^1 es independientemente hidrógeno, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$, -O-Y, -G-Z o $-CH_2R^x$. En determinadas variaciones de la divulgación, R^1 es hidrógeno. En determinadas variaciones de la divulgación, R^1 es -OH. En determinadas variaciones de la divulgación, R^1 es $-NHC(O)CH_3$. En determinadas variaciones de la divulgación, R^1 es -O-Y. En determinadas variaciones de la divulgación, R^1 es -G-Z. En determinadas variaciones de la divulgación, R^1 es $-CH_2OH$. En determinadas variaciones de la divulgación, R^1 es $-CH_2$-O-Y. En determinadas variaciones de la divulgación, R^1 es $-NH_2$. Alguien con una habilidad habitual en la técnica apreciará que cada sustituyente R^1 en la fórmula (IIIa) o (IIIb) puede tener una estereoquímica *(R)* o (*S*).

Como se ha definido anteriormente de una manera general, cada R^x es independientemente hidrógeno, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$ u -O-Y. En determinadas variaciones de la divulgación, R^x es hidrógeno. En determinadas variaciones de la divulgación, R^x es -OH. En determinadas variaciones de la divulgación, R^x es -O-Y.

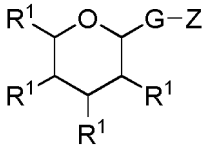
Como se ha definido anteriormente de una manera general, cada R^y es independientemente $-R^2$, $-SO_2R^2$, $-S(O)R^2$, $-P(O)(OR^2)_2$, $-C(O)R^2$, $-CO_2R^2$ o $-C(O)N(R^2)_2$. En determinadas variaciones de la divulgación, R^y es hidrógeno. En determinadas variaciones de la divulgación, R^y es $-R^2$. En determinadas variaciones de la divulgación, R^y es $-C(O)R^2$. En determinadas variaciones de la divulgación, R^y es acetilo. En determinadas variaciones de la divulgación, R^y es $-SO_2R^2$, $-S(O)R^2$, $-P(O)(OR^2)_2$, $-CO_2R^2$ o $-C(O)N(R^2)_2$.

Como se ha definido anteriormente de una manera general, Y es un monosacárido, disacárido o trisacárido. En determinadas variaciones de la divulgación, Y es un monosacárido. En determinadas variaciones de la divulgación, Y es un disacárido. En determinadas variaciones de la divulgación, Y es un trisacárido. En determinadas variaciones de la divulgación, Y es manosa, glucosa, fructosa, galactosa, ramnosa o xilopiranosa. En determinadas variaciones de la divulgación, Y es sacarosa, maltosa, turanosa, trehalosa, celobiosa o lactosa. En determinadas variaciones de la divulgación, Y es manosa. En determinadas variaciones de la divulgación, Y es D-manosa. Alguien con una habilidad habitual en la técnica apreciará que el sacárido Y se une al grupo oxígeno de -O-Y a través de un carbono anomérico para formar un enlace glicosídico. El enlace glicosídico puede ser de configuración alfa o beta.

Como se ha definido anteriormente de una manera general, cada G es independientemente un enlace covalente o un alquileno C_{1-9} opcionalmente sustituido, en el que una o más unidades de metileno de G está opcionalmente reemplazado por -O-, -S-, $-N(R^2)$-, -C(O)-, -OC(O)-, -C(O)O-, $-C(O)N(R^2)$-, $-N(R^2)C(O)$-, $-N(R^2)C(O)N(R^2)$-, $-SO_2$-, $-SO_2N(R^2)$-, $-N(R^2)SO_2$- o $-N(R^2)SO_2N(R^2)$-. En determinadas variaciones de la divulgación, G es un enlace covalente. En determinadas variaciones de la divulgación, G es -O-alquileno C_{1-8}. En determinadas variaciones de la divulgación, G es $-OCH_2CH_2$-.

Como se ha definido anteriormente de una manera general, cada Z es independientemente halógeno, $-N(R^2)_2$, $-OR^2$, $-SR^2$, $-N_3$, $-C\equiv CR^2$, $-CO_2R^2$, $-C(O)R^2$ u $-OSO_2R^2$. En determinadas variaciones de la divulgación, Z es un halógeno u $-OSO_2R^2$. En determinadas variaciones de la divulgación, Z es $-N_3$ o $-C\equiv CR^2$. En determinadas variaciones de la divulgación, Z es $-N(R^2)_2$, $-OR^2$ o $-SR^2$. En determinadas variaciones de la divulgación, Z es -SH. En determinadas variaciones de la divulgación, Z es $-NH_2$. En determinadas variaciones de la divulgación, -G-Z es $-OCH_2CH_2NH_2$.

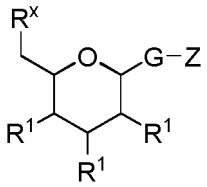
En determinadas variaciones de la divulgación, el sustituyente R^1 en el carbono C1 de la fórmula (IIIa) es -G-Z para dar un compuesto de fórmula (IIIa-*i*):



IIIa-*i*

en la que R^1, G y Z son como se definen y describen en el presente documento.

En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando es de fórmula (IIIa-*ii*):

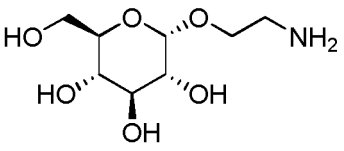


IIIa-*ii*

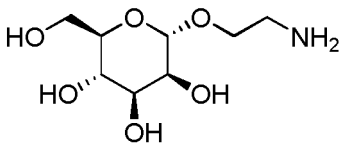
en la que R^1, R^x, G y Z son como se definen y describen en el presente documento.

En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando o ligandos pueden tener la misma estructura química que la glucosa o pueden ser especies químicamente relacionadas de glucosa. En determinadas variaciones de la divulgación puede ser ventajoso que los ligandos tengan una estructura química diferente de la glucosa, por ejemplo, para ajustar precisamente la respuesta de glucosa del conjugado. Por ejemplo, en determinadas variaciones de la divulgación, uno podría usar un ligando que incluye glucosa, manosa, L-fucosa o derivados de estos (por ejemplo, alfa-L-fucopiranósido, manosamina, N-acetil manosamina beta-enlazada, metilglucosa, metilmanosa, etilglucosa, etilmanosa, propilglucosa, propilmanosa, etc.) y/o combinaciones de orden superior de estos (por ejemplo, una bimanosa, trimanosa lineal y/o ramificada, etc.).

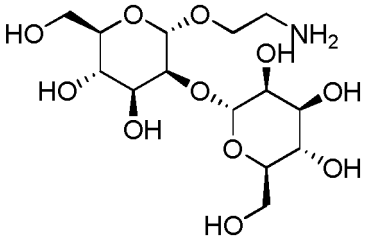
En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando incluye un monosacárido. En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando incluye un disacárido. En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando incluye un trisacárido. En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando comprende un sacárido y uno o más grupos amina. En determinadas variaciones de la divulgación, el sacárido y el grupo amina están separados por un grupo alquilo C_1-C_6, por ejemplo, un grupo alquilo C_1-C_3. En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando es aminoetilglucosa (AEG). En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando es aminoetilmanosa (AEM). En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando es aminoetilbimanosa (AEBM). En algunas realizaciones, los ligandos son aminoetiltrimanosa (AETM). En determinadas variaciones de la divulgación, el ligando es β-aminoetil-N-acetilglucosamina (AEGA). En algunas realizaciones, el ligando es aminoetilfucosa (AEF). En ciertas realizaciones, un ligando de sacárido tiene la configuración "D". En otras realizaciones, un ligando de sacárido tiene la configuración "L". Más adelante, lo inventores muestran las estructuras de ligandos a modo de ejemplo. Los expertos en la técnica reconocerán otros ligandos a modo de ejemplo.



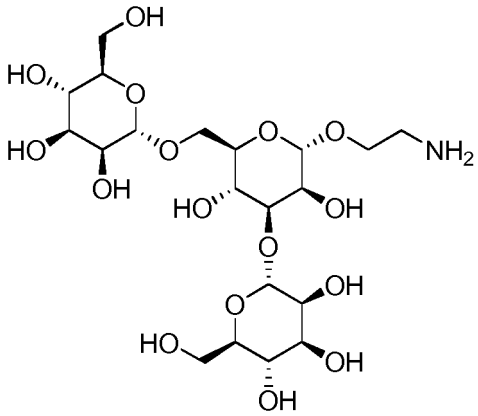
AEG



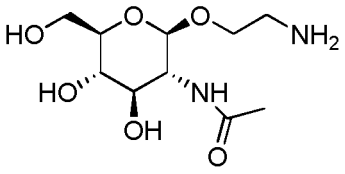
AEM



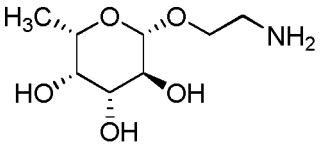
AEBM



AETM



AEGA



AEF

En general, los ligandos pueden conjugarse directa o indirectamente (es decir, a través de enlazador o armazón) al fármaco. Como se discute con mayor detalle más adelante, los ligandos pueden estar presentes de un modo natural dentro de un armazón de conjugado (por ejemplo, como parte de una estructura principal de un polímero o como un grupo lateral de un monómero). Como alternativa (o adicionalmente), los ligandos pueden incorporarse artificialmente en un armazón de conjugado (por ejemplo, en forma de un grupo químico que se añade sintéticamente a un armazón de conjugado). En ciertas realizaciones, un conjugado pueden incluir un armazón que comprende 5 o más, 10 o más, o 20 o más ligandos. En ciertas realizaciones, un conjugado puede comprender tan solo 2, 3, 4 o 5 ligandos separados.

En ciertas realizaciones, al menos dos ligandos separados se conjugan con el fármaco a través de puntos de conjugación diferentes. En ciertas realizaciones, al menos dos ligandos separados se conjugan con un solo armazón de conjugado que también se conjuga con el fármaco. En determinadas variaciones de la divulgación, al menos un ligando, tal como AETM, AEG, AEM, AEBM, AEGA o AEF, se conjuga con una molécula de insulina. En ciertas realizaciones, al menos dos ligandos de AETM se conjugan con una molécula de insulina. En algunas realizaciones, al menos dos ligandos, tales como AETM, se conjugan con una molécula de insulina, a través de un punto de conjugación o múltiples puntos de conjugación. En determinadas variaciones de la divulgación, los al menos dos ligandos no son el mismo ligando. En ciertas realizaciones, los al menos dos ligandos son el mismo ligando. En ciertas realizaciones, al menos dos ligandos de AETM se conjugan con una molécula de insulina, a través de un punto de conjugación o múltiples puntos de conjugación. Como se discute con mayor detalle más adelante en el contexto de ciertos armazones de conjugado a modo de ejemplo, en ciertas realizaciones los ligandos y el fármaco separados (por ejemplo, una molécula de insulina) pueden estar situados cada uno en una rama separada de un armazón de conjugado ramificado. Por ejemplo, los ligandos y el fármaco pueden estar situados en los extremos de estas ramas. En ciertas realizaciones, puede usarse un armazón de conjugado hiperramificado. Se abarcan armazones de conjugado poliméricos y no poliméricos.

Más adelante se discuten con mayor detalle métodos para conjugar ligandos a un armazón de conjugado. En ciertas realizaciones, el sacárido dentro de uno o más ligandos se conjuga (directa o indirectamente por medio de un enlazador) a través de la posición C1, C2 o C6. En ciertas realizaciones, la conjugación implica la posición C1. La posición C1 de un sacárido también se denomina el carbono anomérico y puede estar conectado al fármaco o armazón de conjugado en la conformación alfa o beta. En ciertas realizaciones, la posición C1 está configurada como el monómero alfa. En otras realizaciones, la posición C1 está configurada como el monómero beta.

Fármaco

Debe entenderse que un conjugado puede comprender cualquier fármaco, además de la insulina. Un conjugado puede comprender más de una copia del mismo fármaco y/o puede comprender más de un tipo de fármaco. Los conjugados no están limitados a ningún fármaco concreto y pueden incluir fármacos de moléculas pequeñas o fármacos biomoleculares. En general, el(los) fármaco(s) usado(s) dependerá(n) de la enfermedad o trastorno que se va a tratar. Como se usa en el presente documento, el término "fármaco" abarca las formas salinas o no salinas del fármaco. Por ejemplo, la expresión "molécula de insulina" abarca todas las formas salinas y no salinas de la molécula de insulina. se apreciará que la forma salina puede ser aniónica o catiónica dependiendo del fármaco.

Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, en diversas realizaciones, un conjugado puede comprender uno cualquiera de los siguientes fármacos, además de la insulina: diclofenaco, nifedipina, rivastigmina, metilfenidato, fluoroxetina, rosiglitazona, prednisona, prednisolona, codeína, etilmorfina, dextrometorfano, noscapina, pentoxiverina, acetilcisteína, bromhexina, epinefrina, isoprenalina, orciprenalina, efedrina, fenoterol, rimiterol, ipratropio, teofilinato de colina, proxiflina, beclometasona, budesonida, deslanosida, digoxina, digitoxina, disopiramida, proscilaridina, quinidina, procainamida, mexiletina, flecainida, alprenolol, proproanolol, nadolol, pindolol, oxprenolol, labetalol, tirnolol, atenolol, tetranitrato de pentaeritritilo, nitrato de isosorbid, mononitrato de isosorbid, nifedipina, fenilamina, verapamilo, diltiazem, ciclandelar, alcohol nicotinílico, nicotinato de inositol, alprostatdil, etileprina, prenalterol, dobutamina, dopamina, dihidroergotamina, guanetidina, betanidina, metildopa, reserpina, guanfacina, trimetafan, hidralazina, dihidralazina, prazosina, diazóxido, captoprilo, nifedipina, enalaprilo, nitroprusiato, bendroflumetiazida, hidroclortiazida, metilclotiazida, politiazida, clortalidon, cinetazon, clopamida, mefrusida, metolazona, bumetanida, etacrinacida, espironolactona, amilorida, clofibrato, ácido nicotínico, niqueritrol, bromfeniramina, cinarizina, dexclorfeniramina, clemastina, antazolina, ciproheptadina, proetazina, cimetidina, ranitidina, sucralfat, papaverina, moxaverina, atropina, butilescopolamina, emepron, glucopiron, hiosciamina, mepensolar, metilescopolamina, oxifenciclimina, probantelina, terodilina, senaglucósidos, extracto de sagrada,

dantron, bisacodilo, picosulfato de sodio, etulos, difenolxilato, loperamida, salazosulfapiridina, pirvino, mebendazol, dimeticona, ferrofumarato, ferrosuccinato, ferritetrasemisodio, cianocobalamina, ácido heparina fólico, cofactor de heparina, dicumarol, warfarina, estreptoquinasa, uroquinasa, factor VIII, factor IX, vitamina K, tiotepa, busulfano, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalan, carmustina, mercaptopurina, tioguanina, azatioprina, citarabina, vinblastina, vincristina, vindesina, procarbazina, dacarbazina, lomustina, estramustina, tenipósido, etopósido, cisplatino, amsacrina, aminoglutetimid, fosfestrol, medroxiprogresterona, hidroxiprogesterona, megesterol, noretisterona, tamoxifeno, ciclosporina, sulfosomidina, bensilpenicilina, fenoximetilpenicilina, dicloxacilina, cloxacilina, flucoxacilina, ampicilina, amoxicilina, pivampicilina, bacampicilina, piperacilina, meziocilina, mecilinam, pivmecilinam, cefalotina, cefalexina, cefradina, cefadroxilo, cefaclor, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina, aztreonam, imipenem, cilastatina, tetraciclina, limeciclina, desmeclociclina, metaciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, cloranfenicol, espiramicina, ácido fusídico, lincomicina, clindamicina, espectinomicina, rifampicina, anfotericina B, griseofulvina, nistatina, vancomicina, metronidazol, tinidazol, trimetoprim, norfloxacino, salazosulfapiridina, aminosalilo, isoniazid, etambutol, nitrofurantoína, ácido nalidíxico, metanamina, cloroquina, hidroxicloroquina, tinidazol, quetoconazol, aciclovir, interferón idoxuridina, retinal, tiamina, dexpantenol, piridoxina, ácido fólico, ácido ascórbico, tocoferol, fitominadion, fenfluramina, corticotropina, tetracosáctida, tirotropina, somatotropina, somatrem, vasopresina, lipresina, desmopresina, oxitocina, cloriongonadotropina, cortisona, hidrocortisona, fluodrocortisona, prednisona, prednisolona, fluoximesterona, mesterolona, nandrolona, estanozolol, oximetolon, ciproteron, levotiroxina, liotironina, propiltiouracilo, carbimazol, tiamazol, dihidrotaquisterol, alfacalcidol, calcitirol, tolbutamid, clorpropamid, tolazamid, glipizida, glibenclamida, fenobarbital, metiprilón, piritidión, meprobamat, clordiazepóxido, diazepam, nitrazepam, baclofeno, oxazepam, dikalium clorazepat, lorazepam, flunitrazepam, alprazolam, midazolam, hidroxizina, dantroleno, clometiazol, propionmazina, alimemazina, clorpromazina, levomepromazina, acetofenazina, flufenazina, perfenazina, proclorperazina, trifluoperazina, dixirazina, tiodirazina, periciazina, cloprotixeno, tizanidina, zaleplón, zuclopentizol, flupentizol, titixen, haloperidol, trimipramina, opipramol, clomipramina, desipramina, lofepramina, amitriptilina, nortriptilina, protriptilina, maptrotilina, cafeína, cinarizina, ciclizina, dimenhidinato, meclozina, prometazina, tietilperazina, metoclopramida, escopolamina, fenobarbital, fenitoína, etosuximida, primidona, carbamazepina, clonazepam, orfenadrina, atropina, bensatropina, biperideno, metixeno, procilidina, levodopa, bromocriptina, amantadina, ambenon, piridostigmina, sinstigmina, disulfiram, morfina, codeína, pentazocina, buprenorfina, petidina, fenoperidina, fentanilo, metadona, piritramida, dextropropoxifeno, ketobemidona, ácido acetil salicílico, celecoxib, fenazona, fenilbutazona, azapropazona, piroxicam, ergotamina, dihidroergotamina, ciproheptadina, pizitifeno, flumedroxon, alopurinol, probenecid, sodiomaurotiomalato auronofina, penicilamina, estradiol, valerianato de estradiol, estriol, etinil estradiol, dihidrogesterona, flumedroxon, medroxiprogresterona, noretisterona, ciclofenilo, clomifeno, levonorgestrel, mestranol, ornidazol, tinidazol, econazol, clotrimazol, natamicina, miconazol, sulbentina, metilergotamina, dinoprost, dinoproston, gemeprost, bromocriptina, fenilpropanolamina, cromoglicato de sodio, azetasolamida, diclofenamida, betacaroteno, naloxona, folinato de calcio, en particular clonidina, tefillina, dipiradamol, hidroclotiazida, escopolamina, indometacina, furosemida, cloruro de potasio, morfina, ibuprofeno, salbutamol, terbutalina, calcitonina, etc. Debe entenderse que este listado se pretende que sea ilustrativo y que cualquier fármaco, tanto conocido como descubierto posteriormente, puede usarse en un conjugado de la presente divulgación.

En diversas realizaciones, un conjugado pude incluir u fármaco hormonal adicional que puede ser peptídico o no peptídico, por ejemplo, adrenalina, noradrenalina, angiotensina, atriopeptina, aldosterona, deshidroepiandrosterona, androstenodiona, testosterona, dihidrotestosterona, calcitonina, calcitriol, calcidiol, corticotropina, cortisol, dopamina, estradiol, estrona, estriol, eritropoyetina, hormona estimulante de folículos, gastrina, grelina, glucagón, hormona liberadora de gonadotropina, hormona del crecimiento, hormona liberadora de hormona de crecimiento, gonadotropina coriónica humana, histamina, lactógeno placentario humano, factor de crecimiento de tipo insulina, inhibina, leptina, un leucotrieno, lipotropina, melatonina, orexina, oxitocina, hormona paratiroidea, progesterona, prolactina, hormona liberadora de prolactona, una prostaglandina, renina, serotonina, secretina, somatostatina, trombopoyetina, hormona estimuladora del tiroides, hormona liberadora de tirotropina (o tirotropina), hormona liberadora de tirotropina, tiroxina, triyodotironina, vasopresina, etc. En determinadas realizaciones, la hormona se puede seleccionar entre glucagón, insulina, factor de crecimiento de tipo insulina, leptina, hormona estimuladora del tiroides, hormona liberadora de tirotropina (o tirotropina), hormona liberadora de tirotropina, tiroxina, y triyodotironina. En determinadas realizaciones, el fármaco es el factor 1 de crecimiento de tipo insulina (IGF-1). debe entenderse que este listado se pretende que sea ilustrativo y que cualquier fármaco hormonal, tanto conocido como descubierto posteriormente, puede usarse en un conjugado de la presente divulgación.

En diversas realizaciones, un conjugado puede incluir una hormona tiroidea.

En diversas realizaciones, un conjugado puede incluir un fármaco antidiabético (es decir, un fármaco que tiene un efecto beneficioso sobre los pacientes que padecen diabetes).

En diversas realizaciones, un conjugado incluye una molécula de insulina. Como se usa en el presente documento, la expresión "insulina" o "molécula de insulina" abarca todas las formas salinas y no salinas de la molécula de insulina. Se apreciará que la forma salina puede ser aniónica o catiónica dependiendo de la molécula de insulina. Por "insulina" o "una molécula de insulina" los inventores entienden que abarca las formas naturales y modificadas de la insulina siempre que sean bioactivas (es decir, capaces de producir una reducción detectable en la glucosa cuando se administra *in vivo*). La insulina natural incluye insulina de cualquier especie, tanto en forma purificada,

sintética o recombinante (por ejemplo, Insulina humana, insulina de porcino, insulina de bovino, insulina de conejo, insulina de oveja, etc.). Numerosas de estas están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se conocen en la técnica varias formas modificadas de insulina (por ejemplo, véanse Crotty y Reynolds, Pediatr. Emerg. Care. 23:903-905, 2007 y Gerich, Am. J. Med. 113:308-16, 2002 y las referencias citadas en la misma). Las formas modificadas de insulina pueden modificarse químicamente (por ejemplo, mediante la adición de un resto químico tal como un grupo PEG o una cadena de acilo graso como se describe a continuación) y/o mutada (es decir, mediante adición, deleción o sustitución de uno o más aminoácidos).

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación diferirá de una insulina natural en 1-10 (por ejemplo, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-9, 6-8, 6-7, 7-9, 7-8, 8-9, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1) sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación diferirá de una insulina natural solo en las sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación diferirá de una insulina natural solo en las adiciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación diferirá de una insulina natural en las sustituciones y adiciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación diferirá de una insulina natural en las sustituciones y deleciones de aminoácidos.

En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse sobre la base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilicidad y/o en la naturaleza anfipática de los restos implicados. En determinadas realizaciones, una sustitución puede ser conservativa, es decir, se sustituye un aminoácido con uno de una forma y carga similar. Las sustituciones conservativas son bien conocidas en la técnica e incluyen normalmente sustituciones en los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y tirosina, fenilalanina. En determinadas realizaciones, el índice hidrofóbico de los aminoácidos puede considerarse en la selección de las mutaciones adecuadas. Se entiende generalmente en la técnica la importancia del índice hidrofóbico de los aminoácidos en conferir función biológica interactiva sobre un polipéptido. Como alternativa, se puede realizar eficazmente la sustitución de aminoácidos similares sobre la base de la hidrofilicidad. Se entiende generalmente en la técnica la importancia de la hidrofilicidad en conferir la función biológica interactiva de un polipéptido. El uso del índice hidrofóbico de hidrofilicidad es el diseño de polipéptidos se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 5.691.198.

Se muestra a continuación la secuencia natural de la insulina humana (cadena A y cadena B) y en la Figura 63.

Cadena A (SEQ ID NO:1): GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
Cadena B (SEQ ID NO: 2): FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT

La insulina humana difiere de la insulina de conejo porcino, bovino, y ovino solo en los aminoácidos A8, A9, A10, y B30 (véase la tabla a continuación).

Insulina	**Posición de aminoácido**			
	A8	**A9**	**A10**	**B30**
Ser humano	Thr	Ser	Ile	Thr
conejo	Thr	Ser	Ile	Ser
porcino	Thr	Ser	Ile	Ala
bovino	Ala	Ser	Val	Ala
oveja	Ala	Gly	Val	Ala

En diversas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación está mutada en las posiciones B28 y/o B29 de la secuencia del péptido B. Por ejemplo, la insulina lispro (HUMALOG®) es una insulina mutante de acción rápida en la que los penúltimos restos de lisina y prolina en el extremo terminal C del péptido B se han invertido ($Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana). Esta modificación bloquea la formación de multímeros de insulina. La insulina asparta (NOVOLOG®) es otra insulina mutante de acción rápida en la que la prolina en la posición B28 se ha sustituido con ácido aspártico (Asp^{B28}-insulina humana). Este mutante evita también la formación de multímeros. En algunas realizaciones, la mutación en las posiciones B28 y/o B29 está acompañada por una o más mutaciones en otra parte del polipéptido de insulina. Por ejemplo, la insulina glulisina (APIDRA®) es otra insulina mutante más de acción rápida en la que el ácido aspártico en la posición B3 se ha sustituido por un resto de lisina y la lisina en la posición B29 se ha sustituido con un resto de ácido de ácido glutámico ($Lys^{B3}Glu^{B29}$-insulina humana).

En diversas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación tiene un punto isoeléctrico que está desplazados con respecto a la insulina humana. En algunas realizaciones, el desplazamiento en el punto isoeléctrico se consigue añadiendo uno o más restos de arginina en el extremo N del péptido-A de la insulina y/o el extremo C

del péptido-B de la insulina. Los ejemplos de dichos polipéptidos de insulina incluyen la insulina humana-Arg^{A0}, $Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, y $Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana. A modo de ejemplo adicional, la insulina glargina (LANTUS®) es una insulina mutante ilustrativa de acción prolongada en la que Asp^{A21} se ha sustituido por glicina y se han añadido dos restos de arginina al extremo C del péptido B. El efecto de estos cambios es desplazar el punto isoeléctrico, produciendo una solución que es completamente soluble a pH 4. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende una secuencia del péptido A en la que A21 es Gly y la secuencia del péptido B en la que B31 y B32 son Arg-Arg. Debe entenderse que la presente divulgación abarca todas las combinaciones individuales y múltiples combinaciones de estas mutaciones y cualesquiera otras mutaciones que se describen en el presente documento (por ejemplo Gly^{A21}-insulina humana, $Gly^{A21}Arg^{B31}$-insulina humana, $Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, Arg^{B31}-insulina humana).

En diversas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación está truncada. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, una secuencia del péptido-B de un polipéptido de insulina de la presente divulgación carece de B1, B2, B3, B26, B27, B28, B29 y/o B30. En determinadas realizaciones, las combinaciones de restos carecen de la secuencia del péptido-B de un polipéptido de insulina de la presente divulgación. Por ejemplo, la secuencia del péptido-B puede carecer de los restos B(1-2), B(1-3), B(29-30), B(28-30), B(27-30) y/o B(26-30). En algunas realizaciones, estas deleciones y/o truncamientos se aplican a cualquiera de las moléculas de insulina anteriormente mencionadas (por ejemplo, sin limitación para producir des(B30)-insulina lispro, des(B30)-insulina asparta, des(B30)-insulina glulisina, des(B30)-insulina glargina, etc.).

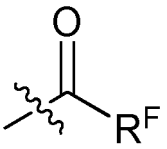
En algunas realizaciones, una molécula de insulina contiene restos de aminoácidos adicionales en el extremo N o C de las secuencias del péptido A o B. En algunas realizaciones, uno o más restos de aminoácidos están localizados en las posiciones A0, A21, B0 y/o B31. En algunas realizaciones, uno o más restos de aminoácidos están localizados en la posición A0. En algunas realizaciones, uno o más restos de aminoácidos están localizados en la posición A21. En algunas realizaciones, uno o más restos de aminoácidos están localizados en la posición B0. En algunas realizaciones, uno o más restos de aminoácidos están localizados en la posición B31. En determinadas realizaciones, una molécula de insulina no incluye ningunos restos de aminoácidos adicionales en las posiciones A0, A21, B0 o B31.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación está mutada de tal manera que uno o más aminoácidos amidados están sustituidos con formas ácidas. Por ejemplo, la asparagina puede estar sustituida con ácido aspártico o ácido glutámico. De manera análoga, la glutamina puede estar sustituida con ácido aspártico o ácido glutámico. En particular, Asn^{A18}, Asn^{A21}, o Asn^{B3}, o cualquier combinación de aquellos restos, puede estar sustituida por ácido aspártico o ácido glutámico. Gln^{A15} o Gln^{B4}, o ambos, puede estar sustituida por ácido aspártico o ácido glutámico. En determinadas realizaciones, una molécula de insulina tiene ácido aspártico en la posición A21 o ácido aspártico en la posición B3 o ambos.

Un experto en la materia reconocerá que es posible mutar otros aminoácidos más en la molécula de insulina a la vez que retener la actividad biológica. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, las siguientes modificaciones están también ampliamente aceptadas en la técnica: la sustitución del resto histidina en la posición B10 con ácido aspártico (His^{B10}→Asp^{B10}); la sustitución del resto fenilalanina en la posición B1 con ácido aspártico (Phe^{B1}→Asp^{B1}); la sustitución del resto histidina en la posición B30 con alanina (Thr^{B30}→Ala^{B30}); la sustitución del resto histidina en la posición B26 con alanina (Tyr^{B26}→Ala^{B26}); y la sustitución del resto serina en la posición B9 con ácido aspártico (Ser^{B9}→Asp^{B9}).

En diversas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación tiene un perfil de acción prolongado. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación puede estar acilada con un ácido graso. Es decir, un enlace amida está formado entre un grupo amino en la molécula de insulina y el grupo de ácido carboxílico del ácido graso. El grupo amino puede ser el grupo alfa-amino de un aminoácido N-terminal de la molécula de insulina, o puede ser el grupo epsilon-amino de un resto de lisina de la molécula de insulina. Una molécula de insulina de la presente divulgación puede estar acilada en uno o más de los tres grupos amino que están presentes en la insulina humana natural o puede estar acilada en el resto de lisina que se ha introducido en la secuencia de insulina humana natural. En determinadas realizaciones, una molécula de insulina puede estar acilada en la posición B1. En determinadas realizaciones, una molécula de insulina puede estar acilada en la posición B29. En determinadas realizaciones, el ácido graso se selecciona de ácido mirístico (C14), ácido pentadecílico (C15), ácido palmítico (C16), ácido heptadecílico (C17) y ácido esteárico (C18). Por ejemplo, la insulina detemir (LEVEMIR®) es una insulina mutante de acción prolongada en la que se ha eliminado Thr^{B30}, y se ha unido una cadena de ácido graso C14 (ácido mirístico) a Lys^{B29}.

En algunas realizaciones, el extremo N del péptido A, el extremo N del péptido B, el grupo épsilon-amino de la Lys en la posición B29 de cualquier otro grupo amino disponible en una molécula de insulina de la presente divulgación está unido covalentemente a un resto de ácido graso de la fórmula general:



en las que R^F es hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-30}. En algunas realizaciones, R^F es un grupo alquilo C_{1-20}, un grupo alquilo C_{3-19}, un grupo alquilo C_{5-18}, un grupo alquilo C_{6-17}, un grupo alquilo C_{8-16}, un grupo alquilo C_{10-15} o grupo alquilo C_{12-14}. En determinadas realizaciones, el polipéptido de insulina se conjuga al resto en la posición A1. En determinadas realizaciones, el polipéptido de insulina se conjuga al resto en la posición B1. En determinadas realizaciones, el polipéptido de insulina se conjuga al resto en el grupo épsilon-amino de la Lys en la posición B29. En determinadas realizaciones, la posición B28 de la molécula de insulina es Lys y el grupo épsilon-amino de la Lys^{B28} se conjuga al resto de ácido graso. En determinadas realizaciones, la posición B3 de la molécula de insulina es Lys y el grupo épsilon-amino de la Lys^{B3} se conjuga al resto de ácido graso. En algunas realizaciones, la cadena de ácido graso tiene 8-20 carbonos de longitud. En algunas realizaciones, el ácido graso es ácido octanoico (C8), ácido nonanoico (C9), ácido decanoico (C10), ácido undecanoico (C11), ácido dodecanoico (C12), o ácido tridecanoico (C13). En determinadas realizaciones, el ácido graso es ácido mirístico (C14), ácido pentadecanoico (C15), ácido palmítico (C16), ácido heptadecanoico (C17), ácido esteárico (C18), ácido nonadecanoico (C19), o ácido araquídico (C20).

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana (insulina lispro), Asp^{B28}-insulina humana (insulina asparta), $Lys^{B3}Glu^{B29}$-insulina humana (insulina glulisina), $Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana (insulina glargina), $N^{\varepsilon B29}$-miristoil-des(B30)-insulina humana (insulina detemir), Arg^{B26}-insulina humana, Arg^{B1}-insulina humana, Arg^{A0}-insulina humana, $Gly^{B1}Arg^{B13}$-insulina humana, Arg^{A21}-insulina humana, $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, des(B30)-insulina humana, des(B27)-insulina humana, des(B28-B30)-insulina humana, des(B1)-insulina humana, des(B1-B3)-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-palmitoilo-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-miristoilo-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-palmitoilo-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-miristoilo-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-palmitoil-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B30}$-miristoil-$Thr^{B29}Lys^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B30}$-palmitoil-$Thr^{B29}Lys^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-(N-palmitoil-γ-glutamil)-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-(N-litocolil-γ-glutamil)-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-(ω-carboxiheptadecanoil)-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-(ω-carboxiheptadecanoil)- insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-octanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-miristoil-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B31}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-miristoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-miristoil-$Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-miristoil-$Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-miristoil-$Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-octanoil-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-octanoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-octanoil-$Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-$Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-octanoil-$Arg^{B0}Gly^{A21}Asp^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-octanoil-$Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-octanoil-$Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de uno de los siguientes polipéptidos de insulina: $N^{\varepsilon B28}$-miristoil-$Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-miristoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B30}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-miristoil-$Arg^{A0}Gly^{A21}Lys^{B21}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-miristoil-$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-miristoil-$Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-miristoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-miristoil-$Arg^{A0}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-octanoil-$Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$-octanoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-octanoil-$Arg^{A0}Gly^{A21}Lys^{B21}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-octanoil-$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-octanoil-$Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Lys^{B29}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-octanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-octanoil-$Arg^{A0}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-Gly^{A21}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-Gly^{A21}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-Gly^{A21}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-Gly^{A21}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}$-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}$-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-Ala^{A21}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-Ala^{A21}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-Ala^{A21}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-Ala^{A21}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-Gln^{B3}-des(B30)-insulina humano, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-Gln^{B3}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-Gln^{B3}-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-Gln^{B3}-des(B30)-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-Gly^{A21}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-Gly^{A21}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-Gly^{A21}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-Gly^{A21}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-Ala^{A21}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-Ala^{A21}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-Ala^{A21}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-Ala^{A21}-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-$Ala^{A21}Gln^{B3}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-Gln^{B3}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-Gln^{B3}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-Gln^{B3}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-Gln^{B3}-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-Glu^{B30}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-Glu^{B30}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-Glu^{B30}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-Glu^{B30}-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-$Gly^{A21}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-$Gly^{A21}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-$Gly^{A21}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-$Gly^{A21}Glu^{B30}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-$Gly^{A20}Gln^{B3}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-$Ala^{A21}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-$Ala^{A21}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-$Ala^{A21}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-$Ala^{A21}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoil-$Gln^{B3}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoil-$Gln^{B3}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-$Gln^{B3}Glu^{B30}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoil-$Gln^{B3}Glu^{B30}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-formil-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-formil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-formil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-formil-$N^{\alpha B1}$-formil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-formil-$N^{\alpha A1}$-formil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-formil-$N^{\alpha B1}$-formil-insulina humana, $N^{\alpha B29}$-formil-$N^{\alpha A1}$-formil-$N^{\alpha B1}$-formil-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-acetil-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-acetil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-acetil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-acetil-$N^{\alpha B1}$-acetil-insulina humana, $N^{\alpha B29}$-acetil-$N^{\alpha A1}$-acetil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-acetil-$N^{\alpha B1}$-acetil-insulina humana, $N^{\alpha B29}$-acetil-$N^{\alpha A1}$-acetil-$N^{\alpha B1}$-acetil-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-propionil-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-propionil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-propionil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-acetil-$N^{\alpha B1}$-propionil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-propionil-$N^{\alpha A1}$-propionil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-propionil-$N^{\alpha B1}$-propionil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-propionil-$N^{\alpha A1}$-propionil-$N^{\alpha B1}$-propionil-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-butiril-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-butiril-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-butiril-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-butiril-$N^{\alpha B1}$-butiril-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-butiril-$N^{\alpha A1}$-butiril-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-butiril-$N^{\alpha B1}$-butiril-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-butiril-$N^{\alpha A1}$-butiril-$N^{\alpha B1}$-butiril-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-pentanoil-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-pentanoil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-pentanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-pentanoil-$N^{\alpha B1}$-pentanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-pentanoil-$N^{\alpha A1}$-pentanoil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-pentanoil-$N^{\alpha B1}$-pentanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-pentanoil-$N^{\alpha A1}$-pentanoil-$N^{\alpha B1}$-pentanoil-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-hexanoil-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-hexanoil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-hexanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-hexanoil-$N^{\alpha B1}$-hexanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-hexanoil-$N^{\alpha A1}$-hexanoil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-hexanoil-$N\alpha^{B1}$-hexanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-hexanoil-$N^{\alpha A1}$-hexanoil-$N^{\alpha B1}$-hexanoil-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-heptanoil-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-heptanoil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-heptanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-heptanoil-$N^{\alpha B1}$-heptanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-heptanoil-$N^{\alpha A1}$-heptanoil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-heptanoil-$N^{\alpha B1}$ -heptanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-heptanoil-$N^{\alpha A1}$-heptanoil-$N^{\alpha B1}$-heptanoil-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\alpha B1}$-octanoil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-octanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-octanoil-$N^{\alpha B1}$-octanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-octanoil-$N^{\alpha A1}$-octanoil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-octanoil-$N^{\alpha B1}$-octanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-octanoil-$N^{\alpha A1}$-octanoil-$N^{\alpha B1}$-octanoil-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-nonanoil-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-nonanoil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-nonanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-nonanoil-$N^{\alpha B1}$-nonanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-nonanoil-$N^{\alpha A1}$-nonanoil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-nonanoil-$N^{\alpha B1}$-nonanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-nonanoil-$N^{\alpha A1}$-nonanoil-$N^{\alpha B1}$-nonanoil-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-decanoil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-decanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-$N^{\alpha B1}$-decanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-$N^{\alpha A1}$-decanoil-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-decanoil-$N^{\alpha B1}$-decanoil-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-decanoil-$N^{\alpha A1}$-decanoil-$N^{\alpha B1}$-decanoil-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$-formil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-formil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-formil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-formil-$N^{\alpha B1}$-formil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-formil-$N^{\alpha A1}$-formil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-formil-$N^{\alpha B1}$-formil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-formil-$N^{\alpha A1}$-formil-$N^{\alpha B1}$-formil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-acetil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-acetil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-acetil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-acetil-$N^{\alpha B1}$-acetil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$-acetil-$N^{\alpha A1}$-acetil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-acetil-$N^{\alpha B1}$-acetil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-acetil-$N^{\alpha A1}$-acetil-$N^{\alpha B1}$-acetil-$Lys^{B28}pro^{B29}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$-propionil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-propionil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-propionil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-propionil-$N^{\alpha B1}$-propionil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-propionil-$N^{\alpha A1}$-propionil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-propionil-$N^{\alpha B1}$-propionil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-propionil-$N^{\alpha A1}$-propionil-$N^{\alpha B1}$-propionil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$-butiril-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-butiril-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-butiril-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-butiril-$N^{\alpha B1}$-butiril-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-butiril-$N^{\alpha A1}$-butiril-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-butiril-$N^{\alpha B1}$-butiril-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-butiril-$N^{\alpha A1}$-butiril-$N^{\alpha B1}$-butiril-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$-pentanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-pentanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-pentanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-pentanoil-$N^{\alpha B1}$-pentanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-pentanoil-$N^{\alpha A1}$-pentanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-pentanoil-$N^{\alpha B1}$-pentanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-pentanoil-$N^{\alpha A1}$-pentanoil-$N^{\alpha B1}$-pentanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$-hexanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-hexanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-hexanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-hexanoil-$N^{\alpha B1}$-hexanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-hexanoil-$N^{\alpha A1}$-hexanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-hexanoil-$N^{\alpha B1}$-hexanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-hexanoil-$N^{\alpha A1}$-hexanoil-$N^{\alpha B1}$-hexanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$-heptanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-heptanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-heptanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-heptanoil-$N^{\alpha B1}$-heptanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-heptanoil-$N^{\alpha A1}$-heptanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-heptanoil-$N^{\alpha B1}$-heptanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-heptanoil-$N^{\alpha A1}$-heptanoil-$N^{\alpha B1}$-heptanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$-octanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-octanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-octanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-octanoil-$N^{\alpha B1}$-octanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-octanoil-$N^{\alpha A1}$-octanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-octanoil-$N^{\alpha B1}$-octanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-octanoil-$N^{\alpha A1}$-octanoil-$N^{\alpha B1}$-octanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$-nonanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-nonanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-nonanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-nonanoil-$N^{\alpha B1}$-nonanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-nonanoil-$N^{\alpha A1}$-nonanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-nonanoil-$N^{\alpha B1}$-nonanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-nonanoil-$N^{\alpha A1}$-nonanoil-$N^{\alpha B1}$-nonanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$-decanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-decanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-decanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-decanoil-$N^{\alpha B1}$-decanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-decanoil-$N^{\alpha A1}$-decanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-decanoil-$N^{\alpha B1}$-decanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$-decanoil-$N^{\alpha A1}$-decanoil-$N^{\alpha B1}$-decanoil-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-insulina humana.

En determinadas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o las modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$-pentanoil-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-hexanoil-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-heptanoil-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-octanoil-$N^{\alpha B1}$-octanoil-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-propionil-$N^{\alpha A1}$-propionil-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-acetil-$N^{\alpha B1}$-acetil-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-formil-$N^{\alpha A1}$-formil-$N^{\alpha B1}$-formil-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-formil-des(B26)-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-acetil-Asp^{B28}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-propionil-$N^{\alpha A1}$-propionil-$N^{\alpha B1}$-propionil-$Asp^{B1}Asp^{B3}AspB^{21}$-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-pentanoil-Gly^{A21}-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-hexanoil-Gly^{A21}-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-heptanoil-Gly^{A21}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-octanoil-$N^{\alpha B1}$-octanoil-Gly^{A21}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-propionil-$N^{\alpha A1}$-propionil-Gly^{A21}-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-acetil-$N^{\alpha B1}$-acetil-Gly^{A21}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-formil-$N^{\alpha A1}$-formil-$N^{\alpha B1}$-formil-Gly^{A21}-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-butiril-des(B30)-insulina humana, $N^{\alpha B1}$-butiril-des(B30)-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-butiril-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-butiril-$N^{\alpha B1}$-butiril-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-butiril-$N^{\alpha A1}$-butiril-des(B30)-insulina humana, $N^{\alpha A1}$-butiril-$N^{\alpha B1}$-butiril-des(B30)-insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$-butiril-$N^{\alpha A1}$-butiril-$N^{\alpha B1}$-butiril-des(B30)-insulina humana.

La presente divulgación abarca también las formas modificadas de las insulinas no humanas (por ejemplo, insulina de porcino, insulina de bovino, insulina de conejo, insulina de oveja, etc.) que comprende una cualquiera de las mutaciones anteriormente mencionadas y/o las modificaciones químicas.

Estas y otras moléculas de insulina modificadas se describen en detalle en las patentes de Estados Unidos números

6.906.028; 6.551.992; 6.465.426; 6.444.641; 6.335.316; 6.268.335; 6.051.551; 6.034.054; 5.952.297; 5.922.675; 5.747.642; 5.693.609; 5.650.486; 5.547.929; 5.504.188; 5.474.978; 5.461.031; y 4.421.685; y en las patentes de Estados Unidos números 7.387.996; 6.869.930; 6.174.856; 6.011.007; 5.866.538; y 5.750.497.

En diversas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación incluye los tres puentes disulfuro naturales (es decir, uno entre la posición 7 de la cadena A y la posición 7 de la cadena B, un segundo entre la posición 20 de la cadena A y la posición 19 de la cadena B, y un tercero entre las posiciones 6 y 11 de la cadena A).

En algunas realizaciones, una molécula de insulina está modificada y/o mutada para reducir su afinidad para el receptor de insulina. Sin desear quedar ligados a una teoría particular, se cree que la atenuación de la afinidad del receptor de una molécula de insulina mediante modificación (por ejemplo, acilación) o mutación puede disminuirla velocidad a la cual se elimina la molécula de insulina del suero. En algunas realizaciones, una afinidad disminuida del receptor de insulina *in vitro* se traduce en una actividad *in vivo* superior para un conjugado de insulina. En determinadas realizaciones, una molécula de insulina está mutada de tal manera que el sitio de la mutación se usa como un punto de conjugación, y la conjugación en el sitio mutado reduce la unión al receptor de insulina (por ejemplo, Lys^{A3}). En algunas otras realizaciones, la conjugación en un aminoácido o término natural existente reduce la unión al receptor de insulina (por ejemplo, Gly^{A1}). En algunas realizaciones, una molécula de insulina se conjuga en la posición A4, A5, A8, A9 o B30. En determinadas realizaciones, la conjugación en la posición A4, A5, A8, A9, o B30 tiene lugar mediante una cadena secundaria de un aminoácido natural (por ejemplo, Glu^{A4}). En algunas otras realizaciones, una molécula de insulina está mutada en la posición A4, A5, A8, A9, o B30 para proporcionar un sitio para la conjugación (por ejemplo, Lys^{A4}, Lys^{A5}, Lys^{A8}, Lys^{A9}, o Lys^{B30}).

Se describen a continuación los métodos para conjugar fármacos incluyendo la insulina. En determinadas realizaciones, una molécula de insulina está conjugada a un ligando o armazón de conjugado mediante el resto de aminoácido A1. En determinadas realizaciones, el resto de aminoácido A1 es glicina. Debe entenderse sin embargo, que la presente divulgación no está limitada a la conjugación en el extremo N y que en determinadas realizaciones, una molécula de insulina puede conjugarse mediante un resto no terminal de aminoácido de la cadena A. En particular, la presente divulgación abarca la conjugación mediante el grupo épsilon-amina de un resto de lisina presente en cualquier posición en la cadena A (natural o introducido mediante mutagénesis dirigida a sitio). Se apreciará que diferentes posiciones de conjugación en la cadena A pueden conducir a diferentes reducciones en la actividad de la insulina. En determinadas realizaciones, una molécula de insulina se conjuga con el armazón conjugado mediante el resto de aminoácido B1. En determinadas realizaciones, el resto de aminoácido B1 es fenilalanina. Debe entenderse sin embargo, que la presente divulgación no está limitada a la conjugación en el extremo N y que en determinadas realizaciones, una molécula de insulina se puede conjugar mediante un resto no terminal de aminoácido de la cadena B. En particular, la presente divulgación abarca la conjugación mediante el grupo épsilon-amina de un resto de lisina presente en cualquier posición en la cadena B (natural o introducido mediante mutagénesis dirigida a sitio). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, una molécula de insulina puede conjugarse mediante el resto de lisina B29. En el caso de la insulina glulisina, se puede emplear la conjugación con el al menos un ligando mediante el resto de lisina B3. Se apreciará que las diferentes posiciones de conjugación en la cadena B pueden conducir a diferentes reducciones en la actividad de la insulina.

En determinadas realizaciones, los ligandos se conjugan con más de un punto de conjugación en un fármaco tal como una molécula de insulina. Por ejemplo, una molécula de insulina puede conjugarse en el extremo N de A1 y la lisina B29. En algunas realizaciones, la conjugación de la amida tiene lugar en tampón carbonato con el conjugado en las posiciones B29 y A1, pero no en la posición B1. En otras realizaciones, una molécula de insulina puede conjugarse en el extremo N de A1, el extremo N de B1, y la lisina B29. En otras realizaciones más, se usan grupos protectores de forma que la conjugación se realiza en las posiciones B1 y B29 o B1 y A1. Se apreciará que se puede emplear cualquier combinación de puntos de conjugación en una molécula de insulina. En algunas realizaciones, al menos uno de los puntos de conjugación es un resto de lisina mutado, por ejemplo, Lys^{A3}.

En diversas realizaciones, un conjugado puede incluir un sensibilizante de la insulina (es decir, un fármaco que potencia la acción de la insulina). Los fármacos que potencian los efectos de la insulina incluyen biguanidas (por ejemplo, metforminas) y glitazonas. El primer fármaco de glitazona era troglitazona que fue devuelto por tener efectos secundarios graves. La segunda generación de glitazonas incluye pioglitazona y rosiglitazona que se toleraban mejor, aunque rosiglitazona se ha asociado con eventos cardiovasculares graves en determinados ensayos.

En diversas realizaciones, un conjugado puede incluir un secretagogo de insulina es decir, un fármaco que estimula la secreción de insulina por las células beta del páncreas). Por ejemplo, en diversas realizaciones, un conjugado puede incluir una sulfonilurea. Las sulfonilureas estimulan la secreción de insulina por las células beta del páncreas, sensibilizándolas a la acción de la glucosa. Las sulfonilureas pueden, además, inhibir la secreción del glucagón y sensibilizar los tejidos diana a la acción de la insulina. La primera generación de sulfonilureas incluye tolbutamida, clorpropamida y carbutamida. La segunda generación de sulfonilureas que son activas a dosis más bajas incluye glipizida, glibenclamida, gliclazida, glibornurida y glimepirida. En diversas realizaciones, un conjugado puede incluir una meglitinida. Las meglitinidas adecuadas incluyen nateglinida, mitiglinida y repaglinida. Su acción hipoglucemiante es más rápida y más corta que la de las sulfonilureas. Otros secretagogos de insulina incluyen el

péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1) y los análogos de GLP-1 (es decir, un péptido con bioactividad de tipo GLP-1 que difiere de GLP-1 en 1-10 sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos y/o mediante una modificación química). GLP-1 reduce la captación de alimento inhibiendo el vaciado gástrico, aumentando la saciedad a través de acciones centrales y suprimiendo la liberación de glucagón. GLP-1 disminuye los niveles de glucosa en plasma aumentando la proliferación de células en los islotes pancreáticos y aumenta la producción de insulina tras el consumo de alimentos. GLP-1 puede modificarse químicamente, por ejemplo, mediante conjugación como liraglutida para extender su semivida *in vivo*. Otros secretagogos más de insulina incluyen análogos exendina-4 y exendina-4 (es decir, un péptido con bioactividad de tipo exendina-4 que difiere de exendina-4 en 1-10 sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos y/o mediante una modificación química). Exendina-4, se encuentra en el veneno del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*), presenta una bioactividad del tipo GLP-1. tiene una semivida mucho más larga que GLP-1 y, a diferencia de GLP-1, puede truncarse en 8 restos de aminoácidos por su extremo N sin perder bioactividad. La región del extremo N de GLP-1 y la exendina-4 son casi idénticas, siendo una diferencia significativa el segundo resto de aminoácido, alanina en GLP-1 y glicina en exendina-4, que proporciona a exendina-4 su resistencia en la digestión *in vivo*. La exendina-4 tiene 9 restos de aminoácidos adicionales en su extremo C en comparación con GLP-1. Mann et al. Biochem. Soc. Trans. 35:713-716, 2007 y Runge et al., Biochemistry 46:5830-5840, 2007 describen varios análogos de GLP-1 y exendina-4 que puede usarse en un conjugado de la presente divulgación. La semivida corta de GLP-1 es el resultado de la digestión enzimática mediante la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). En determinadas realizaciones, los efectos de GLP-1 endógeno pueden potenciarse por la administración de un inhibidor de DPP-IV (por ejemplo, vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina, linagliptina o alogliptina).

En diversas realizaciones, un conjugado puede incluir amilina o un análogo de amilina (es decir, un péptido con bioactividad de tipo amilina que difiere de la amilina en 1-10 sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos y/o mediante una modificación química). La amilina juega un importante papel en la regulación de la glucosa (por ejemplo, véase Edelman y Weyer, Diabetes Technol. Ther. 4:175-189, 2002). La amilina es una hormona neuroendocrina que se secreta simultáneamente con la insulina desde las células beta del páncreas en respuesta a la captación de alimento. Mientras que la insulina trabaja para regular la desaparición de la glucosa del torrente sanguíneo, la amilina trabaja para ayudar a regular la aparición de la glucosa en el torrente sanguíneo desde el estómago y el hígado. El acetato de pramlintida (SYMLIN®) es un análogo de amilina ilustrativo. Como la amilina humana natural es amiloidogénica, la estrategia para diseñar pramlintida implica sustituir determinados restos por los de amilina de rata, que no es amiloidogénica. En particular, se sabe que los restos de prolina son restos que rompen la estructura, de tal manera que estos se injertaron directamente desde la secuencia de rata a la secuencia humana. Glu-10 se sustituyó también por una asparagina.

En diversas realizaciones, un fármaco previamente conjugado puede contener uno o más restos reactivos (por ejemplo, carboxilo o un éster reactivo, restos amina, hidroxilo, aldehído, sulfhidrilo, maleimidilo, alquinilo, azido, etc.). Como se describe a continuación, estos restos activos pueden, en determinadas realizaciones, facilitar el proceso de conjugación. Los ejemplos específicos incluyen fármacos peptídicos que soportan la amina del extremo alfa y/o grupos lisina en épsilon-amina. Se apreciará que cualquiera de estos restos reactivos puede añadirse artificialmente a un fármaco conocido si no están ya presentes. Por ejemplo, en el caso de fármacos peptídicos, se puede añadir un aminoácido adecuado (por ejemplo, una lisina) o sustituirse en la secuencia de aminoácidos. Además, como se analiza con más detalle a continuación, se apreciará que el proceso de conjugación puede controlarse bloqueando selectivamente determinados restos reactivos antes de la conjugación.

En diversas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación puede aprovecharse para manipular un mecanismo de retroalimentación natural entre la glucosa e insulina (donde el nivel de insulina aumenta a medida que el nivel de glucosa aumenta, y el nivel de glucosa disminuye a medida que el nivel de insulina aumenta). Como alternativa, en diversas realizaciones, el fármaco puede ser una molécula que (a) tiene la misma función que la insulina (por ejemplo, reduce los niveles de glucosa), (b) estimula la producción de insulina y/o (c) potencia el(los) efecto(s) de la insulina. Por ejemplo, como se ha analizado anteriormente, se podría usar un secretagogo de la insulina o un sensibilizante de la insulina en vez de insulina como fármaco.

En diversas realizaciones, se puede usar un conjugado que incluya un fármaco con una función que no esté directamente relacionada con la glucosa. Aunque no de forma limitativa, se puede usar un conjugado que sea sensible a la glucosa para proporcionar dosificación a largo plazo de un fármaco a la hora de comer. Cualquier fármaco que necesita dosificarse periódicamente y/o con alimentos podría beneficiarse de dicho sistema de alimentación. Como es bien sabido en la técnica, muchos fármacos tradicionales deben administrarse con alimentos o a la hora de comer. Por ejemplo, los fármacos que inhiben la absorción de grasas (por ejemplo, orlistat) están ventajosamente presentes durante la hora de comer. De manera similar, los fármacos con menores niveles de lípidos, por ejemplo, lovastatina, atorvastatina, o simvastatina, o los niveles de triglicéridos, por ejemplo, gemfibrozilo, pueden también liberarse ventajosamente a las horas de comer.

Conjugados de insulina ilustrativos

En diversas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de aminoetiltrimanosa (AETM). En determinadas realizaciones, la molécula de insulina se

conjuga mediante el resto del aminoácido A1. En determinadas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido B1. En determinadas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}. En determinadas realizaciones, la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B3}.

En determinadas variaciones de la divulgación, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de aminoetilglucosa (AEG). En determinadas variaciones de la divulgación, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de aminoetilmanosa (AEM). En determinadas variaciones de la divulgación, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de aminoetilbimanosa (AEBM). En determinadas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de aminoetiltrimanosa (AETM). En determinadas variaciones de la divulgación, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de β-aminoetil-N-acetilglucosamilo (AEGA). En determinadas variaciones de la divulgación, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de aminoetilfucosa (AEF).

En diversas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con dos o más ligandos separados. En algunas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con dos ligandos separados. En otras realizaciones, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con tres separados. En determinadas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con cuatro ligandos separados. En determinadas variaciones de la divulgación, los dos o más ligandos separados de dicho conjugado son aminoetilglucosa (AEG). En determinadas variaciones de la divulgación, los dos o más ligandos separados de dicho conjugado son aminoetilmanosa (AEM). En determinadas variaciones de la divulgación, los dos o más ligandos separados de dicho conjugado son aminoetilbimanosa (AEBM). En determinadas realizaciones, los dos o más ligandos separados de dicho conjugado son aminoetiltrimanosa (AETM). En determinadas variaciones de la divulgación, los dos o más ligandos separados de dicho conjugado son β-aminoetil-N-acetilglucosamina (AEGA). En determinadas variaciones de la divulgación, los dos o más ligandos separados de dicho conjugado son aminoetilfucosa (AEF).

En diversas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación comprende dos o más ligandos separados conjugados a un único armazón conjugado que está también conjugado a una molécula de insulina. En algunas realizaciones, los dos o más ligandos separados y la molécula de insulina de dicho conjugado están cada uno localizados en una rama separada de un único armazón conjugado ramificado. En algunas realizaciones, los dos o más ligandos separados y la molécula de insulina de dicho conjugado están cada uno localizados en los términos de ramas separadas de un único armazón conjugado ramificado. En algunas realizaciones, los dos o más ligandos de dicho conjugado se conjugan a la molécula de insulina mediante dos o más diferentes puntos de conjugación. En determinadas realizaciones similares, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto de aminoácido A1 y grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}. En determinadas realizaciones similares, la molécula de insulina se conjuga con dos armazones conjugados separados que están cada uno conjugado con uno o más ligandos separados. En otras realizaciones de este tipo, la molécula de insulina se conjuga con dos armazones conjugados separados que están cada uno conjugado a un ligando. En otras realizaciones más específicas, la molécula de insulina se conjuga con dos armazones conjugados ramificados separados que se conjugan cada uno con dos ligandos. En determinadas realizaciones similares, los ligandos se localizan en ramas separadas de los armazones conjugados ramificados. En otras realizaciones de este tipo, los ligandos se localizan en términos de ramas separadas de los armazones conjugados ramificados.

En determinadas variaciones de la divulgación, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilglucosa (AEG). En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido A1. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido B1. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B3}. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto de aminoácido A1 y grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}.

En determinadas variaciones de la divulgación, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilmanosa (AEM). En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido A1. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido B1. En determinadas realizaciones similares, la molécula de insulina se conjuga mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B3}. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto de aminoácido A1 y grupo épsilon-amino de

la Lys^{B29}.

En determinadas variaciones de la divulgación, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilbimanosa (AEBM). En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido A1. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido B1. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B3}. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto de aminoácido A1 y grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}.

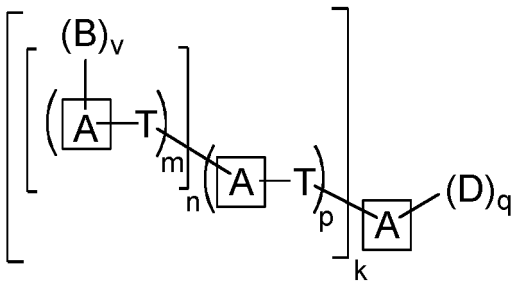
En diversas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetiltrimanosa (AETM). En determinadas realizaciones similares, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido A1. En determinadas realizaciones similares, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido B1. En determinadas realizaciones similares, la molécula de insulina se conjuga mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}. En determinadas realizaciones similares, la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B3}. En determinadas realizaciones similares, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto de aminoácido A1 y grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}.

En determinadas variaciones de la divulgación, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con β-aminoetil-N-acetilglucosamina (AEGA). En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido A1. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido B1. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B3}. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto de aminoácido A1 y grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}.

En determinadas variaciones de la divulgación, un conjugado de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilfucosa (AEF). En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido A1. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto del aminoácido B1. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada mediante el grupo épsilon-amino de la Lys^{B3}. En determinadas de las mencionadas variaciones de la divulgación, la molécula de insulina se conjuga mediante el resto de aminoácido A1 y grupo épsilon-amino de la Lys^{B29}.

Armazones de conjugado

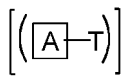
Esta sección describe algunos armazones de conjugado a modo de ejemplo. En diversas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación puede tener la fórmula general (I):



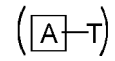
I

en la que:

cada vez que aparece



representa una rama potencial dentro del conjugado;
cada vez que aparece



representa una repetición potencial dentro de una rama del conjugado;

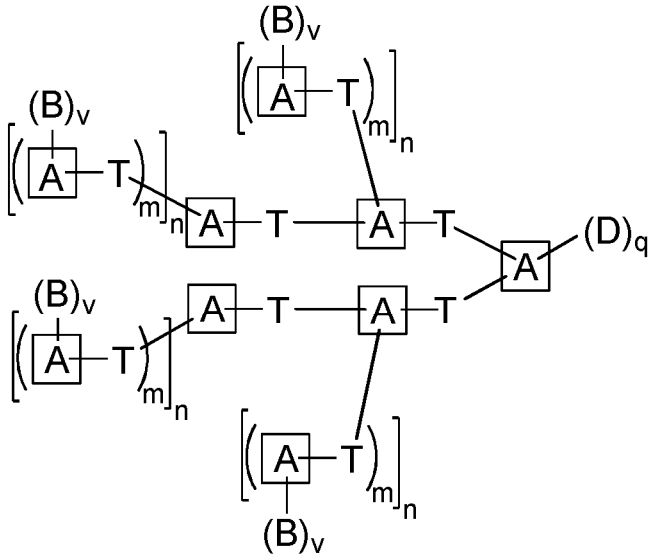
cada vez que aparece es independientemente un enlace covalente, un átomo de carbono, un heteroátomo o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico;
cada vez que aparece T es independientemente un enlace covalente o una cadena de hidrocarburo C_{1-30} bivalente, lineal o ramificado, saturado o insaturado, opcionalmente sustituido, en el que una o más unidades de metileno de T están opcional e independientemente reemplazadas por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, un grupo heterocíclico, un grupo arilo o un grupo heteroarilo;
cada vez que aparece R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado o un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo o resto heteroalifático;
-B es $-T-L^B-X$;
cada vez que aparece X es independientemente un ligando;
cada vez que aparece L^B es independientemente un enlace covalente o un grupo obtenido a partir de la conjugación covalente de un T con un X;
-D es $-T-L^D-W$;
cada vez que aparece W es independientemente un fármaco;
cada vez que aparece L^D es independientemente un enlace covalente o un grupo obtenido a partir de la conjugación covalente de un T con un W;
k es un número entero de 1 a 12, ambos incluidos; q es un número entero de 1 a 4, ambos incluidos;
cada vez que aparece p es independientemente un número entero de 1 a 5, ambos incluidos; y cada vez que aparece n es independientemente un número entero de 0 a 5, ambos incluidos; y cada vez que aparece m es independientemente un número entero de 1 a 5, ambos incluidos; y
cada vez que aparece v es independientemente un número entero de 0 a 5, ambos incluidos, con la condición de que dentro de cada rama de k, al menos una aparición de n es ≥ 1 y al menos una aparición de v es ≥ 1.

Debe apreciarse que la fórmula general (I) (y otras fórmulas en el presente documento) no listan expresamente cada hidrógeno.

Por ejemplo, si el central es un grupo arilo C_6 k + q < 6, se apreciará que la posición o posiciones abiertas en el anillo arilo C_6 incluyen un hidrógeno.

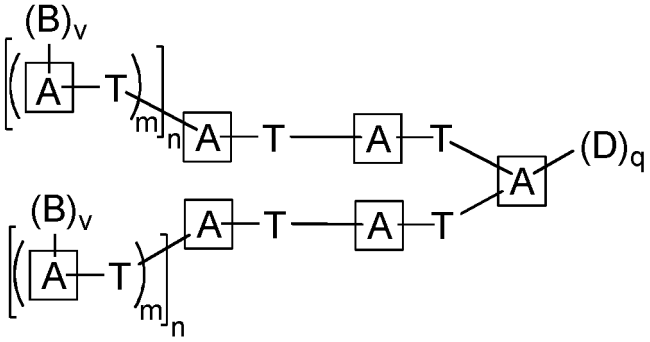
En general, se apreciará que cada vez que aparece , representa un nodo de ramificación potencial y que el número de ramas en cada nodo se determina por los valores de k para el central y n para las apariciones de no centrales. Alguien con una habilidad habitual apreciará que debido a que cada vez que aparece n puede ser un número entero de 0 a 5, la presente divulgación contempla realizaciones lineales, ramificadas e hiperramificadas (por ejemplo, de tipo dendrímero) de estos conjugados. La condición que requiere que dentro de cada rama de k, al menos una aparición de n sea ≥ 1 y al menos una aparición de v sea ≥ 1 asegura que cada conjugado incluye al menos una aparición de B (es decir, un ligando).

En ciertas realizaciones, cada vez que aparece en un resto entre paréntesis de p, está sustituido con un número de restos entre paréntesis de n correspondiente al valor de n ≥ 1. Por ejemplo, cuando k = 2 y p = 2 en ambas ramas de k, el conjugado puede ser de la fórmula (Ia):



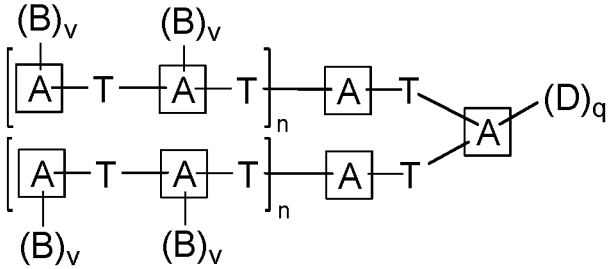
Ia

En otras realizaciones, solo las apariciones terminales de [A] en un resto entre paréntesis de p están sustituidas con un número de restos entre paréntesis de n correspondiente al valor de ≥ 1. Por ejemplo, cuando k = 2 y p = 2 en ambas ramas de k (y n = 0 para el primer resto entre paréntesis de p en ambas ramas de k), el conjugado puede ser de la fórmula (Ib):

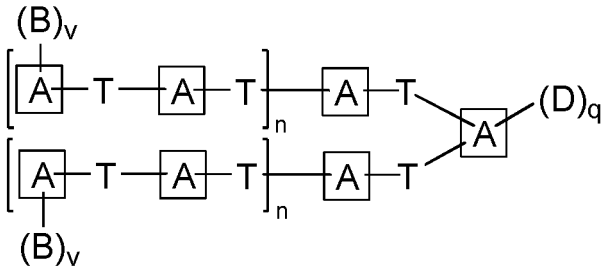


Ib

En ciertas realizaciones, cada vez que aparece [A] en un resto entre paréntesis de m, está sustituido con un número de restos B correspondiente al valor de v ≥ 1. Por ejemplo, cuando k = 2, cada vez que aparece p = 1, y cada vez que aparece m = 2, el conjugado puede ser de la fórmula (Ic):

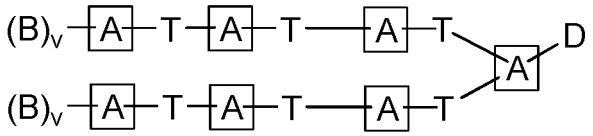


En otras realizaciones, solo las apariciones terminales de [A] en un resto entre paréntesis de m están sustituidas con un número de restos B correspondiente al valor de v ≥ 1. Por ejemplo, cuando k = 2, cada vez que aparece p = 1, y cada vez que aparece m = 2 (y v = 0 para el primer resto entre paréntesis de m en cada rama de n), el conjugado puede ser de la fórmula (Id):



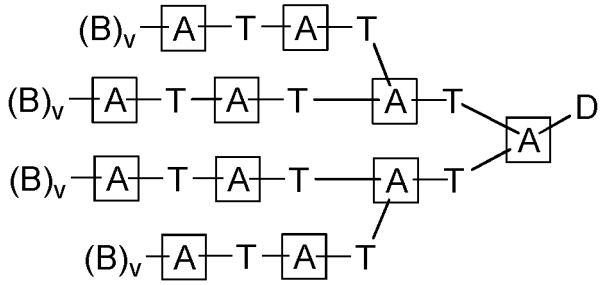
Id

A modo de ejemplo adicional, cuando q =1 y n = 1 en ambas ramas de k de la fórmula previa, el conjugado puede ser de la fórmula (Ie):



Ie

Como alternativa, cuando q =1 y n = 2 en ambas ramas de k de la fórmula previa, el conjugado puede ser de la fórmula (If):



If

En diversas realizaciones, la presente divulgación también proporciona conjugados que incluyen ligandos y/o un fármaco que no está enlazado covalentemente a un armazón de conjugado.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de cualquiera de las fórmulas anteriores, en los que:

cada uno de [A], T, D, k, q, p, n, m y v se define como se ha descrito anteriormente y en el presente documento;
-B es -T-LRP^B-X;
cada vez que aparece X es independientemente un ligando; y
cada vez que aparece LRP^B es independientemente un par receptor de ligando que forma un enlace no covalente entre T y X con una constante de disociación en suero humano de menos de 1 pmol/l.

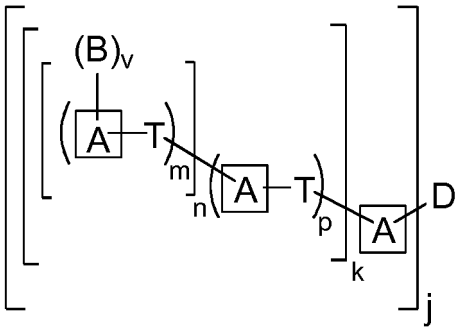
En otras realizaciones más, la presente divulgación proporciona conjugados de cualquiera de las fórmulas anteriores, en los que:

cada uno de [A], T, B, k, q, p, n, m y v se define como se ha descrito anteriormente y en el presente documento;
-D es -T-LRP^D-W;
cada vez que aparece W es independientemente un fármaco; y
cada vez que aparece LRP^D es independientemente un par receptor de ligando que forma un enlace no covalente entre T y
W con una constante de disociación en suero humano de menos de 1 pmol/l.

En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de cualquiera de las fórmulas anteriores, en los que:

cada uno de [A], T, k, q, p, n, m y v se define como se ha descrito anteriormente y en el presente documento;
-B es -T-LRP^B-X;
cada vez que aparece X es independientemente un ligando;
cada vez que aparece LRP^B es independientemente un par receptor de ligando que forma un enlace no covalente entre T y
X con una constante de disociación en suero humano de menos de 1 pmol/l;
-D es -T-LRP^D-W;
cada vez que aparece W es independientemente un fármaco; y
cada vez que aparece LRP^D es independientemente un par receptor de ligando que forma un enlace no covalente entre T y
W con una constante de disociación en suero humano de menos de 1 pmol/l.

En otro aspecto, un conjugado la presente divulgación puede tener la fórmula general (II):



II

en la que [A], B, T, D, v, m, n, p y k son como se definen y describen en el presente documento, y j es un número entero de 1 a 4, ambos inclusive. Los conjugados de fórmula (II) pueden tener múltiples sitios de conjugación de ligando a fármaco (es decir, donde dos o más ligandos están conjugados a una sola molécula de fármaco a través de sitios diferentes en el fármaco, por ejemplo, aminoácidos diferentes en un fármaco biomolecular). Se entenderá que, cuando q es 1, los subgéneros descritos anteriormente (es decir, las fórmulas (Ia)-(If)) se aplican a conjugados fórmula (II) cuando j es 1. De forma análoga, pueden contemplarse subgéneros similares por un experto en la materia para conjugados en los que j es 2, 3 o 4.

Para fines de ilustración y para evitar confusiones, debe entenderse que cada vez que aparece: - [A]-D- [A] en un conjugado de fórmula (II) (es decir, cuando j es 2) podría representarse como: - [A]-T-L^D-W-L^D-T- [A] - (cuando el fármaco está enlazado covalentemente al armazón de conjugado) o - [A]-T-LRP^D-W-LRP^D-T- [A]- (cuando el fármaco no está enlazado covalentemente al armazón de conjugado).

Descripción de grupos a modo de ejemplo

[A] *(nodo)*

En ciertas realizaciones, cada vez que aparece [A] es independientemente un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico. En algunas realizaciones, cada vez que aparece [A] es el mismo. En algunas realizaciones, el [A] central es diferente de todas las demás apariciones de [A]. En ciertas realizaciones, todas las apariciones de [A] son iguales, excepto para el [A] central.

En algunas realizaciones, [A] es un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, [A] es arilo de 6 miembros. En ciertas realizaciones, [A] es fenilo.

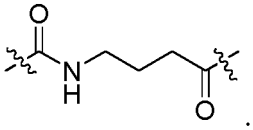
En ciertas realizaciones, [A] es un heteroátomo seleccionado entre N, O o S. En algunas realizaciones, [A] es un átomo de nitrógeno. En algunas realizaciones, [A] es un átomo de oxígeno. En algunas realizaciones, [A] es un átomo de azufre. En algunas realizaciones, [A] es un átomo de carbono.

T (espaciador)

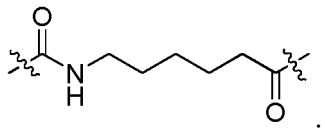
En ciertas realizaciones, cada vez que aparece T es independientemente una cadena de hidrocarburo C_{1-20} bivalente, lineal o ramificado, saturado o insaturado, opcionalmente sustituido, en el que una o más unidades de metileno de T están opcional e independientemente reemplazadas por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, un grupo heterocíclico, un grupo arilo o un grupo heteroarilo. En ciertas realizaciones, una, dos, tres, cuatro o cinco unidades de metileno de T están opcional e independientemente reemplazadas. En ciertas realizaciones, T se construye a partir de una cadena de hidrocarburo C_{1-10}, C_{1-8}, C_{1-6}, C_{1-4}, C_{2-12}, C_{4-12}, C_{6-12}, C_{8-12} o C_{10-12}, en la que una o más unidades de metileno de T están opcional e independientemente reemplazadas por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, un grupo heterocíclico, un grupo arilo o un grupo heteroarilo. En algunas realizaciones, una o más unidades de metileno de T están reemplazadas por un grupo heterocíclico. En algunas realizaciones, una o más unidades de metileno de T están reemplazadas por un resto de triazol. En ciertas realizaciones, una o más unidades de metileno de T están reemplazadas por -C(O)-. En ciertas realizaciones, una o más unidades de metileno de T están reemplazadas por -C(O)N(R)-. En ciertas realizaciones, una o más unidades de metileno de T están reemplazadas por -O-.

En algunas realizaciones, T es

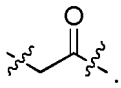
En algunas realizaciones, T es



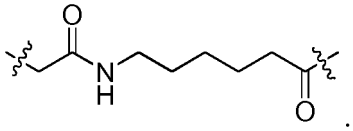
En algunas realizaciones, T es



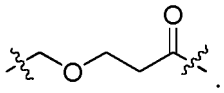
En algunas realizaciones, T es



En algunas realizaciones, T es

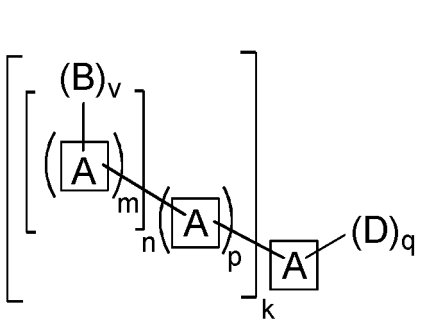


En algunas realizaciones, T es



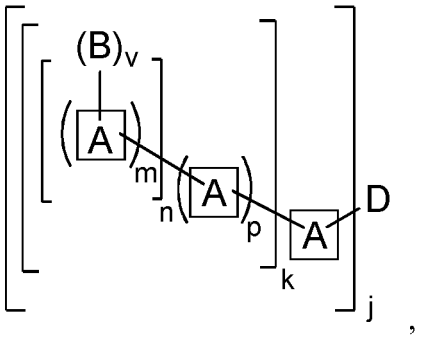
En ciertas realizaciones, cada vez que aparece T es el mismo.

En ciertas realizaciones, cada vez que aparece T (fuera de los grupos B y D) es un enlace covalente y el conjugado es de la fórmula general (IV) o (V):



IV

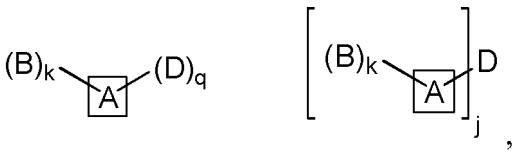
o



V

en la que , B, D, v, m, n, p, k y j son como se definen y describen en el presente documento.

En ciertas realizaciones de las fórmulas generales (IV) y (V), cada vez que aparece , excepto para el central, es un enlace covalente, cada vez que aparece v = 1, y el conjugado es de la fórmula (VI) o (VII):



VI o VII ,

en la que A, B, D, q, k y j son como se definen y describen en el presente documento.

En ciertas de dichas realizaciones para la fórmula (VI), k = 1 y q = 1.

En otras realizaciones, k = 2 y q = 1.

En otras realizaciones, k = 3 y q = 1.

En otras realizaciones, k = 1 y q = 2.

En otras realizaciones, k = 2 y q = 2.

En ciertas de dichas realizaciones para la fórmula (VII), k = 1 y j = 2.

En otras realizaciones, k = 2 y j = 2.

En otras realizaciones, k = 3 y j = 2.

En otras realizaciones, k = 1 y j = 1.

En otras realizaciones, k = 2 y j = 1.

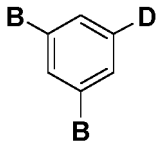
En otras realizaciones, k = 3 y j = 1.

En otras realizaciones, k = 1 y j = 3.

En otras realizaciones, k = 2 y j = 3.

En otras realizaciones, k = 3 y j = 3.

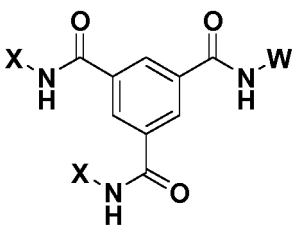
En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula general (VIa):



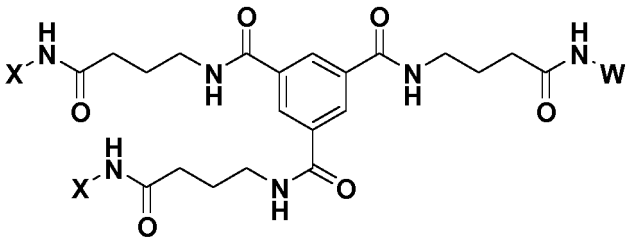
VIa ,

en la que B y D son como se definen y describen en el presente documento.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:

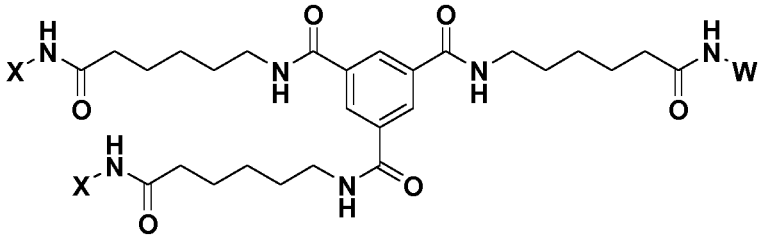


;



;

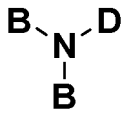
o



.

en la que W y X son como se definen y describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula general (VIb):

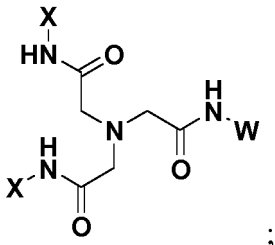


,

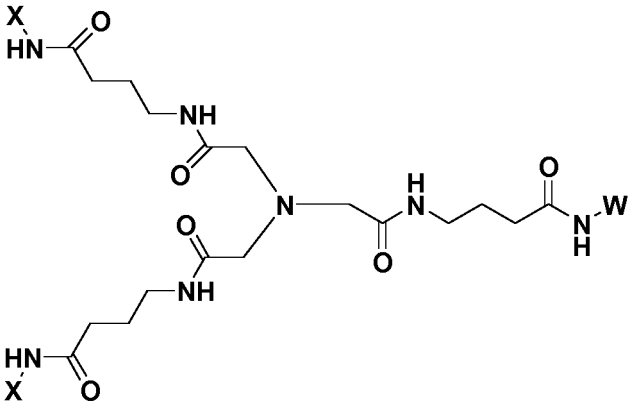
VIb

en la que B y D son como se definen y describen en el presente documento.

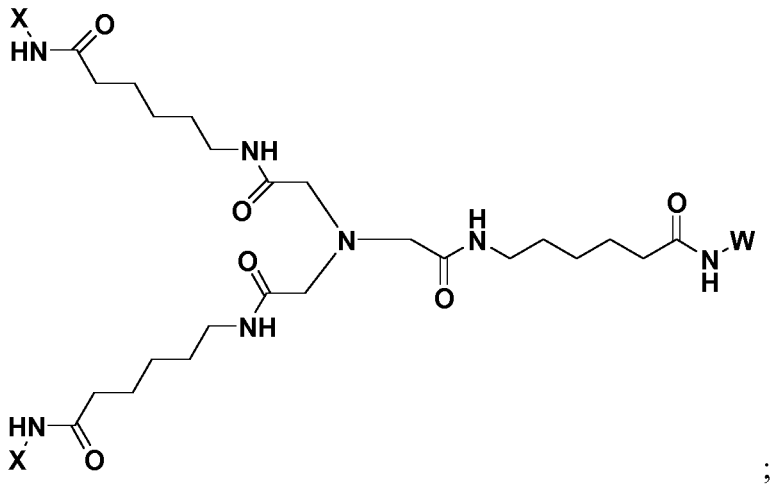
Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:



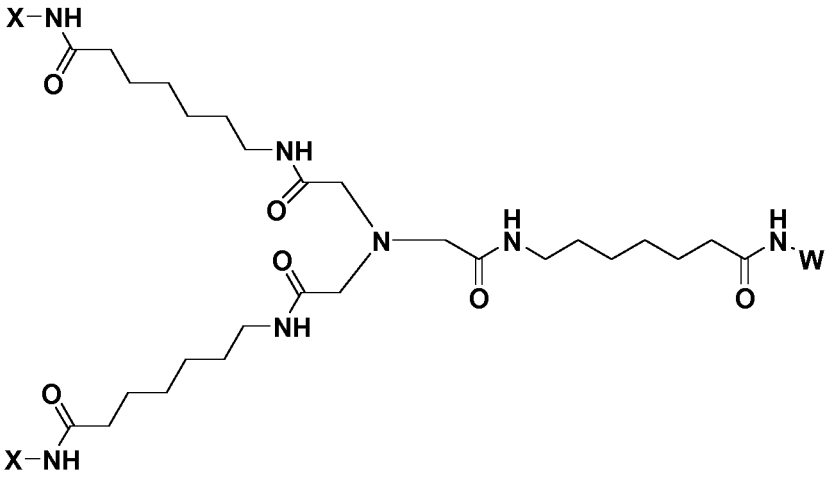
;



;



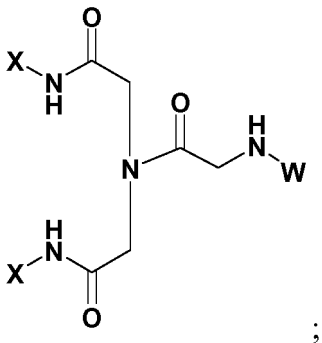
;



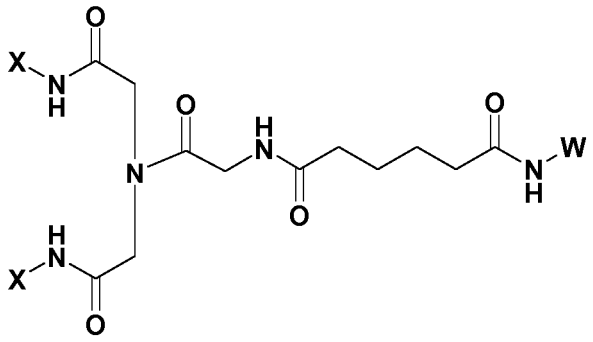
,

en la que W y X son como se definen y describen en el presente documento.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:

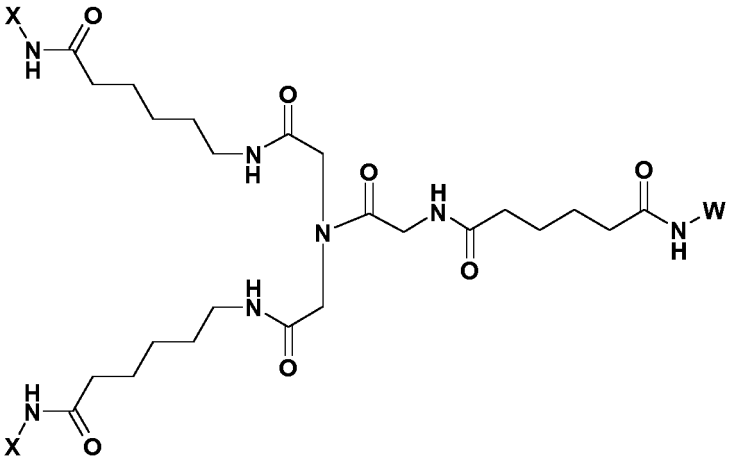


;



;

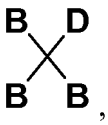
o



,

en la que W y X son como se definen y describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula general (VIc):

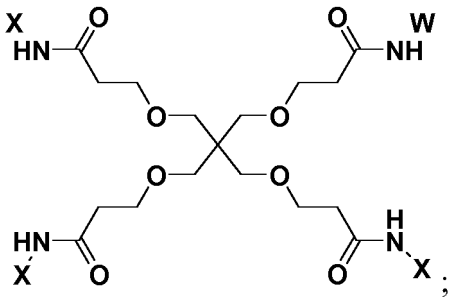


,

VIc

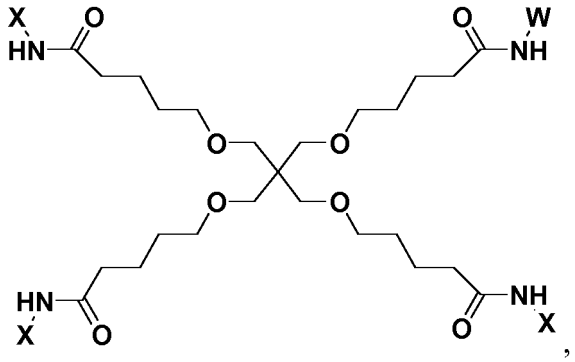
en la que B y D son como se definen y describen en el presente documento.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:



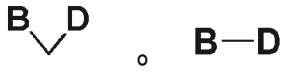
;

o



en la que W y X son como se definen y describen en el presente documento.

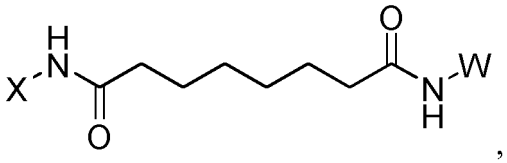
En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula general (VId) o (VIe):



VId VIe

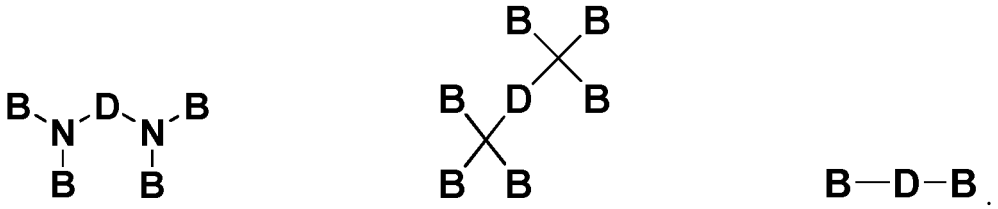
en la que B y D son como se definen y describen en el presente documento.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:



en la que W y X son como se definen y describen en el presente documento.

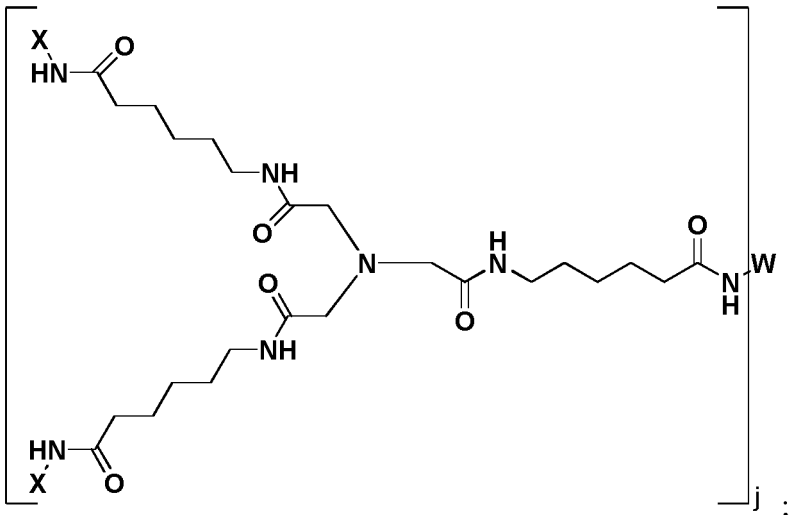
Se apreciará que los subgéneros de las fórmulas (VIa), (VIb), (VIc), (VId) y (VIe) y especies de los mismos, se aplican a conjugados de fórmula (VII) en la que j es 1. De forma análoga, pueden contemplarse especies y subgéneros similares por un experto en la materia para conjugados de fórmula (VII) en la que j es 2, 3 o 4. Por ejemplo, cuando j es 2, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:

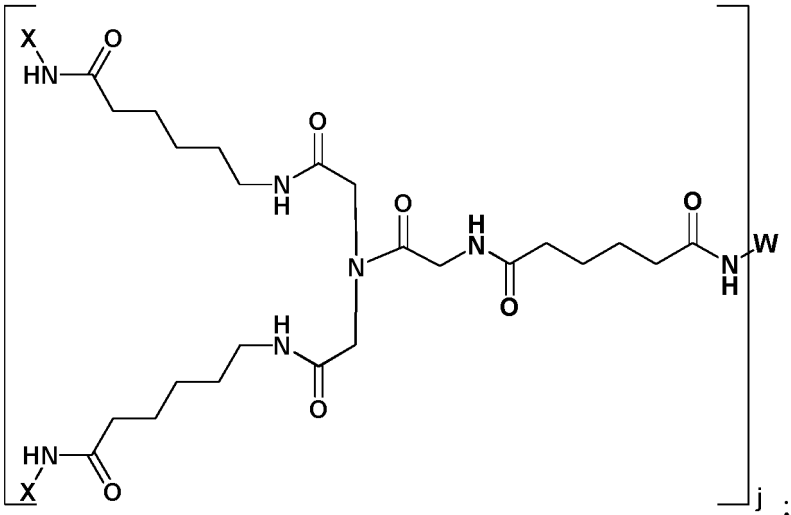


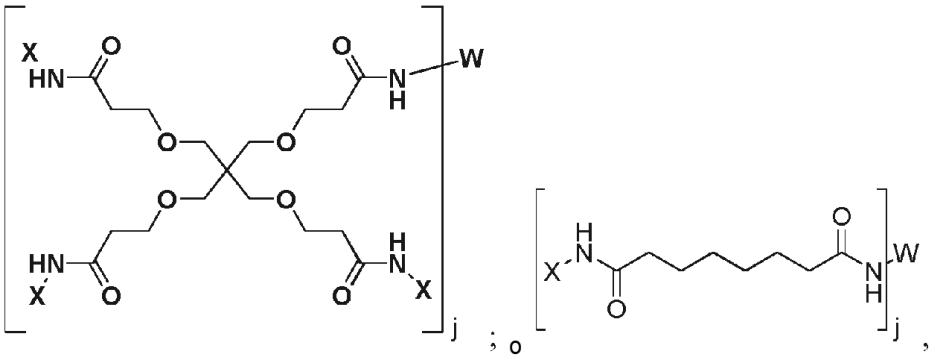
VIIb-*i* VIIc-*i* VIIe-*i*

en la que B y D son como se definen y describen en el presente documento.

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:

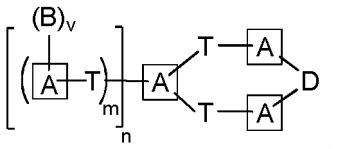






en los que W, X y j son como se definen y describen en el presente documento.

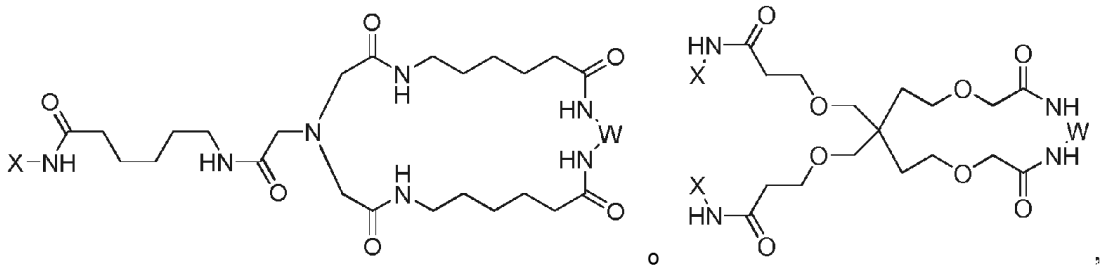
En otro aspecto, un conjugado la presente divulgación puede tener la fórmula general (VIII):



VIII

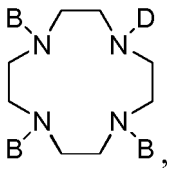
en la que A, T, D, v, m y n son como se definen y describen para conjugados de fórmula (I) y B es -T-L^B-X, en el que, cada vez que aparece X, es independientemente un ligando que incluye un sacárido.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:



en la que W y X son como se definen y describen para conjugados de fórmula (I).

En otro aspecto más, el bastidor de conjugado no es de fórmula (I) o (II), pero en cambio es un macrociclo. En algunas realizaciones, el macrociclo es un macrociclo de poliamina. Por ejemplo, en diversas realizaciones, un conjugado la presente divulgación puede tener la fórmula general (IX):



IX

en la que D es como se define y describe para conjugados de fórmula (I), y B es -T-L^B-X, en el que, cada vez que aparece X, es independientemente un ligando que incluye un sacárido.

B (ligando)

En ciertas realizaciones, -B es -T-L^B-X donde X es un ligando y L^B es un enlace covalente o un grupo obtenido a partir de la conjugación covalente de un X con un T. Los ligandos a modo de ejemplo y sus componentes sacáridos se han descrito anteriormente.

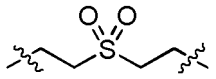
D (fármaco)

En ciertas realizaciones, -D es -T-L^D-W donde W es un fármaco y L^D es un enlace covalente o un grupo obtenido a partir de la conjugación covalente de un W con un T. Los fármacos a modo de ejemplo se han descrito anteriormente.

L^B y L^D (conjugación covalente)

Alguien con una habilidad habitual apreciará que puede usarse una diversidad de químicas de conjugación para conjugar covalentemente un X con un T y/o un W con un T (en general "componentes"). Dichas técnicas son ampliamente conocidas en la materia y más adelante se discuten técnicas a modo de ejemplo. Los componentes pueden enlazarse directamente (es decir, sin ningún grupo químico intermedio) o enlazarse indirectamente a través de un espaciador (por ejemplo, un agente de acoplamiento o cadena covalente que proporciona cierta separación física entre el elemento conjugado y el resto del armazón de conjugado). Debe apreciarse que los componentes

pueden enlazarse covalentemente a un armazón de conjugado a través de una diversidad de enlaces químicos, incluyendo, pero sin limitación, enlaces de amida, amina, éster, éter, tioéter, isourea, imina, etc. En ciertas realizaciones, L^B y/o L^D (generalmente "L" para los propósitos de esta sección) es un enlace covalente. En algunas realizaciones, L es un resto opcionalmente sustituido obtenido de la conjugación de un resto reactivo de carbonilo, reactivo de tiol, reactivo de amina o reactivo de hidroxilo opcionalmente sustituido de T con un grupo carboxilo, tiol, amina o hidroxilo de X o W. En algunas realizaciones, L es un resto opcionalmente sustituido obtenido de la conjugación de un resto reactivo de carboxilo, reactivo de tiol, reactivo de amina o reactivo de hidroxilo opcionalmente sustituido de X o W con un grupo carboxilo, tiol, amina o hidroxilo de T. En algunas realizaciones, L es



.

En algunas realizaciones, L es un resto succinimida.

En diversas realizaciones, los componentes pueden enlazarse covalentemente a un armazón de conjugado usando reacciones de "química de click" como es sabido en la técnica. Estas incluyen, por ejemplo, reacciones de cicloadición, reacciones nucleófilas de apertura de anillo y adiciones a múltiples enlaces carbono-carbono (por ejemplo, véase Kolb y Sharpless, Drug Discovery Today 8:1128-1137, 2003 y referencias citadas en ese documento, así como Dondoni, Chem. Asian J. 2:700-708, 2007 y referencias citadas en ese documento). Como se ha analizado anteriormente, en diversas realizaciones, los componentes pueden estar enlazados a un armazón de conjugado a través de grupos pendientes naturales o añadidos químicamente. En general, se apreciará que el primer y segundo miembros de un par de grupos reactivos (por ejemplo, un grupo carboxilo y un grupo amina que reaccionan para producir un enlace de amida) pueden estar presentes tanto en uno de los componentes como en el armazón (es decir, la situación relativa de los dos miembros es irrelevante siempre y cuando reaccionen para producir un conjugado). Más adelante se analizan con mayor detalle enlazadores a modo de ejemplo.

En diversas realizaciones, los componentes que portan carboxilo (o éster reactivo) pueden conjugarse a armazones que portan -OH (OBF) usando el procedimiento señalado por Kim et al., Biomaterials 24:4843-4851 (2003). En resumen, el OBF se disuelve en DMSO junto con el componente que porta carboxilo y se hace reaccionar por medio de N',N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizadores en una atmósfera seca. Los componentes que portan carboxilo pueden conjugarse a armazones que portan $-NH_2$ (NBF) usando un procedimiento de acoplamiento de carbodiimida (EDAC). Usando este procedimiento, el componente que porta carboxilo se funcionaliza por reacción con EDAC en un tampón de pH 5, seguido de la adición del NBF. En cualquiera de estos casos (y en cualquiera de los siguientes casos), los productos resultantes pueden purificarse por cualquier número de medios disponibles para los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de fase inversa, cromatografía sobre gel de sílice, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración y precipitación selectiva.

En diversas realizaciones, los componentes que portan amina pueden acoplarse a armazones que portan -COOH (CBF). Los CBF que usan restos de éster activados (por ejemplo, véase Hermanson en Bioconjugate Techniques, 2ª edición, Academic Press, 2008 y referencias citadas en ese documento). En resumen, un CBF con ésteres de ácido carboxílico activados terminales, tales como -NHS, -SSC, -NPC, etc., se disuelve en un disolvente orgánico anhidro, tal como DMSO o DMF. Después, se añade el número deseado de equivalentes de componente que porta amina y se mezclan durante varias horas a temperatura ambiente. Los componentes que portan amina también pueden conjugarse a los CBF para producir un enlace de amida estable como se describe por Baudys et al., Bioconj. Chem. 9:176-183, 1998. Esta reacción puede conseguirse añadiendo tributilamina (TBA) y cloroformiato de isobutilo a una solución del CBF y un componente que porta amina en dimetilsulfóxido (DMSO) en condiciones anhidras. Como alternativa, los componentes que portan amina pueden acoplarse a OBF a través de cianilación usando reactivos que incluyen, pero sin limitación, bromuro de cianógeno (CNBr), tetrafluoroborato de N-cianotrietilamonio (CTEA), tetrafluorborato de 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinio (CDAP) y cianato de p-nitrofenilo (pNPC). Las reacciones de CNBr pueden realizarse en una solución acuosa a un pH ligeramente básico. Las reacciones de CDAP se realizan en una mezcla de DMSO y agua a un pH ligeramente básico usando trietilamina (TEA) como catalizador. En ciertas realizaciones, los componentes que portan amina pueden conjugarse a los NBF, por ejemplo, a través de acoplamiento de glutaraldehído en soluciones acuosas tamponadas que contienen piridina, seguido de inactivación con glicina. En ciertas realizaciones, los componentes que portan amina pueden conjugarse a armazones que portan aldehído usando un procedimiento de acoplamiento de bases de Schiff, seguido de reducción (por ejemplo, véase Hermanson en Bioconjugate Techniques, 2ª edición, Academic Press, 2008 y referencias citadas en ese documento, así como Mei et al. en Pharm. Res. 16: 1680-1686, 1999 y referencias citadas en ese documento). En resumen, un armazón con aldehídos activados terminales (por ejemplo, acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, etc.) se disuelve en un tampón acuoso con el pH igual o por debajo de neutro para prevenir una hidrólisis del aldehído indeseada. Después, se añade el número deseado de equivalentes de un componente que porta amina y se mezclan a temperatura ambiente, seguido de la adición de un exceso de agente de reducción adecuado (por ejemplo, borohidruro sódico, cianobrohidruro sódico, triacetoxiborohidruro sódico, piridina borano, trietilamina

borano, etc.).

En diversas realizaciones, los componentes que portan hidroxilo pueden conjugarse a los OBF de acuerdo con el procedimiento de divinilsulfona (DVS). Usando este procedimiento, el OBF se añade a un tampón de bicarbonato con pH 11,4 y se activa con DVS, seguido de la adición de un componente que porta hidroxilo, después de lo cual se añade glicina para neutralizar e interrumpir la reacción. Los componentes que portan hidroxilo también pueden acoplarse a los OBF usando restos de éster activados como se ha descrito anteriormente para producir enlaces de éster.

En diversas realizaciones, los componentes que portan sulfhidrilo pueden acoplarse a armazones que portan maleimida (MBF) usando un procedimiento relativamente suave para producir enlaces de tioéter (por ejemplo, véase Hermanson en Bioconjugate Techniques, 2ª edición, Academic Press, 2008 y referencias citadas en ese documento). Debido a que el grupo maleimida es mucho menos susceptible a la hidrólisis que los ésteres activados, la reacción puede realizarse en condiciones acuosas. En resumen, un MBF se disuelve en una solución acuosa tamponada a pH 6,5-7,5, seguido del número deseado de equivalentes de componente que porta sulfhidrilo. Después de mezclar a temperatura ambiente durante varias horas, puede purificarse el conjugado acoplado a tioéter. Los componentes que portan sulfhidrilo también pueden conjugarse con los NBF de acuerdo con un método descrito por Thoma et al., J. Am. Chem. Soc. 121:5919-5929, 1999. Esta reacción implica suspender el NBF en dimetilformamida anhidra (DMF), seguido de la adición de 2,6-lutidina y anhídrido de ácido y posterior purificación del intermedio reactivo. Después, se añade un componente que porta sulfhidrilo a una solución del intermedio en DMF con trietilamina.

En diversas realizaciones, los componentes que portan azida pueden acoplarse a un armazón que porta alquino (ABF) usando la versión moderna catalizada por cobre (I) de la cicloadición de azida-alquino de tipo Huisgen para dar un 1,2,3-triazol 1,4-di-sustituido (por ejemplo, véase Dondoni, Chem. Asian J. 2:700 - 708, 2007 y referencias citadas en ese documento, así como Dedola et al., Org. Biomol. Chem. 5: 1006-1017, 2007). Esta reacción, denominada comúnmente reacción de "click", puede realizarse por ejemplo en THF puro usando N,N-diisopropiletilamina y $Cu(PPh_3)_3Br$ como sistema catalizador (por ejemplo, véase Wu et al., Chem. Commun. 5775-5777, 2005). La reacción también puede realizarse en una mezcla 3:1 (THF:agua) usando ascorbato sódico y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ como sistema catalizador (por ejemplo, véase Wu et al., más arriba). En cualquier caso, el componente que porta azida se añade al ABF en el número de equivalentes deseado, seguido de mezclado durante 12-48 horas a temperatura ambiente. Como alternativa, los componentes que portan alquino pueden conjugarse con un armazón que porta azida usando exactamente las mismas condiciones descritas anteriormente.

Determinados componentes pueden poseer de un modo natural más de uno del mismo resto químicamente reactivo. En algunos ejemplos, es posible seleccionar el tipo de reacción química y las condiciones para hacer reaccionar selectivamente el componente solo en uno de esos sitios. Por ejemplo, en el caso donde la insulina se conjuga a través de aminas reactivas, en ciertas realizaciones, el α-Phe-B1 en el terminal de N es un sitio de unión preferido sobre el α-Gly-A1 y ε-Lys-B29 en el terminal de N para conservar la bioactividad de la insulina (por ejemplo, véase Mei et al., Pharm. Res. 16: 1680-1686, 1999 y referencias citadas en ese documento, así como Tsai et al., J. Pharm. Sci. 86: 1264-1268, 1997). En una reacción a modo de ejemplo entre insulina y hexadecenal (una molécula terminada en aldehído), los investigadores descubrieron que el mezclado de dos componentes durante una noche en una solución acuosa 1,5 M de salicilato sódico de pH 6,8 que contenía isopropanol al 54 % a una proporción de 1:6 (insulina:aldehído mol/mol) en presencia de cianoborohidruro sódico daba como resultado más de un 80 % de conversión en el producto conjugado con amina secundaria Phe-B1 sustituido individualmente (Mei et al., Pharm. Res. 16:1680-1686, 1999). Sus estudios demostraron que la elección del disolvente, el pH y la proporción de insulina:aldehído afectaban todos a la selectividad y rendimiento de la reacción. En la mayoría de los casos, sin embargo, es difícil conseguir la selectividad a través de la elección de condiciones químicas de reacción. Por lo tanto, en ciertas realizaciones puede ser ventajoso proteger selectivamente el componente (por ejemplo, insulina) en todos los sitios distintos del que se desea para la reacción, seguido de una etapa de desprotección después de haber hecho reaccionar y haber purificado el material. Por ejemplo, hay numerosos ejemplos de protección selectiva de grupos amina de insulina disponibles en la bibliografía, incluyendo aquellos que pueden desprotegerse en condiciones ácidas (BOC), ligeramente ácidas (anhídrido citracónico) y básicas (MSC) (por ejemplo, véase Tsai et al., J. Pharm. Sci. 86: 1264-1268, 1997; Dixon et al., Biochem. J. 109: 312-314, 1968; y Schuettler et al., D. Brandenburg Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360: 1721, 1979). En un ejemplo, las aminas Gly-A1 y Lys-B29 pueden protegerse selectivamente con grupos *terc*-butoxicarbonilo (BOC) que después se retiran tras la conjugación mediante incubación durante una hora a 4 °C en una solución de ácido trifluoroacético al 90 % (TFA)/anisol al 10 %. En una realización, un polvo seco de insulina se disuelve en DMSO anhidro, seguido de un exceso de trietilamina. A esta solución, se añaden lentamente aproximadamente dos equivalentes de solución de dicarbonato de di-*terc*-butilo en THF y la solución se deja mezclar durante 30-60 minutos. Tras la reacción, la solución en bruto se vierte en un exceso de acetona, seguido de la adición gota a gota de HCl diluido para precipitar la insulina que reaccionó. El material precipitado se centrifuga, se lava con acetona y se seca por completo al vacío. El producto protegido con di-BOC deseado puede separarse de la insulina sin reaccionar, los isómeros de di-BOC sin reaccionar y los subproductos de mono-BOC y tri-BOC usando HPLC preparativa de fase inversa o cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, véase Tsai et al., J. Pharm. Sci. 86: 1264-1268, 1997). En el caso de HPLC de fase inversa, una solución del producto en bruto en agua al 70 %/acetonitrilo al 30 % que contiene 0,1 % de TFA se carga en una

columna C8 y se eluye con un gradiente ascendente de acetonitrilo. El pico de di-BOC deseado se recoge, se somete a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofiliza para obtener el producto puro.

LRP^B y LRP^D (conjugación no covalente)

Alguien con una habilidad habitual apreciará que puede usarse una diversidad de químicas de conjugación para conjugar no covalentemente un X con un T y/o W con un T (en general "componentes"). Dichas técnicas son ampliamente conocidas en la materia y más adelante se discuten técnicas a modo de ejemplo. En ciertas realizaciones, la constante de disociación (K_d) de la unión no covalente en suero humano es inferior a 1 pmol/l. Por ejemplo, un componente puede enlazarse de un modo no covalente a un armazón de conjugado a través de un par de ligando-receptor no covalente como es bien sabido en la técnica (por ejemplo, sin limitación, un par basado en biotina-avidina). En dicha realización, un miembro del par ligando-receptor está enlazado covalentemente al componente, mientras que el otro miembro del par está enlazado covalentemente al armazón de conjugado. Cuando se combinan el componente y el armazón de conjugado, la interacción fuerte no covalente entre el ligando y su receptor provoca que el componente no se enlace covalentemente al armazón de conjugado. Los pares ligando/receptor típicos incluyen pares de proteína/co-factor y enzima/sustrato. Además del par biotina/avidina usado habitualmente, estos incluyen, sin limitación, pares de biotina/estreptavidina, digoxigenina/anti-digoxigenina, FK506/proteína de unión a FK506 (FKBP), rapamicina/FKBP, ciclofilina/ciclosporina y glutatión/glutatión transferasa. Los expertos en la técnica reconocerían otros pares adecuados de ligando/receptor, por ejemplo, anticuerpos monoclonales emparejados con un marcador de epítopo, tal como, sin limitación, glutatión-S-transferasa (GST), c-myc, FLAG® y además los que se describen en Kessler pp. 105-152 de "Advances in Mutagenesis" Ed. por Kessler, Springer-Verlag, 1990; "Affinity Chromatography: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)" Ed. por Pascal Baillon, Humana Press, 2000; e "Immobilized Affinity Ligand Techniques" de Hermanson et al., Academic Press, 1992.

k y q

k es un número entero de 1 a 12, ambos incluidos. En ciertas realizaciones, k = 1 a 6, por ejemplo, 1, 2 o 3. q es un número entero de 1 a 4, ambos incluidos, y define el número de grupos D que están enlazados al grupo [A] central. En ciertas realizaciones, q = 1. En algunas realizaciones, q = 2. En ciertas realizaciones, k + q es un número entero de 2 a 6, ambos incluidos. En ciertas realizaciones, k + q = 2, 3 o 4.

p y m

Cada vez que aparece p es independientemente un número entero de 1 a 5, ambos incluidos. En ciertas realizaciones, cada vez que aparece p es igual. En ciertas realizaciones, p = 1, 2 o 3. En ciertas realizaciones, p = 1.

Cada vez que aparece m es independientemente un número entero de 1 a 5, ambos incluidos. En ciertas realizaciones, cada vez que aparece m es igual. En ciertas realizaciones, m = 1, 2 o 3. En ciertas realizaciones, m = 1.

n y v

Cada vez que aparece n es independientemente un número entero de 0 a 5, ambos incluidos, con la condición de que dentro de cada rama de k, al menos una aparición de n sea ≥ 1. Las ramificaciones dentro de una rama de k dada se denominan en el presente documento ramificaciones de n.

En ciertas realizaciones, cada vez que aparece [A] en un resto entre paréntesis de p, está sustituido con un número de restos entre paréntesis de n correspondiente al valor de n ≥ 1, por ejemplo, véase la fórmula (Ia) anterior. En algunas de dichas realizaciones, cada vez que aparece n en el conjugado es igual. En algunas de estas realizaciones, n = 1 o 2.

En otras realizaciones, solo las apariciones terminales de [A] en un resto entre paréntesis de p están sustituidas con un número de restos entre paréntesis de n correspondiente al valor de ≥ 1, por ejemplo, véase la fórmula (Ib) anterior. En ciertas realizaciones, cada rama de k incluye solo una aparición de n ≥ 1 (es decir, todas las otras apariciones de n = 0). En algunas de dichas realizaciones, cada vez que aparece n en el conjugado es igual. En algunas de estas realizaciones, n = 1 o 2.

Cada vez que aparece v es independientemente un número entero de 0 a 5, ambos incluidos, con la condición de que dentro de cada rama de k, al menos una aparición de v sea ≥ 1.

En ciertas realizaciones, cada vez que aparece [A] en un resto entre paréntesis de m, está sustituido con un

número de restos B correspondiente al valor de v ≥ 1, por ejemplo, véase la fórmula (Ic) anterior. En algunas de dichas realizaciones, cada vez que aparece v en el conjugado es igual. En algunas de estas realizaciones, v = 1 o 2.

En otras realizaciones, solo las apariciones terminales de [A] en un resto entre paréntesis de m están sustituidas con un número de restos B correspondiente al valor de v ≥ 1, por ejemplo, véase la fórmula (Id) anterior. En ciertas realizaciones, cada rama de k incluye solo una aparición de v ≥ 1 (es decir, todas las otras apariciones de v = 0). En algunas de dichas realizaciones, cada vez que aparece v en el conjugado es igual. En algunas de estas realizaciones, v = 1 o 2. En ciertas realizaciones, cada rama de n incluye al menos una aparición de v ≥ 1. En una determinada realización, cada rama de n incluye solo una aparición de v ≥ 1 (es decir, todas las otras apariciones de v = 0). En algunas de dichas realizaciones, cada vez que aparece v en el conjugado es igual. En algunas de estas realizaciones, v = 1 o 2.

j

j de fórmula (II) es un número entero de 1 a 4, ambos incluidos, y define el número de conjugaciones al grupo D. En ciertas realizaciones, j = 1. En ciertas realizaciones, j = 2. En algunas realizaciones, j = 3. En otras realizaciones, j = 4.

Carga de fármaco

En general, la cantidad de fármaco que se carga en un conjugado puede controlarse ajustando el peso molecular del armazón de conjugado y/o el nivel de activación química (es decir, cuando se añaden grupos pendientes al armazón). En diversas realizaciones, el nivel de carga de fármaco puede estar en el intervalo del 5 al 99 % p/p del fármaco con respecto al conjugado. En diversas realizaciones, pueden usarse niveles de carga dentro de un intervalo más estrecho del 50 al 99 %, por ejemplo, en el intervalo del 80 al 99 %.

Otros

Debe apreciarse que aunque las secciones anteriores describen componentes de los conjugados (por ejemplo, ligando, fármaco, armazón) bajo encabezados separados, la presente divulgación abarca conjugados que están compuestos de cualquiera y todos los ligandos, fármacos y armazones desvelados.

Intermedios para preparar conjugados

En un aspecto, la presente divulgación proporciona reactivos para preparar conjugados. Por lo tanto, en diversas realizaciones, se proporciona un compuesto de fórmula general (I), en la que:

cada uno de [A], T, D, k, q, k + q, p, n, m y v se define como se ha descrito anteriormente y en el presente documento;
-B es -T-$L^{B'}$; y
cada vez que aparece $L^{B'}$ es independientemente hidrógeno, un resto que contiene alquino, un resto que contiene azida o un resto reactivo de carbonilo, reactivo de tiol, reactivo de amina o reactivo de hidroxilo opcionalmente sustituido.

En otras realizaciones, se proporciona un compuesto de fórmula general (I), en la que:

cada uno de [A], T, B, k, q, k + q, p, n, m y v se define como se ha descrito anteriormente y en el presente documento:
-D es -T-$L^{D'}$; y
cada vez que aparece $L^{D'}$ es independientemente hidrógeno, un resto que contiene alquino, un resto que contiene azida o un resto reactivo de carbonilo, reactivo de tiol, reactivo de amina o reactivo de hidroxilo opcionalmente sustituido.

Métodos para preparar conjugados

Como se describe en los ejemplos, los inventores han ilustrado métodos para preparar los conjugados mencionados anteriormente usando insulina como fármaco a modo de ejemplo y aminoetilglucosa (AEG), aminoetilmanosa (AEM), aminoetilbimanosa (AEBM), aminoetiltrimanosa (AETM), aminoetilfucosa (AEF) y/o β-aminoetil-N-acetilglucosamina (AEGA) como ligandos a modo de ejemplo. Sin limitación, pueden prepararse conjugados con dos ligandos por sitio de conjugación y con distancias cortas entre todos los componentes del armazón usando tris(hidroximetil)aminometano (Tris), aminotriacetato de tris-succinimidilo (TSAT), 1,3,5-bencenotricarboxilato de tris-succinimidilo (TSB) y benceno-1,3,5-tricarboxi-(NHS-éster N-4-butírico)amida (TSB-C4) como armazones de conjugado. Si se desea más espacio entre los componentes del armazón, entonces pueden usarse (6-

aminocaproil)aminotriacetato de succinimidilo (TSAT-C6), (6-amino(PEO-6))aminotriacetato de succinimidilo (TSAT-PEO-6), benceno-1,3, 5-tricarboxi-(NHS éster N-6-aminocaproico)amida (TSB-C6) y benceno-1,3,5-tricarboxi-(NHS éster N-10-aminodecanoico)amida (TSB-C10). La química del brazo del espaciador TSAT-C6 confiere un carácter más hidrófobo al conjugado en comparación con TSAT-PEO-6.

Por ejemplo, con propósitos de ilustración, en una realización, tanto el ligando (por ejemplo, AEG, AEM, AEMB y AETM) como la insulina pueden hacerse reaccionar con un armazón de TSAT-C6 a través de los ésteres activados terminales para producir conjugados de insulina-TSAT-C6-AEG-2, insulina-TSAT-C6-AEM-2, insulina-TSAT-C6-AEMB-2 e insulina-TSAT-C6-AETM-2. Los diversos ligandos se sintetizan de antemano según se discute en los ejemplos. En algunas realizaciones, los grupos amino A1 y B29 de insulina están protegidos con BOC como se describe en los ejemplos, de modo que cada insulina puede reaccionar únicamente en el grupo Phe-B1 α-amino. En algunas realizaciones, los grupos amino B1 y B29 de insulina están protegidos con BOC como se describe en los ejemplos, de modo que cada insulina puede reaccionar únicamente en el grupo Gly-A1 α-amino. Aproximadamente un equivalente de BOC-insulina como una solución 40-50 mg/ml en DMSO se añade a temperatura ambiente a una solución 50 mg/ml de TSAT-C6 en DMSO que contiene exceso de trietilamina y se deja reaccionar durante aproximadamente una hora. A continuación, se añade un exceso de AEG, AEM, AEBM y/o AETM (2-10 equivalentes) en forma de una solución 100 mg/ml en DMSO y se deja reaccionar durante 2 horas más. Tras la reacción, la solución de DMSO se superdiluye 10x en un tampón salino de pH 5, después de lo cual el pH se ajusta a 8,0 y la solución se pasa a través de una columna Biogel P2 para retirar los reactivos de bajo peso molecular y las sales. El material que se eluye en la fracción hueca se concentra usando un aparato de ultrafiltración 3K, después de lo cual se inyecta en una columna de HPLC de fase inversa de escala preparativa (C8, fase móvil acetonitrilo/agua que contiene 0,1 % de TFA) para purificar el producto deseado de la BOC2-insulina sin reaccionar. El pico de elusión deseado se recoge, se combina y se evapora por rotación para retirar acetonitrilo, seguido de liofilización para obtener un polvo seco. Finalmente, los grupos protectores BOC se retiran disolviendo el polvo liofilizado en TFA al 90 %/anisol al 10 % durante una hora a 4 °C, seguido de 10x superdisolución en un tampón HEPES de pH 8,2 que contiene NaCl 0,150 M. El pH se ajusta a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual el material se pasa a través de una columna Biogel P2 para retirar anisol, BOC y otras sales contaminantes. Después, la solución de conjugado acuosa, purificada y desprotegida se concentra al nivel deseado y se almacena a 4 °C hasta que se necesita.

En otro aspecto, la reacción puede tener lugar en el grupo B29 epsilon-amino usando insulina no protegida en tampón de carbonato, puesto que en estas condiciones, el grupo B29 amino es el más reactivo de los tres grupos amino presentes en la insulina de tipo silvestre. En una síntesis a modo de ejemplo, el armazón que contiene ésteres con el extremo N activado se disuelve a 60 mM en DMSO anhidro, seguido de la adición de trietilamina (TEA). La solución se agita rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. En paralelo, se prepara una solución 448 mM de ligando en un volumen adecuado de DMSO anhidro. Una vez disuelta, se añade gota a gota suficiente solución de ligando durante el transcurso de diez minutos para proporcionar un número de equivalentes de reactivo igual a 1,5 veces el número de grupos éster activados en el armazón, N, menos uno. Por ejemplo, si hay N=3 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añaden (3x(3-1)x60 mM/370 mM) = 0,973 ml de solución de ligando. Si hay N=4 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añaden (3x(4-1)x60 mM/370 mM)=1,46 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de añadir la solución de ligando, la solución se agita durante una hora a temperatura ambiente.

Después, el fármaco que porta amina se disuelve por separado a 17,2 mM en tampón de carbonato sódico (0,1 M, pH 11) y posteriormente el pH se ajusta a 10,8 con hidróxido sódico 1,0 N. Una vez disuelta, toda la solución de armazón/DMSO/ligando/TEA se añade gota a gota durante el transcurso de 75 minutos a la solución de fármaco/tampón carbonato. Durante la adición, el pH de la mezcla resultante se ajusta cada 5 minutos a 10,8, si es necesario, usando HCl diluido o NaOH. La solución se deja en agitación durante 15 minutos más después de la adición gota a gota para asegurar una reacción completa.

Después, la solución resultante se superdiluye 10x en una solución salina tamponada con HEPES 20 mM de pH 5,0 que contiene NaCl 0,150 M, seguido de ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8,0. La solución acuosa se purifica en primer lugar por exclusión de tamaño usando una fase sólida adecuada para la separación deseada de los materiales conjugados y no conjugados. Después, la solución que pasa a través del volumen hueco de la columna se concentra usando una membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada a aproximadamente 40 ml. Esta solución se purifica adicionalmente para obtener el producto deseado usando HPLC preparativa de fase inversa. Una vez recogida, la solución se somete a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofiliza para obtener un conjugado puro.

Además, en las condiciones de tampón de carbonato, el grupo amino de A1 es el segundo grupo más reactivo de la insulina de tipo silvestre. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se sintetizan conjugados de insulina disustituidos en A1,B29 usando las condiciones descritas anteriormente con aproximadamente diez veces la cantidad de armazón de éster activo multivalente y ligando por molécula de insulina en comparación con la síntesis de conjugado de insulina monosustituido en B29.

En otro aspecto, se sintetizan conjugados de insulina monosustituidos en B29 usando secuencias de aminoácidos

con el extremo N protegido, utilizando métodos similares a los indicados en la Patente de EE.UU. N.º 7.402.565. Específicamente, las secuencias del extremo N de los péptidos se manipulan en la cadena A y la cadena B de insulina de modo que las secuencias de aminoácidos protectoras contengan Arg^{A0} y Arg^{B0} para dar un intermedio de insulina. La conjugación tiene lugar en Lys^{B29} en el intermedio de insulina, mientras que los términos N se protegen de los productos secundarios de la conjugación. El intermedio de insulina conjugado se trata con tripsina para escindir las secuencias de aminoácidos con el extremo N protegido para dar un conjugado de insulina en el que únicamente se conjuga Lys^{B29}. En algunas realizaciones, el intermedio de insulina se obtiene a partir de un precursor de insulina de cadena individual como se describe en la Patente de EE.UU N.º 7.402.565. En algunas realizaciones, el intermedio de insulina es un mutante que contiene un sitio de conjugación distinto de Lys^{B29} y se realiza una síntesis análoga a la descrita para Lys^{B29}.

Se apreciará que estos procedimientos a modo de ejemplo pueden usarse para producir otros conjugados con diferentes ligandos y fármacos, diferentes químicas de conjugación, diferentes separaciones entre componentes del armazón y/o diferentes valencias, reemplazando el armazón de TSAT-C6 por un armazón diferente como se describe a continuación.

Por ejemplo, si se requiere aún más distancia entre los componentes del armazón y/o se requiera una carga conservada en el sitio de conjugación, entonces puede conjugarse un dietil acetal que porta amina adecuadamente dimensionado (por ejemplo, aminopropionaldehído dietil acetal (APDA) o aminobutiraldehído dietil acetal (ABDA)) a uno de los grupos reactivos en los armazones listados en el presente documento, seguido de reacción completa de los grupos reactivos restantes con el ligando de interés (por ejemplo, AEM, AEBM o AETM). Después, un grupo aldehído reactivo puede revelarse desde el dietil acetal en condiciones ácidas, seguido de una aminación reductora con insulina para completar la etapa de conjugación de fármaco, después pueden emplearse ABDA-TSAT, ABDA-LCTSAT, etc.

En otro ejemplo más, puede usarse tetraquis-(N-succinimidil carboxipropil)pentaeritritol (TSPE) para unir tres ligandos por sitio de conjugación para aumentar la multivalencia. Los expertos en la materia también apreciarán que cualquiera de las enseñanzas anteriores puede usarse para producir conjugados hiperramificados (por ejemplo, de tipo dendrímero) con valencias incluso de orden superior. Por ejemplo, Rockendorf y Lindhorst proporcionan una revisión exhaustiva de los enfoques actuales para producir estructuras hiperramificadas en Topics in Current Chemistry. 217: 202-238, 2001.

Además, los ligandos que ya contienen un grado predeterminado de multivalencia pueden hacerse reaccionar de nuevo de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente para producir órdenes incluso superiores de multiplicidad de ligando. Por ejemplo, puede prepararse una molécula divalente AEM-2, AEBM-2 o AETM-2 que contiene una amina reactiva terminal conjugando dos de cada uno de los ligandos a un armazón adecuado al que también está conjugada una amina reactiva. Puede prepararse una molécula trivalente AEM-3, AEBM-3 o AETM-3 que contiene una amina reactiva terminal conjugando tres de cada uno de los ligandos a un armazón adecuado al que también está conjugada una amina reactiva. Los sacáridos divalentes de NH_2 pueden hacerse reaccionar con los mismos armazones descritos anteriormente para producir conjugados de fármaco con 4 y 6 ligandos por molécula de fármaco. Los sacáridos trivalentes de NH_2 pueden hacerse reaccionar con los mismos armazones descritos anteriormente para producir conjugados de fármaco con 6 y 9 ligandos por molécula de fármaco.

En todos los casos, debe reconocerse que una mezcla de ligandos diferentes puede conjugarse con el mismo fármaco a través de un armazón multivalente ajustando la química del armazón, la valencia y la estequiometría de ligando:armazón. Por ejemplo, la Insulina-AEM-1-AEBM-1, la Insulina-AEBM-1-AETM-1, la Insulina-AEM-2-AETM-2 y la Insulina-AEM-1-AETM-2 pueden sintetizarse todas de acuerdo con este método de ligando mixto.

En algunos casos, puede ser deseable conjugar el ligando al armazón a través de un medio diferente del fármaco. Por ejemplo, un armazón funcionalizado de maleimida divalente/éster activado monovalente (por ejemplo, benzoato de succinimidil-3,5-dimaleimidofenilo (SDMB)) puede usarse para conjugar dos ligandos funcionalizados de sulfhidrilo y un fármaco funcionalizado con amina en etapas separadas. Por ejemplo, puede conjugarse insulina u otro fármaco que contenga amina a la porción de éster activado del armazón usando métodos descritos en el presente documento. En un etapa separada, el sacárido de aminoetilo (AEM, AEBM, AETM) puede convertirse en un ligando que porta sulfhidrilo terminal por reacción con 4-iminotiolano. Finalmente, el conjugado de armazón-di-maleimida-insulina puede mezclarse con un exceso de sacárido funcionalizado con sulfhidrilo para producir el conjugado de divalente-ligando-insulina resultante.

Formulaciones de liberación sostenida

Como se analiza en los ejemplos, en determinadas realizaciones puede ser ventajoso administrar un conjugado de una manera sostenida (es decir, en una forma que presenta un perfil de absorción que es más sostenido que la insulina humana recombinante soluble). Esto proporcionará un nivel sostenido de conjugado que puede responder a las fluctuaciones en la glucosa en una escala temporal que está más estrechamente relacionada con la escala temporal de fluctuación de la glucosa típica (es decir, horas más bien que minutos). En determinadas realizaciones, la formulación de liberación sostenida puede presentar un orden cero de liberación del conjugado cuando se

administra a un mamífero en condiciones no hiperglucémicas (es decir, condiciones en ayunas).

Se apreciará que se puede usar cualquier formulación que proporcione un perfil de absorción sostenido. En determinadas realizaciones, esto puede conseguirse combinando el conjugado con otros ingredientes que ralenticen sus propiedades de liberación en la circulación sistémica.
Por ejemplo, se pueden usar formulaciones PZI (protamina cinc insulina) para este fin. Como se describe en los ejemplos, los inventores han descubierto que, en determinadas realizaciones, el perfil de absorción y la estabilidad de las formulaciones PZI preparadas con conjugados de la presente divulgación son sensibles a las cantidades absolutas y relativas de protamina y cinc incluidas en la formulación. Por ejemplo, mientras que las formulaciones de insulina PZI y NPH comerciales (protamina Hagedorn neutra) requieren solo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2 mg de protamina/mg de insulina, algunas preparaciones conjugadas de PZI requerían aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg de protamina/mg de conjugado a fin de sostener eficazmente el perfil de absorción. Además, mientras que las preparaciones de insulina de protamina comercial contienen aproximadamente 0,006 mg de cinc/mg de insulina, los inventores han encontrado que el aumento de la concentración de cinc junto con la concentración de protamina pueden, en determinadas realizaciones, conducir a formulaciones fácilmente dispersables más estables. En algunos casos, el contenido de cinc está en el intervalo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mg de cinc/mg de conjugado. Además, Los inventores han descubierto también que, en determinadas realizaciones, los conjugados de insulina sustituidos en el grupo B1-amina requieren más protamina y cinc para sostener eficazmente el perfil de liberación frente a un conjugado de insulina sustituido en el grupo B29-amina. La presente divulgación abarca formas amorfas y cristalinas de estas formulaciones PZI.

Por lo tanto, en determinadas realizaciones, una formulación de la presente divulgación incluye desde aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10 mg de protamina/mg de conjugado. Por ejemplo, desde aproximadamente 0,2 a aproximadamente 10 mg de protamina/mg de conjugado, por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg de protamina/mg de conjugado.

En determinadas realizaciones, una formulación de la presente divulgación incluye desde aproximadamente 0,006 a aproximadamente 0,5 mg de cinc/mg de conjugado. Por ejemplo, desde aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mg de cinc/mg de conjugado, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,25 mg de cinc/mg de conjugado.

En determinadas realizaciones, una formulación de la presente divulgación incluye protamina y cinc en una relación (p/p) en el intervalo de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 5:1, por ejemplo, de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 5:1, por ejemplo, aproximadamente 40:1 a aproximadamente 10:1. En determinadas realizaciones, una formulación PZI de la presente divulgación incluye protamina y cinc en una relación (p/p) en el intervalo de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 5:1, por ejemplo, aproximadamente 20:1 a aproximadamente 10:1, aproximadamente 20:1 a aproximadamente 15:1, aproximadamente 15:1 a aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1 a aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1 a aproximadamente 15:1.

Los ejemplos describen también los beneficios de incluir uno o más de los siguientes componentes en una formulación PZI: un conservante antimicrobiano, un agente isotónico, y/o una molécula de insulina sin conjugar.

En determinadas realizaciones, una formulación de la presente divulgación incluye un conservante antimicrobiano (por ejemplo, mcresol, fenol, metilparabeno, o propilparabeno). En determinadas realizaciones, el conservante antimicrobiano es m-cresol. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, una formulación puede incluir de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.0 % v/v de m-cresol. Por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 % v/v de m-cresol, por ejemplo, aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,35 % v/v de m-cresol.

En determinadas realizaciones, la formulación de la presente divulgación incluye un poliol como agente isotónico (por ejemplo, manitol, propilenglicol o glicerol). En determinadas realizaciones, el agente isotónico es glicerol. En determinadas realizaciones, el agente isotónico es una sal, por ejemplo, NaCl. Por ejemplo, la formulación puede comprender de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 M de NaCl, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,25 M de NaCl, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,2 M de NaCl.

En determinadas realizaciones, una formulación de la presente divulgación incluye una cantidad de una molécula de insulina sin conjugar. En determinadas realizaciones, la formulación incluye una relación molar de una molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina sin conjugar en el intervalo de aproximadamente 100:1 a 1:1, por ejemplo, aproximadamente 50:1 a 2:1 o aproximadamente 25:1 a 2:1.

La presente divulgación abarca también el uso sostenido de formulaciones de liberación convencionales (denominadas también extendidas) que son bien conocidas en la técnica de formulación de moléculas pequeñas (por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995). La presente divulgación abarca también el uso de dispositivos que están basados en bombas de difusión impedida para

administrar un conjugado sobre una base gradual. En determinadas realizaciones, una formulación de acción prolongada puede (de forma adicional o alternativa) proporcionarse utilizando una molécula de insulina modificada. Por ejemplo, se podría utilizar insulina glargina (LANTUS®) o insulina detemir (LEVEMIR®) en vez de insulina humana natural en la preparación del conjugado. La insulina glargina es un análogo de insulina ilustrativa de acción prolongada en la que Asp-A21 se ha sustituido por glicina y se han añadido dos argininas al extremo C de la cadena B. El efecto de estos cambios es desplazar el punto isoeléctrico, produciendo una solución que es completamente soluble a pH 4. la insulina detemir es otro análogo de insulina de acción prolongada en el que se ha eliminado ThrB30, y se ha unido una cadena de ácido graso C14 a LysB29.

Usos de conjugados

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de utilizar conjugados. En general, los conjugados se pueden usar para proporcionar de forma controlable un fármaco bioactivo en respuesta a un sacárido (por ejemplo, glucosa o un sacárido exógeno tal como manosa, alfa-metil manosa, L-fucosa, etc., como se describe en el presente documento). La divulgación abarca tratar una enfermedad o dolencia administrando un conjugado de la presente divulgación. Aunque los conjugados se pueden usar para tratar cualquier paciente (por ejemplo, perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, ratones, etc.), se usan más preferentemente en el tratamiento de seres humanos. Se puede administrar un conjugado a un paciente mediante cualquier ruta. En general, la ruta de administración más adecuada dependerá de diversos factores, incluyendo la naturaleza de la enfermedad o la dolencia que se está tratando, la naturaleza del fármaco, la dolencia del paciente, etc. En general, La presente divulgación abarca la administración oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, subcutánea, intraventricular, transdérmica, rectal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, pomadas, o gotas), bucal, o como un pulverizador o aerosol oral o nasal. Se pueden encontrar consideraciones generales en la formulación y fabricación de las composiciones farmacéuticas para estas diferentes rutas, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. En diversas realizaciones, El conjugado puede administrarse por vía subcutánea, por ejemplo, mediante inyección. El conjugado puede disolverse en un transportador para facilitar la administración. Por ejemplo, El transportador puede ser una solución acuosa que incluye, aunque no de forma limitativa, agua estéril, solución salina o solución salina tamponada.

En general, se administrará una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco en la forma de un conjugado. Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un fármaco se entiende una cantidad suficiente del fármaco para tratar la enfermedad o dolencia en una relación beneficio/riesgo razonable, que implica un equilibrio de la eficacia y la toxicidad del fármaco. En general, La eficacia y la toxicidad terapéutica puede determinarse mediante procedimientos farmacológicos convencionales en cultivos celulares o con animales experimentales, por ejemplo, calculando la DE_{50} (la dosis que es terapéuticamente eficaz en el 50 % de los sujetos tratados) y la DL_{50} (la dosis que es letal para el 50 % de los sujetos tratados). La DE_{50}/DL_{50} representa el índice terapéutico del fármaco. aunque se prefieren en fármacos generales que tienen un gran índice terapéutico, como es bien sabido en la técnica, un índice terapéutico más pequeño puede ser aceptable en el caso de una enfermedad o dolencia grave, particularmente en la ausencia de opciones terapéuticas alternativas. La selección en última instancia de un intervalo adecuado de dosis para la administración a seres humanos se determina en el curso de ensayos clínicos.

En diversas realizaciones, el fármaco es insulina y la dosis diaria promedio de insulina está en el intervalo de 10 a 200 U, por ejemplo, 25 a 100 U (donde 1 Unidad de insulina es ~ 0,04 mg). En determinadas realizaciones, una cantidad de conjugado con estas dosis de insulina se administra sobre una base diaria. En determinadas realizaciones, una cantidad de conjugado con 5 a 10 veces estas dosis de insulina se administra sobre una base semanal. En determinadas realizaciones, una cantidad de conjugado con 10 a 20 veces estas dosis de insulina se administra sobre una base quincenal. En determinadas realizaciones, una cantidad de conjugado con 20 a 40 veces estas dosis de insulina se administra sobre una base mensual. Los expertos en la materia reconocerán que esta misma estrategia puede extrapolarse a otros fármacos homologados con intervalos de dosis conocidos, por ejemplo, cualquiera de los sensibilizantes de insulina homologados y los secretagogos de insulina descritos en el presente documento. Normalmente, la dosis del fármaco conjugado será mayor que la dosis normal del fármaco sin conjugar.

En determinadas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación puede utilizarse para tratar la hiperglucemia en un paciente (por ejemplo, un paciente mamífero). En determinadas realizaciones, el paciente es diabético. Sin embargo, los presentes métodos no se limitan al tratamiento de pacientes diabéticos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se puede usar un conjugado para tratar la hiperglucemia en un paciente con una infección asociada con un control glucémico deteriorado. En determinadas realizaciones, se puede usar un conjugado para tratar la diabetes.

En determinadas realizaciones, cuando un conjugado o formulación de la presente divulgación (con una molécula de insulina como el fármaco) se administra a un paciente (por ejemplo, un paciente mamífero) induce una menor hipoglucemia que una versión sin conjugar de la molécula de insulina. En determinadas realizaciones, una formulación de la presente divulgación (con un conjugado que incluye una molécula de insulina como el fármaco) induce un valor de HbA1c menor en un paciente (por ejemplo, un paciente mamífero) que una formulación que comprende una versión sin conjugar de la molécula de insulina. En determinadas realizaciones, la formulación conduce a un valor de HbA1c que es al menos un 10 % menor (por ejemplo, al menos un 20 % menor, al menos un

30 % menor, al menos un 40 % menor, al menos un 50 % menor) que una formulación que comprende una versión conjugada de la molécula de insulina. En determinadas realizaciones, la formulación conduce a un valor de HbA1c menor del 7 %, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 %. En determinadas realizaciones, una formulación que comprende una versión conjugada de la molécula de insulina conduce a un valor HbA1c que excede el 7 %, por ejemplo, aproximadamente 8 a aproximadamente 12 %.

Debe entenderse que la utilización diaria total de un fármaco para cualquier paciente dado se decidirá por el médico a cargo del tratamiento dentro del alcance de un buen criterio médico. La cantidad terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente concreto dependerá de varios factores, incluyendo la enfermedad o la dolencia que se está tratando; la actividad del fármaco específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el género y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración y la tasa de excreción del fármaco específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con el fármaco específico empleado; y factores similares bien conocidos en la técnica médica. En diversas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación puede administrarse en más de una ocasión. Por ejemplo, la presente divulgación abarca específicamente los métodos en los que se administra un conjugado mediante la inyección subcutánea a un paciente en un programa continuo (por ejemplo, una vez al día, una vez cada dos días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, etc.).

En diversas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación puede administrarse a un paciente que está recibiendo al menos una terapia adicional. En diversas realizaciones, se pretende que la al menos una terapia adicional trate la misma enfermedad o trastorno que el conjugado administrado. En diversas realizaciones, se pretende que la al menos una terapia adicional trate un efecto secundario del fármaco primario. Las dos o más terapias pueden administrarse en los mismos, marcos temporales solapantes o no solapantes siempre que exista un periodo cuando el paciente esté recibiendo ventajas de ambas terapias. Las dos o más terapias pueden administrarse en el mismo o en diferentes programas siempre que exista un periodo cuando el paciente esté recibiendo ventajas de ambas terapias. Las dos o más terapias pueden administrarse en la misma o diferentes formulaciones siempre que exista un periodo cuando el paciente esté recibiendo ventajas de ambas terapias. En determinadas realizaciones, un único conjugado de la presente divulgación puede incluir más de un fármaco para tratar la misma enfermedad o trastorno. En determinadas realizaciones, se pueden administrar dos o más conjugados separados de la presente divulgación (como una mezcla o por separado) que incluyen diferentes fármacos para tratar la misma enfermedad o trastorno. En determinadas realizaciones, se puede premezclar un fármaco secundario sin conjugar con un conjugado de la presente divulgación (es decir, un fármaco que se mezcla simplemente con la formulación del conjugado y no se une covalentemente al conjugado). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se puede usar cualquiera de estas estrategias para administrar más de un fármaco antidiabético a un sujeto. Determinadas realizaciones ilustrativas de esta estrategia se describen con más detalle a continuación en el contexto de las terapias relacionadas con insulina; sin embargo, se apreciará a partir de lo anterior que otras terapias se beneficiarán de dichas estrategias de combinación.

Los sensibilizantes de insulina (por ejemplo, biguanidas tales como metformina, glitazonas) actúan aumentando la respuesta de un paciente a una cantidad de insulina dada. Un paciente que recibe un sensibilizante de insulina requerirá por tanto una dosis menor de un conjugado de insulina de la presente divulgación de lo que lo haría un paciente idéntico. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, se puede administrar un conjugado de insulina a un paciente que está también siendo tratado con un sensibilizante de insulina. En diversas realizaciones, el conjugado de la presente divulgación puede administrarse en hasta un 75 % de la dosis normal requerida en ausencia del sensibilizante de insulina. En diversas realizaciones, se puede administrar hasta 50, 40, 30 o 20 % de la dosis normal.

La resistencia a la insulina es un trastorno en el que cantidades normales de insulina son inadecuadas para producir una respuesta normal a la insulina. Por ejemplo, los pacientes resistentes a la insulina pueden requerir altas dosis de insulina a fin de superar su resistencia y proporcionar un efecto de disminución de la glucosa suficiente. En estos casos, las dosis de insulina que podrían normalmente inducir hipoglucemia en pacientes menos resistentes ni siquiera ejercen un efecto reductor de la glucosa en pacientes muy resistentes. De manera similar, Los conjugados de la presente divulgación son solo eficaces para esta subclase de pacientes cuando proporcionan altos niveles de insulina bioactiva en un marco temporal adecuado. En determinadas realizaciones, el tratamiento de esta subclase de pacientes puede estar facilitado combinando las dos estrategias. Por tanto, en determinadas realizaciones, se usa una terapia basada en insulina tradicional para proporcional un nivel inicial de insulina y se administra un conjugado de la presente invención para proporcionar un suplemento controlado de insulina bioactiva cuando el paciente lo necesita. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, se pueden administrar conjugados de insulina a un paciente que está siendo tratado con insulina. En diversas realizaciones, la insulina puede administrarse hasta un 75 % de la dosis normal requerida en ausencia de un conjugado de la presente divulgación. En diversas realizaciones, se puede administrar hasta 50, 40, 30 o 20 % de la dosis normal. Se apreciará que se puede usar también esta estrategia combinada con pacientes resistentes a la insulina que están recibiendo un secretagogo de insulina (por ejemplo, una sulfonilurea, GLP-1, exendina-4, etc.) y/o un sensibilizante de insulina (por ejemplo, una biguanida tal como metformina, una glitazona).

Activador exógeno

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos, conjugados y composiciones que se describen en el presente documento no están limitados a los conjugados sensibles a glucosa. Como se ha demostrado en los ejemplos, algunos conjugados sensibles a glucosa ilustrativos eran también sensibles a sacáridos exógenos tales como alfa-metil manosa y L-fucosa. Se apreciará por tanto que en determinadas realizaciones se puede activar un conjugado mediante la administración exógena de un sacárido diferente de glucosa tal como la alfa metil manosa y L-fucosa o cualquier otro sacárido que pueda alterar las propiedades PK o PD del conjugado.

Una vez que se ha administrado el conjugado como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, como una formulación de liberación sostenida) puede activarse mediante la administración de un sacárido exógeno adecuado. En una determinada realización, se administra una cantidad activadora del sacárido exógeno. Como se usa en el presente documento, una "cantidad activadora" de un sacárido exógeno es una cantidad suficiente para producir un cambio en al menos una propiedad PK y/o PD del conjugado (por ejemplo, $C_{máx}$, el ABC, la semivida, etc., como se ha descrito anteriormente). Debe entenderse que cualquiera de los métodos anteriormente mencionados de administración del conjugado se aplican igualmente al sacárido exógeno. Debe entenderse también que los métodos de administración del conjugado y el sacárido exógeno pueden ser iguales o diferentes. En diversas realizaciones, los métodos de administración son diferentes (por ejemplo, a fines ilustrativos, se puede administrar el conjugado mediante inyección subcutánea sobre una base semanal mientras que el sacárido exógeno se administra por vía oral sobre una base diaria). La administración oral de un sacárido exógeno es de un valor particular debido a que facilita el cumplimiento del paciente. En general, se apreciará que las propiedades PK y PD del conjugado estarán relacionadas con el perfil PK del sacárido exógeno. Por lo tanto, se pueden adaptar las propiedades PK y PD del conjugado controlando el perfil PK del sacárido exógeno. Como es bien sabido en la técnica, se puede adaptar el perfil PK del sacárido exógeno basándose en la dosis, la ruta, la frecuencia y la formulación usada. Por ejemplo, si se desea una activación corta e intensa del conjugado, entonces, se puede usar una formulación oral de liberación inmediata. En cambio, si se desea una activación más larga, menos intensa, del conjugado, entonces se puede usar una formulación oral de liberación prolongada. Se pueden encontrar consideraciones generales en la formulación y la fabricación de formulaciones inmediatas y de liberación prolongada, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

Se apreciará también que la frecuencia de administración relativa de un conjugado de la presente divulgación y un sacárido exógeno pueden ser iguales o diferentes. En determinadas realizaciones, el sacárido exógeno se administra más frecuentemente que el conjugado. Por ejemplo, en determinada realización, se puede administrar el conjugado diariamente mientras que el sacárido exógeno se administra más de una vez al día. En determinada realización, El conjugado se puede administrar dos veces a la semana, semanalmente, quincenalmente o mensualmente mientras que el sacárido exógeno se administra diariamente. En determinadas realizaciones, el conjugado se administra semanalmente y el sacárido exógeno se administra dos veces a la semana, semanalmente, o quincenalmente. Los expertos en la materia reconocerán otras variaciones en estos esquemas y variaran dependiendo de la naturaleza del conjugado y la formulación utilizada.

La invención se define como se muestra en las reivindicaciones. Todas las otras realizaciones se describen a fines solo ilustrativos, y cualquier declaración que sería parte de la invención u otras declaraciones similares, han de observarse en el contexto de la solicitud como se archivan y no alteran el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Las estructuras de los conjugados a modo de ejemplo **I-1** a **I-17** y **II-1**a **II-7** que se describen y se usan en los ejemplos se muestran en la Figura 45.

I. Métodos de preparación de conjugados a modo de ejemplo

El primer conjunto de ejemplos describe diversos métodos para preparar conjugados a modo de ejemplo. Los ejemplos también incluyen ensayos para purificar y someter a ensayo los ingredientes de partida y los productos finales. Debe apreciarse que estos métodos pueden modificarse para producir otros conjugados que entran dentro del alcance de la invención.

Ejemplo 1 - Síntesis de azidoetilglucosa (AzEG)

a. Síntesis de bromoetileglucosa

Se lavó resina DOWEX 50Wx4 (Alfa Aesar, Ward Hill, MA) con agua desionizada para retirar el color. Una mezcla de 225 g de D-glucosa (1,25 mol; 1 equiv., Alfa Aesar) y 140 g de DOWEX 50Wx4 se trató con 2,2 l de 2-bromoetanol (30,5 mol, 25 equiv.; 124,97 g/mol; 1,762 g/ml; PF = 150 °C; Alfa Aesar) y la mezcla agitada se calentó a 80 °C durante 4 horas. La reacción se controló por TLC (metanol al 20 %/diclorometano (DCM)). La reacción se completó después de aproximadamente cuatro horas y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se filtró para retirar la resina, y la resina se lavó con acetato de etilo y DCM. El filtrado resultante se destiló para dar un aceite de color ámbar en un evaporador rotatorio. Un total de 400 g tras la extracción.

El aceite de color ámbar se purificó sobre gel de sílice (sílice de 4 kg empaquetado en DCM) de la siguiente manera. El producto en bruto se disolvió en DCM y se cargó en la columna y después se eluyó con 2 x 4 l de metanol al 10 %/DCM; 2 x 4 l de metanol al 15 %/DCM; y 3 x 4 l de metanol al 20 %/DCM. Las fracciones que contenían el producto (basándose en la TLC) se combinaron y se extrajeron a sequedad para proporcionar 152 g de 1-α-bromoetil-glucosa (42 %).

b. Conversión de bromoetilglucosa en azidoetilglucosa (AzEM)

Un matraz de fondo redondo, de tres bocas y 5 l, equipado con una manta calefactora, un agitador en su parte superior y un termómetro, se cargó con 150 g de bromoetilglucosa (525 mmol). El aceite se disolvió en 2 l de agua y se trató con 68,3 g de azida sódica (1,05 mol, 2 equiv.; 65 g/mol; Alfa-Aesar), seguido de 7,9 g de yoduro sódico (52,5 mmol, 0,08 equiv.; 149,89 g/mol; Alfa-Aesar) y la solución se calentó a 50 °C y se agitó durante una noche. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a sequedad en el evaporador rotatorio. El residuo sólido se digirió con 3 x 500 ml de 5:1 vol. de $CHCl_3$: MeOH a 40 °C. Las porciones orgánicas combinadas se filtraron y se evaporaron a sequedad para proporcionar azidoetilglucosa (86 g) en forma de un sólido de color blanquecino. TLC (MeOH al 20 %/DCM; carg. con H_2SO_4): un solo punto, indistinguible del material de partida.

c. Repurificación de azidoetilglucosa

Se recogieron 32 g de azidoetilglucosa en 100 ml de agua. La solución turbia se filtró a través de un filtro de microfibra de vidrio (Whatman GF/B). El filtrado de color dorado se evaporó hasta un sólido en un evaporador rotatorio. El sólido se recogió en metanol (100 ml) y la solución turbia se filtró de nuevo a través de un filtro de microfibra de vidrio. El filtrado de color amarillo resultante se destiló hasta un sólido al vacío.

El sólido se recogió en una cantidad mínima de metanol (50 ml) y se añadió lentamente acetato de etilo (150 ml) con agitación. La suspensión pesada se enfrió y se filtró. El sólido se secó al aire (higroscópico) y se puso en un horno a 60 °C durante una noche. La TLC tenía muy poco del material original. Rendimiento 15,4 g. Las aguas madre se evaporaron al vacío para dar una goma de color amarillo. No se hizo ningún intento de purificar este material en ese momento.

Ejemplo 2 - Síntesis de azidoetilmanosa (AzEM)

a. Síntesis de bromoetilmanosa

Se lavó resina DOWEX 50Wx4 (Alfa Aesar, Ward Hill, MA) con agua desionizada para retirar el color. Una mezcla de 225 g de D-manosa (1,25 mol; 1 equiv., Alfa Aesar) y 140 g de DOWEX 50Wx4 se trató con 2,2 l de 2-bromoetanol (30,5 mol, 25 equiv.; 124,97 g/mol; 1,762 g/ml; PF = 150 °C; Alfa Aesar) y la mezcla agitada se calentó a 80 °C durante 4 horas. La reacción se controló por TLC (metanol al 20 %/diclorometano (DCM)). La reacción se completó después de aproximadamente cuatro horas y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se filtró para retirar la resina, y la resina se lavó con acetato de etilo y DCM. El filtrado resultante se destiló para dar un aceite de color ámbar en un evaporador rotatorio.

El aceite de color ámbar se purificó sobre gel de sílice (sílice de 4 kg empaquetado en DCM) de la siguiente manera. El producto en bruto se disolvió en DCM y se cargó en la columna y después se eluyó con 2 x 4 l de metanol al 10 %/DCM; 2 x 4 l de metanol al 15 %/DCM; y 3 x 4 l de metanol al 20 %/DCM. Las fracciones que contenían el producto (basándose en la TLC) se combinaron y se extrajeron a sequedad para proporcionar 152 g de 1-α-bromoetil-manosa (42 %).

b. Conversión de bromoetilmanosa en azidoetilmanosa (AzEM)

Un matraz de fondo redondo, de tres bocas y 5 l, equipado con una manta calefactora, un agitador en su parte superior y un termómetro, se cargó con 150 g de bromoetilmanosa (525 mmol). El aceite se disolvió en 2 l de agua y se trató con 68,3 g de azida sódica (1,05 mol, 2 equiv.; 65 g/mol; Alfa-Aesar), seguido de 7,9 g de yoduro sódico (52,5 mmol, 0,08 equiv.; 149,89 g/mol; Alfa-Aesar) y la solución se calentó a 50 °C y se agitó durante una noche. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a sequedad en el evaporador rotatorio. El residuo sólido se digirió con 3 x 500 ml de 5:1 vol. de $CHCl_3$:MeOH a 40 °C. Las porciones orgánicas combinadas se filtraron y se evaporaron a sequedad para proporcionar azidoetilmanosa en forma de un sólido de color blanquecino.

c. Repurificación de azidoetilmanosa

Se recogieron 32 g de azidoetilmanosa en 100 ml de agua. La solución turbia se filtró a través de un filtro de microfibra de vidrio (Whatman GF/B). El filtrado se evaporó hasta un sólido en un evaporador rotatorio. El sólido se recogió en metanol (100 ml) y la solución turbia se filtró de nuevo a través de un filtro de microfibra de vidrio. El filtrado de color amarillo resultante se destiló hasta un sólido al vacío.

El sólido se recogió en una cantidad mínima de metanol (50 ml) y se añadió lentamente acetato de etilo (150 ml) con agitación. La suspensión pesada se enfrió y se filtró. El sólido se secó al aire (higroscópico) y se puso en un horno a 60 °C durante una noche. Las aguas madre se evaporaron al vacío para dar una goma de color amarillo.

Ejemplo 3 - Síntesis de azidoetilmanobiosa (AzEBM)

El compuesto de AzEM del Ejemplo 2 se protegió selectivamente usando dimetil éter de benceno, se purificó por cromatografía en columna y posteriormente se hizo reaccionar con bromuro de bencilo para dar 1-α-(2-azidoetil)-4,6-benzaldehído diacetal-3-bencil-manopiranósido. A continuación, el producto se glicosiló con 1-α-bromo-2,3,4,6-tetrabenzoilmanopiranósido usando química de triflato de plata en condiciones rigurosamente anhidras para dar el producto protegido de azidoetilmanobiosa. Después, el producto intermedio se desprotegió para retirar los grupos benzoílo para dar AzEBM.

Ejemplo 4 - **Síntesis de azidoetilmanotriosa (AzETM)**

a. 1-α-bromo-2,3,4,6-tetrabenzoil-manosa

En un matraz de 3 bocas y 500 ml que contenía una barra de agitación y una entrada de nitrógeno se añadieron 40 g (60,9 mmol) de pentabenzoilmanosa y 80 ml de cloruro de metileno. La solución resultante se enfrió en un baño de hielo a < 5 °C y se añadieron 80 ml de una solución de HBr al 33 %-ácido acético mediante un embudo de adición a una velocidad adecuada para mantener la temperatura de reacción <10 °C. Una vez completa la adición (~30 min), el baño de hielo se retiró y la agitación se continuó durante 3 horas.

La solución de reacción se diluyó con un volumen igual (160 ml) de DCM y se extrajo sucesivamente con agua (2x 500 ml), bicarbonato saturado (2 x 50 ml) y salmuera (1x50 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y el disolvente se evaporó para dar 41 g de una espuma sólida (rendimiento teórico 40,1 g) y se almacenó en una atmósfera de N_2 en un congelador. Este material se usó sin purificación adicional. La reacción se controló por TLC: gel de sílice (hexano/acetato de etilo, 7/3); F_r del material de partida 0,65, F_r del producto 0,8, visualización UV. RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ 8,11 (d, 2H), 8,01 (m, 4H), 7,84 (d, 2H), 7,58 (m, 4H), 7,41 (m, 6H), 7,28 (t, 2H), 6,58 (s, 1H), 6,28 (m, 2H), 5,8 (m, 1H), 4,75 (dd, 1H), 4,68 (dd, 1H), 4,5 (dd, 1H).

b. 1-Azidoetil-2,4-dibenzoilmanosa

En un matraz de 3 bocas y 1,0 l, que contenía una barra de agitación, una entrada de nitrógeno y 300 ml de acetonitrilo anhidro se añadieron 25 g de 1-azidoetilmanosa (100,4 mmol) y 50 ml de ortobenzoato de trietilo (220 mmol, 2,2 equiv.). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente y se añadieron 0,8 ml (10 mmol) de ácido trifluoroacético (TFA) puro. La solución se aclaró en 10 minutos y la agitación se continuó durante dos horas más, después se añadieron 25 ml de TFA acuoso al 10 % y la agitación se continuó durante 2 horas más para hidrolizar el intermedio para dar los isómeros de éster. El disolvente se evaporó al vacío para dar un aceite viscoso, que se trituró con 50 ml de DCM y se evaporó de nuevo para dar un aceite viscoso. Se añadió tolueno (70 ml) al residuo y la solución viscosa se pipeteó con 2,4-dibenzoilazidoetilmanosa. Se formó un precipitado fino en 15 minutos y se continuó agitando durante una noche a temperatura ambiente. La suspensión pesada resultante se puso en el congelador durante 2-4 horas, después se filtró y el sólido se lavó con tolueno enfriado con hielo (2 x 10 ml). El sólido se secó al aire a peso constante para dar 21 g (rendimiento total 22,85 g a una pureza isomérica del 50 %) con una pureza isomérica del ~95 %. El producto se recogió en 40 ml de tolueno, se agitó durante 1 hora y después se puso en el congelador durante 2 horas más. El sólido se filtró y se lavó (2 x 10 ml) con tolueno enfriado con hielo y se secó al aire a peso constante para dar 18,5 g del producto isomérico individual 2,4-dibenzoilazidoetilmanosa con un rendimiento del 83 %. Las aguas madre contenían el isómero no deseado y una pequeña cantidad del isómero deseado. La reacción se controló por TLC: gradiente inicial (hexano/acetato de etilo 7/3), F_r del material de partida 0,0, F_r del intermedio de ortoéster 0,9. (Hexano/acetato de etilo: 8/2), F_r del MP 0,8, F_r del isómero deseado 0,4, F_r del isómero no deseado 0,2.
RMN ^{1}H 300 MHz ($CDCl_3$) δ 8,12 (t, 4H), 7,66 (t, 2H), 7,5 (m, 4H), 5,56 (t, 1H), 5,48 (m, 1H), 5,14 (m, 1H), 4,5 (dd, 1H), 4,0 (m, 2H), 3,8 (m, 3H), 3,56 (m, 1H), 3,44 (m, 1H).

c. Man(α-1,3)-man(α-1,6)-α-1-azidoetilmanopiranósido perbenzoilado

En un matraz de 3 bocas y 1,0 l con una barra de agitación, y una entrada de nitrógeno se añadieron 41 g de 1-bromo-tetrabenzoilmanosa en bruto (60,9 mmol, ~2,5 equiv.) en 185 ml de DCM. A esto se le añadieron 11,2 g de 2,4-dibenzoilazidoetilmanosa (24,5 mmol), seguido de 11,2 g de tamices 4Å. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se enfrió a -15 °C en un baño de metanol/hielo.

En un matraz oscuro separado se añadieron 190 ml de tolueno, seguido de 15,1 g de triflluorometanosulfonato de plata (AgOTf) (58,8 mmol, 2,4 equiv.) y se agitó en solución en la oscuridad. Esta solución se transfirió a un embudo grande de adición y se añadió gota a gota a la suspensión en agitación mientras se protegía la reacción frente a la luz. La temperatura de reacción se mantuvo < -10 °C ajustando la tasa de adición de AgOTf. Una vez se completó la adición (~30 minutos), el baño de refrigeración se retiró y la reacción se agitó durante 2 horas más hasta que quedó

un solo producto según TLC (GI, hexano/acetato de etilo: 7/3, F_r de bromo 0,9, F_r de azido 0,4, F_r producto trios 0,5, visualización UV).

Se añadió trietilamina (7 ml, 5,0 equiv.), seguido de 200 ml de DCM. La suspensión resultante se filtró a través de una capa de gel de sílice y celite y se lavó con 2 x 75 ml de DCM. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se recogió en acetato de etilo y se lavó secuencialmente con agua (2x100 ml), bicarbonato (2 x 50 ml) y salmuera (1x75 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. El disolvente se evaporó al vacío para dar 39 g de una espuma sólida (RT 39,5 g). RMN ^{1}H 300 MHz ($CDCl_3$) δ 8,3 (d, 2H), 8,2 (m, 8H), 7,85 (d, 4H), 7,75 (dd, 4H), 7,3-7,65 (m, 30H), 7,2 (t, 2H), 6,05 (m, 4H), 5,9 (t, 2H), 5,63 (m, 2H), 5,38 (s, 2H), 5,18 (d, 1H), 4,65 (m, 4H), 4,5 (m, 2H), 4,35 (m, 4H), 3,8 (m, 2H), 3,54 (m, 2H).

d. Man (α-7,3)-man(α-1,6)-α-1-azidoetilmanopiranósido

A una suspensión en agitación de 3,0 g de man (α-1,3)-man(α-1,6)-α-1-azidoetilmanopiranósido perbenzoilado (1,86 mmol) en 40 ml de metanol se añadieron 0,2 ml de metóxido sódico 4,28 M en metanol. La suspensión resultante se agitó 20 horas a temperatura ambiente, dando una solución transparente. La finalización de la reacción se controló por TLC, (GI, hexano/acetato de etilo: 8/2, F_r del MP 0,4, F_r del producto 0,0).

El metanol se evaporó al vacío, dando un semisólido oleoso. El residuo se recogió en acetato de etilo (50 ml) y se agitó durante 3 horas. El sólido se filtró, se lavó con acetato de etilo recién preparado (2 x 20 ml) y se secó al aire a peso constante para dar 1,09 g (RT 1,07 g) de producto. Las aguas madre contenían benzoato de metilo residual, el subproducto de la desprotección.

Ejemplo 5 - Síntesis de aminoetil-sacáridos (AEG, AEM, AEBM, AETM) a partir de azidoetil-sacáridos (AzEG, AzEM, AzEBM, AzETM)

Los compuestos terminados en azido de los Ejemplos 1-4 se hidrogenan fácilmente a temperatura ambiente usando un catalizador de paladio/carbono, una pequeña cantidad de ácido acético y etanol como disolvente para dar los compuestos terminados en amina correspondientes. La Figura 10 muestra las estructuras químicas de AEG, AEM, AEBM, AETM. El proceso es idéntico al descrito para AETM más adelante, excepto porque, como comprenderán los expertos en la materia, las cantidades de reactivos, disolventes, etc. deben escalarse al número de moles de sacárido-ligando que va a hidrogenarse.

a. Man (α-1,3)-Man(α-1,6)-α-1-aminoetilmanopiranósido

("aminoetiltrimanosa", AETM)

A una solución de 5,3 g (9,25 mmol) de man(α-1,3)-man(α-1,6)-α-1-azidoetilmanopiranósido en 100 ml de agua y 50 ml de etanol se añadieron 0,8 g de Pd al 5 %/C. La suspensión en agitación vigorosa se hidrogenó a 0,21-0,28 MPa (30-40 psi) durante 48 horas o hasta que no se observó material de partida por TLC (GI, Metanol, F_r del MP 0,75, F_r del producto 0,0, PMA vis.). La suspensión se filtró sobre celite, que se enjuagó con etanol (2 x 50 ml) y el filtrado se concentró al vacío.

La HPLC de este material (C18, 3 % de acetonitrilo/97 % de H_3PO_4 al 0,1 %, 220 nm, 2 ml/min) dio una absorción de UV del material en vacío de la columna de inyección, Tr 2,5 minutos, indicativa del éster de benzoato.

El filtrado se diluyó con 70 ml de agua y 12 ml de NaOH 1 N y la solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente (HPLC: sin material UV en el vacío de la columna, Tr 2,5 min, material UV a un Tr de 10,5 minutos coeluyendo con ácido benzoico). Se añadieron 2 g de carbón vegetal decolorante y la suspensión en agitación se calentó a 80 °C, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró sobre celite. El pH del filtrado se ajustó a 8,0 con HCl 2 N y la solución incolora se concentró al vacío a aproximadamente un 50 % en volumen.

La solución se cargó sobre una columna de resina (Dowex 50W, 50 g) y se lavó con agua hasta que las fracciones de elusión tuvieron un pH neutro (6 x 75 ml), retirando cualquier subproducto de ácido residual. El producto de amina se enjuagó de la columna con hidróxido de amonio 0,25 N (6 x 75 ml) y las fracciones que contenían el producto de amina-detección de nihidrina se combinaron y se concentraron a 25-30 ml al vacío. Esta solución concentrada se añadió gota a gota a 300 ml de etanol en agitación y se continuó agitando durante 2 horas más. El producto se filtró, se lavó con etanol recién preparado (2 x 50 ml) y se secó al aire a peso constante. Este sólido amorfo de color blanco resultante se secó adicionalmente en un horno de vacío a 80 °C durante 5 horas para dar 4,1 g de un sólido granulado de color blanco (RT 5,1 g). La RMN estaba limpia de protones aromáticos. RMN ^{1}H 300 MHz (D_2O) δ 5,08 (s, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,81 (s, 1H), 4,8-3,6 (m, 18H), 2,9 (m, 2H).

Ejemplo 6 - Síntesis de sacárido de dipropargilo y producción de ligando AE

a. Síntesis de dipropargilmalonato de dietilo

Se añadió malonato de dietilo (122,5 g, 0,7648 mol) a etanol absoluto (800 ml) que contenía etóxido sódico (preparado a partir de metal de sodio, 38,5 g, 1,67 mol). Después de 30 min, se añadió lentamente bromuro de propargilo (200 g, 1,68 mol) a la suspensión agitada, manteniendo la temperatura por debajo de 60 °C. La mezcla se calentó a reflujo durante una noche (15 horas). Las sales precipitadas se retiraron por filtración y se lavaron con etanol. El disolvente se retiró al vacío y el residuo se diluyó con agua y se extrajo con etanol (2 x 200 ml). Los extractos combinados se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron, se lavaron con Et_2O y el disolvente se retiró al vacío para proporcionar un aceite de color dorado. El aceite se puso a alto vacío (40 °C) durante 3 horas y se dejó reposar. Los sólidos comenzaron a cristalizar formando un sólido oleoso. Se dejó reposar durante una noche (16 horas). Se cargó ciclohexano en el matraz, los sólidos se rompieron, se filtraron y se lavaron con ciclohexano para proporcionar un producto cristalino de color blanco (81 g, rendimiento del 44,8 %). La reacción se siguió por CG.

b. Síntesis de ácido dipropargilmalónico

Se calentó dipropargil malonato de dietilo (80 g, 0,339 mol) a reflujo en 600 ml de hidróxido potásico alcohólico al 10 % durante una noche (15 horas). El disolvente se retiró al vacío y el residuo se acidificó con HCl 3 N. El residuo se extrajo con Et_2O (2 x 300 ml). Los extractos combinados se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron, se lavaron con Et_2O y se concentraron al vacío hasta un aceite. Se pusieron a alto vacío (40 °C) durante 2 horas y se dejaron reposar para proporcionar ácido dipropargilmalónico en forma de un aceite (46 g, rendimiento del 75,4 %). La reacción se siguió por CG.

c. Síntesis de ácido dipropargilacético

El ácido dipropargilmalónico (26 g, 0,443 mol) se calentó puro a 135 °C hasta que cesó el desprendimiento de CO_2. Después, se dejó enfriar hasta un aceite. El aceite se destiló a 3,45 kPa (0,5 psi). El residuo oleoso restante en el matraz de destilación y el sólido se combinaron (15,7 g, rendimiento del 79,9 %) y se usó según estaba en la siguiente etapa.

d. Síntesis de éster t-butílico del ácido [2-(3-prop-2-inil-hex-5-inoilamino)-etil]-carbámico

Se añadió lentamente N-boc-etilendiamina (18,3 g, 0,1143 mol) en 50 ml de CH_3CN mediante un embudo de adición a una solución agitada que contenía ácido dipropargilacético (15,56 g, 0,1143 mol), TBTU (36,74 g, 0,114 mol) y DIPEA (29,6 g, 0,229 mol) en 300 ml de CH_3CN a 0 °C. Se produjo precipitación. El baño de hielo se retiró y el producto se agitó a temperatura ambiente durante una noche (16 horas). Ahora la reacción era totalmente homogénea. La solución se concentró al vacío y el residuo se diluyó con 800 ml de agua. Los sólidos resultantes se filtraron, se lavaron abundantemente con agua y se secaron al vacío para dar 14,3 g de producto en bruto. La recristalización (2 x) en DCM, la filtración y el lavado con hexanos proporcionaron el producto (9,85 g, rendimiento del 31 %, pureza del 98 % según HPLC (214 nm)).

e. Reacción de click de azidosacárido a éster t-butílico del ácido [2-(3-prop-2-inil-hex-5-inoilamino)-etil]-carbámico

A 1,1 dipropargil-acetil-(-1N, 2N-BOC-1,2-diaminoetil)amida (DP, 418 mg, 1,5 mmol) en DCM (20 ml) se añadió gota a gota TFA (4 ml) durante 5 minutos a 0 °C. La solución oscurecedora se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Los volátiles se evaporaron a presión reducida. Se añadió tolueno (20 ml) al residuo y se extrajo dos veces a presión reducida. El aceite oscuro resultante se usó sin purificación adicional.

A este residuo se añadieron THF (20 ml) y agua (20 ml) con agitación durante 15 minutos. Se añadió sulfato de cobre (225 mg, 0,9 mmol), seguido de ascorbato sódico (180 mg, 0,9 mmol). La mezcla resultante se calentó a 55-60 °C durante 6 horas y después se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La solución se evaporó a presión reducida a aprox. la mitad del volumen y se filtró a través de un filtro de microfibra de vidrio. La solución transparente resultante se puso en una columna de resina (Dowex 50X-2), que se lavó con agua (6 x 75 ml) hasta pH neutro y después se lavó con NH_4OH al 10 % (8 x 75 ml). Las fracciones que se tiñeron positivamente con ninhidrina se combinaron y se evaporaron a presión reducida para dar un sólido vítreo. El residuo vítreo se recogió en agua (250 ml) y se trató con 0,5 g de carbón vegetal y se calentó a reflujo. La suspensión enfriada se filtró sobre celite y un filtro de microfibra. La solución de color amarillo pálido resultante se evaporó para dar un sólido vítreo a presión reducida y se añadió metanol y se evaporó (2 x) para dar una espuma de color blanquecino (0,9 g, RT 1,0 g).

Ejemplo 7 - Síntesis de sacárido de tripropargilo y producción de ligando AE

a. 2-(2-BOC-aminoetil)tioacetamida-tris[(propargiloxi)metil] aminometano

A una solución de N-(2-mercaptoetil)carbamato de t-butilo (Frontrun Organix, Ipswich, MA; 177,26 mg, 1 mmol) en etanol (5 ml) se añadió NaOH (1,1 mmol) con agitación a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió 2-bromoacetamida-tris[(propargiloxi)metil]aminometano (356 mg, 1,0 mmol, véase J. Org. Chem. 73, 5602, 2008) y la agitación se continuó durante 20 horas (GI de TLC 8/2 de hexano/acetato de etilo, F_r del prod. 0,4). El disolvente se

evaporó al vacío y el residuo se recogió en acetato de etilo (40 ml) y se lavó sucesivamente con agua (25 ml), NaOH 0,5 N (25 ml) y salmuera (25 ml), se secó sobre Na_2SO_4 se filtró y se concentró hasta un aceite (360 mg, RT 452,3 mg). RMN $CDCl_3$, (ppm): 7,05 (s, 1H, N-H); 5,25 (s, 1H, N-H); 4,85 (s, 6H); 3,85 (s, 6H); 3,3 (m, 2H); 3,15 (s, 2H); 2,7 (m, 2H); 2,42 (s, 3H); 1,22 (s, 9H).

b. 2-(2-aminoetil)tioacetamida-tris[(triazolo-1-(2-etilmanosa) 4-metoxi)metil] aminometano

A una solución en agitación de 2-(2-BOC-aminoetil)tioacetamida-tris[(propargiloxi)metil] aminometano (1 g, 2,21 mmol) en DCM (40 ml) a temperatura ambiente se añadió gota a gota TFA (4 ml). La solución resultante se agitó durante una noche. Los disolventes se retiraron al vacío y el residuo se recogió en tolueno (15 ml) y se evaporó a sequedad.

El residuo se recogió en THF (40 ml), agua (40 ml) y se agitó en una solución. Se añadió azidoetilmanosa (3,75 equiv., 2,0 g, 8,3 mmol), seguido de sulfato de cobre (500 mg, 2,0 mmol) y ascorbato sódico (400 mg, 2,0 mmol) y la mezcla resultante se agitó a 55-60 °C (baño de aceite) durante 6 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. La mezcla resultante se concentró al vacío a la mitad del volumen y se filtró a través de un filtro de micro fibra de vidrio. El filtrado se cargó sobre una columna de resina (Dowex 50w 50x4-100) y se eluyó con agua (6 x 75 ml) hasta que fue neutro. Después, la columna se eluyó con hidróxido de amonio al 15 % (10 x 75 ml) y las fracciones positivas a ninhidrina se combinaron y se concentraron para dar una espuma vítrea (1,29 g, RT (PM 1099 g/mol), 53 % en dos etapas).

Ejemplo 8 - Síntesis de NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina

En una síntesis típica, se disolvieron 4 g de insulina en polvo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en 100 ml de DMSO anhidro a temperatura ambiente, seguido de la adición de 4 ml de trietilamina (TEA). La solución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron lentamente 1,79 ml (2,6 equivalentes) de una solución de dicarbonato de di-*terc*-butilo/THF (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a la solución de insulina-TEA y se mezclaron durante aproximadamente una hora. La reacción se interrumpió mediante la adición de 4 ml de una solución madre que contenía 250 ul de etanolamina en 5 ml de DMSO, seguido de mezclado durante cinco minutos. Después de inactivación, toda la solución se vertió en 1600 ml de acetona y se mezcló brevemente con una espátula. A continuación, se añadieron gota a gota 8 x 400 µl alícuotas de una solución al 18,9 % de HCl:agua sobre la superficie de la mezcla para precipitar la insulina reaccionada. Después, el material precipitado se centrifugó y el sobrenadante se decantó en un segundo vaso de precipitados mientras se separaba la torta de precipitado. A la solución de sobrenadante, se añadieron gota a gota 8 x 400 µl alícuotas más de una solución al 18,9 % de HCl:agua sobre la superficie de la mezcla para obtener un segundo precipitado de insulina reaccionada. El segundo precipitado se centrifugó y el sobrenadante se desechó. Las tortas de centrifugación combinadas de las dos etapas de precipitación se lavaron una vez con acetona, seguido de secado al vacío a temperatura ambiente para producir el polvo en bruto, que contiene normalmente un 60 % del producto BOC2 deseado y un 40 % del material BOC3.

Se usó un método de HPLC preparativa de fase inversa para aislar la BOC2-insulina pura del polvo en bruto. El tampón A es agua desionizada que contiene un 0,1 % de TFA y el tampón B es acetonitrilo que contiene un 0,1 % de TFA. El polvo en bruto se disolvió a 25 mg/ml en una mezcla de 70 % de A/30 % de B y se filtró mediante una jeringa antes de la inyección en la columna. Antes de la purificación, la columna (Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm) se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 70 % de A/30 % de B usando un sistema Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución de polvo en bruto en la columna a un caudal de 15 ml/minuto durante el transcurso de 5 minutos, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 70 % de A/30 % de B a 62 % de A/38 % de B en el transcurso de los siguiente 3,5 minutos y se mantuvo ahí durante 2,5 minutos más. Usando este método, el pico de BOC2 deseado se eluyó a aproximadamente 10,6 minutos seguido de cerca por el pico de BOC3. Una vez recogida, la solución se sometió a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener polvo de BOC2-insulina puro. La identidad se verificó por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA) y el sitio de conjugación se determinó secuenciando el extremo N (Western Analytical, St. Louis, MO).

Ejemplo 9 - Síntesis de armazones de benceno-1,3,5-tricarboxi-(NHS éster de N-ω-aminoácido)amida

Una solución de cloruro de 1,3,5-bencenotricarbonilo (1 g, 3,8 mmol) en diclorometano (DCM) (5 ml) se añadió gota a gota a una solución en agitación vigorosa de un ω-aminoácido (3,1 equivalentes) en NaOH 1 N (25 ml) en un baño de hielo. El baño de hielo se retiró y se continuó agitando durante 4 horas a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota HCl 2 N (~15 ml) a aproximadamente pH 2 y la suspensión resultante se agitó durante 2 horas más. El precipitado se filtró, se lavó con agua fría (2 x 20 ml) y se secó al aire, al vacío y después en un horno a 60 °C durante una noche. El sólido de color blanco resultante se usó sin purificación adicional. Rendimiento para cada uno (ω-aminoácido (ácido 4-aminobutírico: rendimiento 1,6 g, 91 %; ácido 6-aminocaproico: rendimiento 1,9 g, 92 %)

El material anterior se recogió en DMSO (5 ml) que contenía N-hidroxisuccinimida (3,1 mmol, 3,1 equiv.) y se añadió N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDCI, 3,6 mmol, 3,6 equiv.) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó durante 24 horas, se diluyó con agua (125 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). La

fase orgánica combinada se lavó con agua (2 x 50 ml) y salmuera (1 x 50 ml) y se secó sobre $MgSO_4$. El disolvente se evaporó y el residuo semisólido se trituró con acetonitrilo (10 ml). El sólido se filtró y se lavó con un disolvente frío, se secó al aire, al vacío, y después en un horno a 60 °C durante una noche. El producto estaba libre de subproducto de urea. Benceno-1,3,5-tricarboxi-(-NHS éster N-6-aminocaproico)amida (TSB-C6): 304 mg, 36 %, pf 140-142 °C. Benceno-1,3,5-tricarboxi-(NHS-éster N-4-butírico)amida (TSB-C4): 245 mg, 45 %, pf 182-184 °C.

Ejemplo 10 - **Síntesis de armazón dendrítico**

a. Hidrogenación de dendrones funcionalizados con extremos alquino que contienen grupos nitro

Los dendrones que contiene = 2, 4 u 8 alquinos terminales y un núcleo de ácido nitropropiónico se obtuvieron (por ejemplo, de Polymer Factory, Sweden) y se usaron sin purificación adicional. El dendrón se disolvió en 100 ml una mezcla 50:50 vol. de DCM y etanol y se añadieron 0,8 g de Pd al 5 %/C. La suspensión en agitación vigorosa se hidrogenó a 0,21-0,28 MPa (30-40 psi) durante 48 horas o hasta que no se observó material de partida por TLC. La suspensión se filtró sobre celite, que se enjuagó con etanol (2 x 50 ml) y el filtrado se concentró al vacío.

El filtrado se diluyó con 70 ml de agua y 12 ml de NaOH 1 N y la solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Se añadieron 2 g de carbón vegetal decolorante y la suspensión en agitación se calentó a 80 °C, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró sobre celite. El pH del filtrado se ajustó a 8,0 con HCl 2 N y la solución incolora se concentró al vacío a aproximadamente un 50 % en volumen.

La solución se cargó sobre una columna de resina (Dowex 50W, 50 g) y se lavó con agua hasta que las fracciones de elusión tuvieron un pH neutro (6 x 75 ml), retirando cualquier subproducto de ácido residual. El producto de amina se enjuagó de la columna con hidróxido de amonio 0,25 N (6 x 75 ml) y las fracciones que contenían el producto de amina (detección de ninhidrina) se combinaron y se evaporaron al vacío usando un evaporador rotatorio.

b. Reacción de dendrón (amina, alquino-4) con azidoetil manosa

El producto de dendrón que contiene el núcleo de amino y cuatro grupos alquino terminales obtenidos tras la deshidrogenación (8,3 mmol) se recogió en THF (40 ml), agua (40 ml) y se agitó en solución. Se añadió azidoetilmanosa (4,75 equiv., 2,53 g, 10,51 mmol), seguido de sulfato de cobre (500 mg, 2,0 mmol) y ascorbato sódico (400 mg, 2,0 mmol) y la mezcla resultante se agitó a 55-60 °C (baño de aceite) durante 6 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. La mezcla resultante se concentró al vacío a la mitad del volumen y se filtró a través de un filtro de micro fibra de vidrio. El filtrado se cargó en una columna de resina (Dowex 50w 50x4-100) y se eluyó con agua (6 x 75 ml) hasta que fue neutro. Después, la columna se eluyó con hidróxido de amonio al 15 % (10 x 75 ml) y las fracciones positivas a nihidrina se combinaron y se concentraron para dar una espuma vítrea.

Ejemplo 11 - Conjugación de fármaco funcionalizado con amina con ésteres activados multivalentes en disolvente orgánico (fármaco añadido en primer lugar)

Un armazón que contenía éster con el extremo N activado se disolvió a 60 mM en 1,0 ml de DMSO anhidro, seguido de la adición de 400 ul (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agitó rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, el fármaco que porta la amina se disolvió por separado en 7,9 ml de DMSO a una concentración de 7,4 mM. Una vez disuelta, toda la solución de fármaco se añadió gota a gota durante el transcurso de 10 minutos a la solución de armazón/DMSO/TEA, seguido de mezclado a temperatura ambiente durante dos horas. Después, el resto de ésteres activados se hicieron reaccionar con ligandos funcionalizados con amina de la siguiente manera. Una solución 370 mM de ligando se preparó en un volumen adecuado de DMSO seco. Una vez disuelta, se añadió suficiente solución para proporcionar un número de equivalentes reactivos igual a tres veces el número de grupos éster activados inicial, N, menos uno. Por ejemplo, si había N=3 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añadieron (3x(3-1)x60 mM/370 mM) = 0,973 ml de solución de ligando. Si había N=4 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añadieron (3x(4-1)x60 mM/370 mM)=1,46 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de añadir la solución de ligando, la solución se agitó durante una hora más a temperatura ambiente para asegurar una reacción completa.

Después, la solución resultante se superdiluye 10x en una solución salina tamponada con HEPES 20 mM de pH 5,0 que contiene NaCl 0,150 M, seguido de ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8,0. La solución acuosa se purificó en primer lugar por exclusión de tamaño usando una fase sólida adecuada para la separación deseada de los materiales conjugados y no conjugados. Después, la solución que pasó a través del volumen hueco de la columna se concentró usando una membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purificó adicionalmente para obtener el producto deseado usando HPLC preparativa de fase inversa en una columna Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm. El tampón A es agua desionizada que contiene un 0,1 % de TFA y el tampón B es acetonitrilo que contiene un 0,1 % de TFA. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 80 % de A/20 % de B usando un sistema Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución en bruto en la columna en el transcurso de 2 minutos a un caudal de 15 ml/minuto, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 80 % de A/20 % de B a 75 % de A/25 % de B

durante los siguientes 5 minutos, seguido de un gradiente lineal más lento de 75 % de A/25 % de B a 62 % de A/38 % de B durante los siguientes 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado varía dependiendo del fármaco, el armazón y el ligando utilizados. Una vez recogida, la solución se sometió a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener un conjugado puro, cuya identidad pudo verificarse por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA).

Ejemplo 12 - **Conjugados de B1-insulina con sacáridos multivalentes** - **ligando homogéneo**

Usando el método descrito en el Ejemplo 11 y el fármaco que porta amina, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina (PM = 6,008 g/mol) del Ejemplo 8, se prepararon conjugados de insulina con los siguientes armazones y ligandos. Se adquirieron armazones de éster activado de 1,3,5-bencenotricarboxilato de tris-succinimidilo (TSB), aminotriacetato de tris-succinimidilo (TSAT), (6-aminocaproil)aminotriacetato de tris-succinimidilo (TSAT-C6) y tetraquis-(N-succinimidil carboxipropil)pentaeritritol, TSPE, de Molecular Biosciences (Boulder, CO) y se usaron sin purificación adicional. Los armazones TSB-C4 y TSB-C6 se sintetizaron de acuerdo con el Ejemplo 9. Los ligandos AEM, AEBM y AETM se sintetizaron de acuerdo con los Ejemplos 1-5. El medio de exclusión con un tamaño adecuadamente dimensionado es Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y el límite de peso molecular de la membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada es 3 kD.

En todos los casos, los grupos protectores BOC se retiraron disolviendo el polvo liofilizado obtenido de acuerdo con Ejemplo 11 en TFA al 90 %/anisol al 10 % durante una hora a 4 °C, seguido de 10x superdisolución en tampón HEPES 25 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M. El pH se ajustó a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual el material se pasó a través de una columna Biogel P2 para retirar anisol, BOC y otros subproductos de la desprotección de bajo PM, así como cualquier otra sal contaminante. Después, la solución de conjugado acuosa, purificada y desprotegida se concentró usando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) a aproximadamente 58 U de insulina/ml (basándose en mediciones de A280) y se almacenaron a 4 °C hasta que se necesitaron. Debido a que el material de NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina de partida únicamente posee un grupo amina libre en el extremo de Phe-B1, el Phe-B1 es el único sitio de conjugación de la insulina al armazón como se verificó en cada producto final desprotegido secuenciando el extremo N.

En la siguiente tabla (y otras similares en los ejemplos), los valores de PM del armazón son para los ésteres activados de los armazones. Esto es para que uno pueda calcular inmediatamente la masa del éster activado para añadir a la mezcla de reacción. Una vez reaccionado, el armazón pierde los ésteres activados y por tanto la contribución al PM en el producto final es mucho menor.

Conjugado	Armazón	PM del Armazón	Ligando	PM de AE-azúcar	Pureza (HPLC)	PM (CL-EM)	Azúcar/ Insulina
TSB-AEM-2 (B1)	TSB	501	AEM	223	97 %	6410	2,0
TSB-AEBM-2 (B1)	TSB	501	AEBM	385	94 %	6734	2,0
TSB-AETM-2 (B1)	TSB	501	AETM	547	96 %	7057	2,0
TSB-C4-AEM-2 (B1)	TSB-C4	755	AEM	223	95 %	6665	2,0
TSB-C4-AEBM-2 (B1)	TSB-C4	755	AEBM	385	97 %	6989	2,0
TSB-C4-AETM-2 (B1)	TSB-C4	755	AETM	547	95 %	7313	2,0
TSB-C6-AEM-2 (B1)	TSB-C6	882	AEM	223	99 %	6791	2,0
TSB-C6-AEBM-2 (B1)	TSB-C6	882	AEBM	385	99 %	7114	2,0
TSB-C6-AETM-2 (B1)	TSB-C6	882	AETM	547	95 %	7438	2,0
TSAT-AEM-2 (B1)	TSAT	482	AEM	223	98 %	6390	2,0
TSAT-AEBM-2 (B1)	TSAT	482	AEBM	385	95 %	6714	2,0
TSAT-AETM-2 (B1)	TSAT	482	AETM	547	94 %	7038	2,0
I-1: TSAT-C6-AEM-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEM	223	97 %	6730	2,0
I-3: TSAT-C6-AEBM-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEBM	385	99 %	7054	2,0
I-2: TSAT-C6-AETM-2 (B1)	TSAT-C6	822	AETM	547	97 %	7378	2,0
I-16: TSPE-AEM-3 (B1)	TSPE	813	AEM	223	98 %	6829	3,0
TSPE-AEBM-3 (B1)	TSPE	813	AEBM	385	97 %	7314	3,0
TSPE-AETM-3 (B1)	TSPE	813	AETM	547	94 %	7802	3,0

Ejemplo 13 - **Conjugados de B1-insulina con sacáridos multivalentes** - **ligandos mixtos**

Usando el método descrito en el Ejemplo 11 y el fármaco que porta amina, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-Insulina (PM=6,008 g/mol) del Ejemplo 8, se prepararon conjugados de insulina que poseían una mezcla de ligandos de

sacárido conectados al armazón.

Los armazones de éster activado TSAT-C6 y TSPE se adquirieron de Molecular Biosciences (Boulder, CO) y se usaron sin purificación adicional. Los AEM, AEBM y AETM se sintetizaron de acuerdo con los Ejemplos 1-5. El medio de exclusión con un tamaño adecuadamente dimensionado es Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y el límite de peso molecular de la membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada es 3 kD.

En todos los casos, los grupos protectores BOC se retiraron disolviendo el polvo liofilizado obtenido de acuerdo con Ejemplo 11 en TFA al 90 %/anisol al 10 % durante una hora a 4 °C, seguido de 10x superdisolución en tampón HEPES 25 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M. El pH se ajustó a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual el material se pasó a través de una columna de Biogel P2 para retirar anisol, BOC y otros subproductos de la desprotección de bajo PM, así como cualquier otra sal contaminante. Después, la solución de conjugado acuosa, purificada y desprotegida se concentró usando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) al nivel deseado y se almacenó 4 °C hasta que se necesitó. Debido a que el material de NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina de partida únicamente posee un grupo amina libre en el extremo de Phe-B1, el Phe-B1 es el único sitio de conjugación de la insulina al armazón como se verificó en cada producto final desprotegido secuenciando el extremo N.

Identidad del conjugado	Armazón	PM del Armazón	Ligando mixto	PM de AE-azúcar	Pureza (HPLC)	PM (CL-EM)	Azúcar/ Insulina
TSPE-AEM-1-AETM-2 (B1)	TSPE	813	AEM/AETM (33/67 mol/mol)	223/547	94 %	7478	1,0 AEM, 2,0 AETM
TSPE-AEM-2-AETM-1 (B1)	TSPE	813	AEM/AETM (67/33 mol/mol)	223/547	94 %	7152	2,0 AEM, AETM
TSAT-C6-AEM-1-AEBM-1 (B1)	TSAT-C6	822	AEM/AEBM (50/50 mol/mol)	223/385	96 %	6892	1,0 AEM, 1,0 AEBM
I-4: TSAT-C6-AEBM-1-AETM-1 (B1)	TSAT-C6	822	AEBM/AETM (50/50 mol/mol)	385/547	95 %	7216	1,0 AEBM, 1,0 AETM

Ejemplo 14 - **Conjugados de B1-insulina con sacáridos multivalentes usando sacáridos multivalentes prefabricados**

Usando el método descrito en el Ejemplo 11 y el fármaco que porta amina, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina (PM = 6,008 g/mol) del Ejemplo 8, los siguientes conjugados de insulina se prepararon a partir de ligandos multivalentes que contienen insulina presintetizados. El suberato de disuccinimidilo (DSS) y armazones de éster activado TSAT-C6 se adquirieron de Molecular Biosciences (Boulder, CO) y se usaron sin purificación adicional. Las moléculas divalentes AEM-2, AEBM-2 y AETM-2 que contienen una amina reactiva terminal se prepararon conjugando dos de cada uno de los ligandos a un armazón adecuado al que también está conjugada una amina reactiva. Las moléculas trivalentes AEM-3, AEBM-3 y AETM-3 que contienen una amina reactiva terminal se prepararon conjugando tres de cada uno de los ligandos a un armazón adecuado al que también está conjugada una amina reactiva. El medio de exclusión con un tamaño adecuadamente dimensionado es Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y el límite de peso molecular de la membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada es 3 kD.

En todos los casos, los grupos protectores BOC se retiraron disolviendo el polvo liofilizado obtenido de acuerdo con el Ejemplo 11 en TFA al 90 %/anisol a 10 % durante una hora a 4 °C, seguido de 10x superdisolución en tampón HEPES 25 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M. El pH se ajustó a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual el material se pasó a través de una columna Biogel P2 para retirar anisol, BOC y otros subproductos de la desprotección de bajo PM, así como cualquier otra sal contaminante. Después, la solución de conjugado acuosa, purificada y desprotegida se concentró usando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) al nivel deseado y se almacenó 4 °C hasta que se necesitó. Debido a que el material de NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina de partida únicamente posee un grupo amina libre en el extremo de Phe-B1, el Phe-B1 es el único sitio de conjugación de la insulina al armazón como se verificó en cada producto final desprotegido secuenciando el extremo N.

Conjugado	Condiciones de síntesis				Caracterización de conjugado esperada	
Identidad	**Armazón**	**PM del Armazón**	**Ligando**	**PM de AE-azúcar**	**PM (CL-EM)**	**Azúcar /Insulina**
DSS-(AEM-2)-1 (B1)	DSS	368	AEM-2	676	6621	2,0 AEM
DSS-(AEM-2)-1 (B1)	DSS	368	AEBM-2	1000	6945	2,0 AEBM
DSS-(AEM-2)-1 (B1)	DSS	368	AETM-2	1324	7269	2,0 AETM

DSS-(AEM-3)-1 (B1)	DSS	368	AEM-3	1085	7031	3,0 AEM
DSS-(AEM-3)-1 (B1)	DSS	368	AEBM-3	1571	7517	3,0 AEBM
DSS-(AEM-3)-1 (B1)	DSS	368	AETM-3	2057	8003	3,0 AETM
TSAT-C6-(AEM-2)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEM-2	676	7637	4,0 AEM
TSAT-C6-(AEBM-2)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEBM-2	1000	8285	4,0 AEBM
TSAT-C6-(AEM-2)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AETM-2	1324	8933	4,0 AETM
TSAT-C6-(AEM-3)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEM-3	1085	8046	6,0 AEM
TSAT-C6-(AEBM-3)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEBM-3	1571	9018	6,0 AEBM
TSAT-C6-(AEM-3)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AETM-3	2057	9990	6,0 AETM

Ejemplo 15 - **Conjugados de B1-insulina con sacáridos multivalentes usando un armazón dendrítico- ligando homogéneo**

Se disolvieron 0,1 g (0,098 mmol) de dendrón que contenía un núcleo de amino y cuatro grupos alquino terminales preparados en el Ejemplo 10b a 100 mg/ml en DMSO anhidro. La solución se añadió gota a gota a una solución que contenía suberato de disuccinimidilo (DSS, Molecular Biosciences, 0,098 mmol) y trietilamina (400 ul) y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, esta mezcla se añadió gota a gota a un solución 50 mg/ml que contenía la NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina (PM=6,008 g/mol) del Ejemplo 8 (0,588 g, 0,098 mmol) y se dejó reaccionar durante 2 horas.

El conjugado resultante se superdiluyó en agua y el pH se ajustó a 8,0. La solución se desaló usando BioGel P2, seguido de concentración utilizando dispositivos de ultrafiltración Amicon 3k. La solución resultante se purificó por cromatografía de fase inversa, se sometió a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó. Los grupos protectores BOC se retiraron disolviendo el polvo liofilizado en TFA al 90 %/anisol al 10 % durante una hora a 4 °C, seguido de 10x superdisolución en tampón HEPES 25 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M. El pH se ajustó a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual el material se pasó a través de una columna Biogel P2 para retirar anisol, BOC y otros subproductos de la desprotección de bajo PM, así como cualquier otra sal contaminante. Después, la solución de conjugado acuosa, purificada y desprotegida se concentró usando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) al nivel deseado y se almacenó 4 °C hasta que se necesitó. Debido a que el material de NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina de partida únicamente posee un grupo amina libre en el extremo de Phe-B1, el Phe-B1 es el único sitio de conjugación de la insulina al armazón como y se verificó en cada producto final desprotegido secuenciando el extremo N.

Ejemplo 16 - Síntesis de NH_2-B29-BOC2(A1,B1)-insulina

a. Fmoc-1-(B29)-insulina

En una síntesis típica, se disolvieron 4 g de insulina en polvo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en 100 ml de DMSO anhidro a temperatura ambiente, seguido de la adición de 4 ml de trietilamina (TEA). La solución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron lentamente 1,2 equivalentes de carbonato de 9-fluorenilmetil *N*-succinimidilo (Fmoc-NHS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a la solución de insulina-TEA como una solución 1,0 M del Fmoc-NHS en THF. La reacción se mezcló durante aproximadamente una hora. La reacción se interrumpió mediante la adición de 4 ml de una solución madre que contenía 250 ul de etanolamina en 5 ml de DMSO, seguido de mezclado durante cinco minutos. Después de inactivación, toda la solución se vertió en 1600 ml de acetona y se mezcló brevemente con una espátula. A continuación, se añadieron gota a gota 8 x 400 µl alícuotas de una solución al 18,9 % de HCl:agua sobre la superficie de la mezcla para precipitar la insulina reaccionada. Después, el material precipitado se centrifugó y el sobrenadante se decantó en un segundo vaso de precipitados mientras se separaba la torta de precipitado. A la solución de sobrenadante, se añadieron gota a gota 8 x 400 µl alícuotas más de una solución al 18,9 % de HCl:agua sobre la superficie de la mezcla para obtener un segundo precipitado de insulina reaccionada. El segundo precipitado se centrifugó y el sobrenadante se desechó. Las tortas de centrifugación combinadas de las dos etapas de precipitación se lavaron una vez con acetona, seguido de secado al vacío a temperatura ambiente para producir el polvo en bruto, que contiene normalmente un 20 % del producto Fmoc1, un 65 % del producto Fmoc2 y un 15 % de insulina sin reaccionar.

Se usó un método de HPLC preparativa de fase inversa para aislar la Fmoc1-insulina pura deseada del polvo en bruto. El tampón A es agua desionizada que contiene un 0,1 % de TFA y el tampón B es acetonitrilo que contiene un 0,1 % de TFA. El polvo en bruto se disolvió a 25 mg/ml en una mezcla de 70 % de A/30 % de B y se filtró mediante una jeringa antes de la inyección en la columna. Antes de la purificación, la columna (Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm) se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 70 % de A/30 % de B usando un sistema

Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución de polvo en bruto en la columna a un caudal de 15 ml/minuto durante el transcurso de 5 minutos, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 70 % de A/30 % de B a 62 % de A/38 % de B en el transcurso de los siguiente 3,5 minutos y se mantuvo ahí durante 2,5 minutos más. Usando este método, el pico de Fmoc1 deseado se eluyó aproximadamente 3 minutos después del pico de IHR sin reaccionar, seguido de cerca por el pico de Fmoc2-insulina. Una vez recogida, la solución se sometió a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener polvo de Fmoc1-insulina puro. La identidad se verificó por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA) y el sitio de conjugación se determinó secuenciando el extremo N (Western Analytical, St. Louis, MO).

b. BOC2(A1,B1)-Fmoc-(B29)-insulina

En una síntesis típica, Se disolvió 1 g de Fmoc1-(B29)-insulina en 25 ml de DMSO anhidro a temperatura ambiente, seguido de la adición de 1 ml de trietilamina (TEA). La solución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron lentamente 0,379 ml (2,2 equivalentes) de una solución de dicarbonato de di-*terc*-butilo/THF (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a la solución de insulina-TEA y se mezclaron durante aproximadamente una hora. La reacción se interrumpió mediante la adición de 1 ml de una solución madre que contenía 250 ul de etanolamina en 5 ml de DMSO, seguido de mezclado durante cinco minutos. Después de inactivación, toda la solución se vertió en 400 ml de acetona y se mezcló brevemente con una espátula. A continuación, se añadieron gota a gota 8 x 100 µl alícuotas de una solución al 18,9 % de HCl:agua sobre la superficie de la mezcla para precipitar la insulina reaccionada. Después, el material precipitado se centrifugó y el sobrenadante se decantó en un segundo vaso de precipitados mientras se separaba la torta de precipitado. A la solución de sobrenadante, se añadieron gota a gota 8 x 100 µl alícuotas más de una solución al 18,9 % de HCl:agua sobre la superficie de la mezcla para obtener un segundo precipitado de insulina reaccionada. El segundo precipitado se centrifugó y el sobrenadante se desechó. Las tortas de centrifugación combinadas de las dos etapas de precipitación se lavaron una vez con acetona, seguido de secado al vacío a temperatura ambiente para producir el polvo en bruto, que contiene normalmente más del 90 % del producto BOC2-Fmoc-1 deseado.

Se usó un método de HPLC preparativa de fase inversa para aislar la BOC2-Fmoc-1-insulina pura del polvo en bruto. El tampón A es agua desionizada que contiene un 0,1 % de TFA y el tampón B es acetonitrilo que contiene un 0,1 % de TFA. El polvo en bruto se disolvió a 25 mg/ml en una mezcla de 70 % de A/30 % de B y se filtró mediante una jeringa antes de la inyección en la columna. Antes de la purificación, la columna (Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm) se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 70 % de A/30 % de B usando un sistema Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución de polvo en bruto en la columna a un caudal de 15 ml/minuto durante el transcurso de 5 minutos, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 70 % de A/30 % de B a 62 % de A/38 % de B en el transcurso de los siguiente 3,5 minutos y se mantuvo ahí durante 2,5 minutos más. Usando este método, el pico de BOC2-Fmoc-1 deseado se eluyó aproximadamente 5 minutos después del material de partida de Fmoc1-insulina. Una vez recogida, la solución se sometió a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener polvo de BOC2(A1,B1)-Fmoc(B29)-insulina puro. La identidad se verificó por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA) y el sitio de conjugación se determinó secuenciando el extremo N (Western Analytical, St. Louis, MO).

c. NH_2-(B29)-BOC2(A1,B1)-insulina

El grupo protector Fmoc del BOC2(A1,B1)-Fmoc(B29) se retiró disolviendo el polvo liofilizado obtenido de acuerdo con la etapa previa en piperidina al 20 % en dimetilformamida (DMF) durante 30 minutos a 4 °C, seguido de 10x superdisolución en tampón HEPES 25 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M. El pH se ajustó a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual el material se pasó a través de una columna Biogel P2 para retirar Fmoc, DMF y otras sales contaminantes. La NH_2-(B29)-BOC2(A1,B1)-insulina se liofilizó en un polvo si se necesitó o se usó directamente en una solución acuosa si se deseaba.

Ejemplo 17 - Síntesis de conjugados de NH_2-B29-BOC2(A1,B1)-insulina

Todos los conjugados multivalentes de ligando-fármaco descritos en los ejemplos previos usando la NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina del Ejemplo 8 pueden prepararse en su lugar usando la NH_2-B29-BOC2(A1,B1)-insulina del Ejemplo 16. Todos los conjugados resultantes poseerán el mismo PM y grado de características de sustitución, pero el sitio de unión a la molécula de insulina estará en el grupo amino de epsilon B29 y no en el Phe-B1 de extremo N. Esto puede confirmarse secuenciando el extremo N.

Ejemplo 18 - Conjugación de fármaco funcionalizado con amina con ésteres activados multivalentes en disolvente orgánico (fármaco añadido en último lugar)

Este ejemplo describe una alternativa al método descrito en el Ejemplo 11, en el que el fármaco se añade al armazón antes que el ligando o ligandos. En este ejemplo, el ligando o ligandos se añaden al armazón antes que el fármaco.

Un armazón que contenía ésteres con el extremo N activado se disolvió a 60 mM en 1 ml de DMSO anhidro, seguido

de la adición de 400 ul (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agitó rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. En paralelo, se preparó una solución 122 mM de ligando en un volumen adecuado de DMSO anhidro. Una vez disuelta, se añadió gota a gota suficiente solución de ligando durante el transcurso de diez minutos para proporcionar un número de equivalentes de reactivo igual a exactamente el número de grupos éster activados en el armazón, N, menos uno. Por ejemplo, si había N=3 grupos éster activados en el armazón, entonces se añadieron (1x(3-1)x60 mM/122 mM) = 0,98 ml de solución de ligando. Si había N=4 grupos éster activados en el armazón, entonces se añadieron (1x(4-1)x60 mM/122 mM)=1,5 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de añadir la solución de ligando, la solución se agitó durante dos horas a temperatura ambiente.

Después, el fármaco que porta la amina se disolvió por separado en 7,5 ml de DMSO anhidro a una concentración de 8,1 mM. Una vez disuelta, toda la solución de fármaco se añadió en el transcurso de un minuto a la solución de armazón/DMSO/ligando/TEA, seguido de mezclado a temperatura ambiente durante dos horas más para asegurar una reacción completa.

Después, la solución resultante se superdiluye 10x en una solución salina tamponada con HEPES 20 mM de pH 5,0 que contiene NaCl 0,150 M, seguido de ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8,0. La solución acuosa se purificó en primer lugar por exclusión de tamaño usando una fase sólida adecuada para la separación deseada de los materiales conjugados y no conjugados. Después, la solución que pasó a través del volumen hueco de la columna se concentró usando una membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purificó adicionalmente para obtener el producto deseado usando HPLC preparativa de fase inversa en una columna Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm. El tampón A es agua desionizada que contiene un 0,1 % de TFA y el tampón B es acetonitrilo que contiene un 0,1 % de TFA. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 80 % de A/20 % de B usando un sistema Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución en bruto en la columna en el transcurso de 2 minutos a un caudal de 15 ml/minuto, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 80 % de A/20 % de B a 75 % de A/25 % de B durante los siguientes 5 minutos, seguido de un gradiente lineal más lento de 75 % de A/25 % de B a 62 % de A/38 % de B durante los siguientes 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado varía dependiendo del fármaco, el armazón y el ligando utilizados. Una vez recogida, la solución se sometió a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener un conjugado puro, cuya identidad pudo verificarse por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA).

Ejemplo 19 - **Conjugados de B29-insulina con sacáridos multivalentes producidos en un disolvente orgánico a partir de insulina no protegida**

Este ejemplo hace uso del hecho de que, en una insulina no protegida, el resto Lys-B29 epsilon-amino es la amina más reactiva, seguido del A1 y después el B1. Por lo tanto, cuando se utiliza insulina no protegida como el fármaco que contiene amina, el conjugado resultante debería estar predominantemente sustituido en la posición Lys-B29. Usando el método descrito en el Ejemplo 18 e insulina humana recombinante (PM=5808 Da, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como el fármaco que contiene amina, se prepararon los siguientes conjugados de insulina usando el armazón de éster activado TSAT-C6 adquirido de Molecular Biosciences (Boulder, CO). El AEM y el AETM se sintetizaron como se ha descrito previamente. El medio de exclusión con un tamaño adecuadamente dimensionado fue Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), y el límite de peso molecular de la membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada fue 3 kDa.

Conjugado	Armazón	PM del Armazón	Ligando	AE-azúcar	Pureza (HPLC)	PM (CL-EM)	Azúcar/ Insulina
I-7: TSAT-C6-AEM-2 (B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	93 %	6729	2,0
I-6: TSAT-C6-AETM-2 (B29)	TSAT-C6	822	AETM	547	95 %	7378	2,0

De acuerdo con la secuenciación del extremo N, aproximadamente un 85 % del armazón que contiene AEM estaba conjugado a la insulina a través del Lys-B29 y aproximadamente un 87 % del armazón que contiene AETM estaba conjugado a la insulina a través del Lys-B29.

Ejemplo 20 - **Conjugación de fármaco funcionalizado con amina con ésteres activados multivalentes en disolvente acuoso (fármaco añadido en último lugar)**

Este ejemplo describe una alternativa al método descrito en el Ejemplo 18 en el que la reacción se realiza en un disolvente acuoso en lugar de un disolvente orgánico.

El armazón que contenía ésteres con el extremo N activado se disolvió a 60 mM en 6,25 ml de DMSO anhidro, seguido de la adición de 2 ml (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agitó rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. En paralelo, se preparó una solución 448 mM de ligando en un volumen adecuado de DMSO anhidro. Una vez disuelta, se añadió gota a gota suficiente solución de ligando durante el transcurso de diez minutos para proporcionar un número de equivalentes de reactivo igual a 1,5 veces el número de grupos éster activados en

el armazón, N, menos uno. Por ejemplo, si había N=3 grupos éster activados en el armazón, entonces se añadieron (1,5x(3-1)x60 mM/448 mM)x6,25 ml = 2,5 ml de solución de ligando. Si había N=4 grupos éster activados en el armazón, entonces se añadieron (1,5x(4-1)x60 mM/448 mM)x6,25 ml = 3,8 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de añadir la solución de ligando, la solución se agitó durante una hora a temperatura ambiente.

Después, el fármaco que porta amina se disolvió por separado a 17,2 mM en 2,67 ml de un tampón de carbonato sódico 0,1 M de pH 11 y a continuación el pH se ajustó a 10,8 con hidróxido sódico 1,0 N. Una vez disuelta, toda la solución de armazón/DMSO/ligando/TEA se añadió gota a gota durante el transcurso de 75 minutos a la solución de fármaco/tampón carbonato. Durante la adición, el pH de la mezcla resultante se ajustó cada 5 minutos a 10,8, si fue necesario, usando HCl diluido o NaOH. La solución se dejó en agitación durante 15 minutos más después de la adición gota a gota para asegurar una reacción completa.

Después, la solución resultante se superdiluye 10x en una solución salina tamponada con HEPES 20 mM de pH 5,0 que contiene NaCl 0,150 M, seguido de ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8,0. La solución acuosa se purificó en primer lugar por exclusión de tamaño usando una fase sólida adecuada para la separación deseada de los materiales conjugados y no conjugados. Después, la solución que pasó a través del volumen hueco de la columna se concentró usando una membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada a aproximadamente 40 ml. Esta solución se purificó adicionalmente para obtener el producto deseado usando HPLC preparativa de fase inversa en una columna Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm. El tampón A es agua desionizada que contiene un 0,1 % de TFA y el tampón B es acetonitrilo que contiene un 0,1 % de TFA. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 80 % de A/20 % de B usando un sistema Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución en bruto en la columna en el transcurso de 2 minutos a un caudal de 15 ml/minuto, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 80 % de A/20 % de B a 75 % de A/25 % de B durante los siguientes 5 minutos, seguido de un gradiente lineal más lento de 75 % de A/25 % de B a 62 % de A/38 % de B durante los siguientes 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado varía dependiendo del fármaco, el armazón y el ligando utilizados. Una vez recogida, la solución se sometió a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener un conjugado puro, cuya identidad pudo verificarse por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA).

Ejemplo 21 - Conjugado de B29-AEM-2-insulina sintetizado en disolvente acuoso a partir de insulina no protegida

Este ejemplo hace uso del hecho de que, en una insulina no protegida, el resto Lys-B29 epsilon-amino es la amina más reactiva, seguido del A1 y después el B1. Por lo tanto, cuando se utiliza insulina no protegida como el fármaco que contiene amina, el conjugado resultante debería estar predominantemente sustituido en la posición Lys-B29. Usando el método descrito en el Ejemplo 20 e insulina humana recombinante (PM=5808, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como el fármaco que contiene amina, se preparó un conjugado de AEM-2 insulina usando el armazón de éster activado TSAT-C6 armazón adquirido de Molecular Biosciences (Boulder, CO). El AEM usado como el análogo de insulina se sintetizó como se ha descrito previamente. El medio de exclusión con un tamaño adecuadamente dimensionado fue Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y el límite de peso molecular de la membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada fue 3 kD. Se descubrió que el producto final (95 % puro según HPLC) tenía el PM deseado de 6729 g/mol (CL-EM), representando un total de 2,0 moléculas de AEM conjugadas por insulina, con más del 85 % de las moléculas de conjugado conjugadas en el sitio de Lys-B29 (secuenciación del extremo N).

Ejemplo 22 - Conjugación generalizada de fármaco funcionalizado con amina armazón que contiene aldehído

a. Armazón funcionalizado con más de un ligando y un aldehído terminal

En primer lugar, un armazón que contenía ésteres con el extremo N activado se disolvió a 60 mM en 27,0 ml de DMSO anhidro, seguido de la adición de 800 ul (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agitó rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se preparó una solución madre de dietilacetal que porta amina a 580 mM en 5 ml de DMSO anhidro. Una vez disuelta, se añadieron gota a gota 2,9 ml de la solución de dietilacetal durante el transcurso de 5 minutos a la solución de armazón/DMSO/TEA, seguido de mezclado a temperatura ambiente durante 15 minutos más. Después, el resto de ésteres activados se hicieron reaccionar con ligandos funcionalizados con amina de la siguiente manera. Una solución 370 mM de ligando se preparó en un volumen adecuado de DMSO seco. Una vez disuelta, se añadió suficiente solución para proporcionar un número de equivalentes reactivos igual a 1,5 veces el número de grupos éster activados inicial, N, menos uno. Por ejemplo, si había N=3 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añadieron (1,5x(3-1)x60 mMx27/370 mM)= 13 ml de solución de ligando. Si había N=4 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añadieron (1,5x(4-1)x60 mMx27/370 mM)= 20 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de añadir la solución de ligando, la solución se agitó durante una hora y 45 minutos más a temperatura ambiente para asegurar una reacción completa. Tras la reacción, toda la solución se diluyó en un factor de diez con éter dietílico, se mezcló vigorosamente y se centrifugó para separar la fase densa de la parte inferior que contenía el material deseado del sobrenadante. Después de desechar el sobrenadante, se añadió el mismo volumen de etanol para generar una

masa sólida precipitada. Después de centrifugar y desechar el sobrenadante, el material se lavó extensamente con etanol y éter, y después se secó al vacío para producir el armazón en bruto que contiene múltiples ligandos y un grupo dietilacetal.

b. Conjugación de fármaco funcionalizado con amina con aldehído terminal

Una vez seco, el grupo aldehído se generó a partir del dietilacetal disolviendo el material recogido en 60 ml de agua DI con el pH de la solución ajustado a 1,0. La solución se mezcló durante 30 minutos, después de lo cual se añadieron 6 ml de un tampón HEPES 200 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 1,5 M y el pH de la solución se ajustó a 6,5 usando una solución diluida de NaOH. Se añadieron 48 mmol del fármaco que contiene amina a la solución y el pH se reajustó a 6,5 si fue necesario. Por separado, se preparó una solución madre de agente reductor disolviendo 1,5 g de cianoborohidruro sódico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en 15 ml de un tampón HEPES 20 mM de pH 7,0 que contenía NaCl 0,150 M y el pH se ajustó cuidadosamente a 6,5 con una solución diluida de HCl. Se añadieron 13 ml de la solución madre de cianoborohidruro a la solución de fármaco/armazón/aldehído y se dejaron reaccionar durante una noche a temperatura ambiente.

La solución acuosa resultante se purificó en primer lugar por exclusión de tamaño usando una fase sólida adecuada para la separación deseada de los materiales conjugados y no conjugados. Después, la solución que pasó a través del volumen hueco de la columna se concentró usando una membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purificó adicionalmente para obtener el producto deseado usando HPLC preparativa de fase inversa en una columna Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm. El tampón A es agua desionizada que contiene un 0,1 % de TFA y el tampón B es acetonitrilo que contiene un 0,1 % de TFA. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 80 % de A/20 % de B usando un sistema Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución en bruto en la columna en el transcurso de 2 minutos a un caudal de 15 ml/minuto, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 80 % de A/20 % de B a 75 % de A/25 % de B durante los siguientes 5 minutos, seguido de un gradiente lineal más lento de 75 % de A/25 % de B a 62 % de A/38 % de B durante los siguientes 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado varía dependiendo del fármaco, el armazón y el ligando utilizados. Una vez recogida, la solución se sometió a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener un conjugado puro, cuya identidad pudo verificarse por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA).

Ejemplo 23 - Armazón de AEM-2 que contiene un grupo aldehído reactivo terminal y posterior conjugación de insulina en B1

a. TSAT funcionalizado con 2 AEM y 1 aminobutiraldehído dietil acetal (ABDA)

Este material se sintetizó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 22a usando TSAT (Molecular Biosciences, Boulder, CO) como el armazón de éster activado multivalente y 4-aminobutiraldehído dietil acetal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como el dietilacetal que porta amina. AEM (PM = 223 g/mol), sintetizado como se ha descrito anteriormente, se usó como ligando.

b. Conjugación de TSAT-AEM-2-ABDA con NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina

Este material se sintetizó usando el método descrito en el Ejemplo 22b y el TSAT-AEM-2-ABDA producido en el punto (a) anterior, junto con el fármaco que porta amina, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina (PM = 6,008 g/mol), sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 8. El medio de exclusión con un tamaño adecuadamente dimensionado fue Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y el límite de peso molecular de la membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada fue 3 kD. Debido a que el material de NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina de partida únicamente posee un grupo amina libre en el extremo de Phe-B1, el Phe-B1 es el único sitio de conjugación de insulina al armazón. Los grupos protectores BOC se retiraron disolviendo el polvo liofilizado en TFA al 90 %/anisol al 10 % durante una hora a 4 °C, seguido de 10x superdisolución en tampón HEPES 25 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M. El pH se ajustó a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual el material se pasó a través de una columna de Biogel P2 para retirar anisol, BOC y otros subproductos de la desprotección de bajo PM, así como cualquier otra sal contaminante. Después, la solución de conjugado acuosa, purificada y desprotegida se concentró usando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) al nivel deseado y se almacenó 4 °C hasta que se necesitó.

Se descubrió que el producto final (95 % puro según HPLC) tenía el PM deseado de 6462 g/mol (CL-EM), representando un total de 2,0 moléculas de AEM conjugadas por insulina, el 99 % de las cuales se conjugaron en el sitio Phe-B1 (secuenciación del extremo N).

Ejemplo 24 - Armazón de AEM-3 que contiene un grupo aldehído terminal y posterior conjugación de insulina en B1

a. TSPE funcionalizado con 3 AEM y 1 aminobutiraldehído dietil acetal (ABDA)

Este material se sintetizó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 22a usando TSPE (Molecular Biosciences, Boulder, CO) como el armazón de éster activado multivalente y 4-aminobutiraldehído dietil acetal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como el dietilacetal que porta amina. AEM (PM = 223 g/mol), sintetizado como se ha descrito previamente, se usó como el ligando.

b. Conjugación de TSPE-AEM-3-ABDA con NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-Insulina

Este material se sintetizó usando el método descrito en el Ejemplo 22b y el TSPE-AEM-3-ABDA producido en el punto (a) anterior, junto con el fármaco que porta amina, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina (PM = 6,008 g/mol), sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 8. El medio de exclusión con un tamaño adecuadamente dimensionado fue Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y el límite de peso molecular de la membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada fue 3 kD. Debido a que el material de NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina de partida únicamente posee un grupo amina libre en el extremo de Phe-B1, el Phe-B1 es el único sitio de conjugación de insulina al armazón. Los grupos protectores BOC se retiraron disolviendo el polvo liofilizado en TFA al 90 %/anisol al 10 % durante una hora a 4 °C, seguido de 10x superdisolución en tampón HEPES 25 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M. El pH se ajustó a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual el material se pasó a través de una columna de Biogel P2 para retirar anisol, BOC y otros subproductos de la desprotección de bajo PM, así como cualquier otra sal contaminante. Después, la solución de conjugado acuosa, purificada y desprotegida se concentró usando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) al nivel deseado y se almacenó 4 °C hasta que se necesitó.

Se descubrió que el producto final (95 % puro según HPLC) tenía el PM deseado de 6897 g/mol (CL-EM), representando un total de 3,0 moléculas de AEM conjugadas por insulina, el 99 % de las cuales se conjugaron en el sitio Phe-B1 (secuenciación del extremo N).

Ejemplo 25 - Bastidor de AEM-3 que contiene un grupo aldehído reactivo terminal y posterior conjugación de insulina en B1 usando insulina no protegida

a. TSPE funcionalizado con 3 AEM y 1 aminobutiraldehído dietil acetal (ABDA)

Este material se sintetizó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 22a usando TSPE (Molecular Biosciences, Boulder, CO) como el bastidor de éster activado multivalente y 4-aminobutiraldehído dietil acetal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como el dietilacetal que porta amina. AEM (PM = 223 g/mol), sintetizado como se ha descrito previamente, se usó como el ligando.

b. Conjugación de TSPE-AEM-3-ABDA con NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-Insulina

Este material se sintetizó usando el método descrito en el Ejemplo 22b y el TSPE-AEM-3-ABDA producido en el punto (a) anterior, junto con el fármaco que porta amina, insulina no modificada (PM = 5,808 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El medio de exclusión con un tamaño adecuadamente dimensionado fue Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y el límite de peso molecular de la membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada fue 3 kD. Aunque el material de partida de insulina no protegida posee tres grupos amina libres, la Phe-B1 es el sitio predominante de conjugación de insulina al bastidor debido al hecho de que la Phe-B1 (pKa ~ 6,8) es la amina más reactiva a pH 6,5. El polvo liofilizado se disolvió en tampón HEPES 25 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M. El pH se ajustó a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual se concentró usando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) al nivel deseado y se almacenó 4 °C hasta que se necesitó.

Se descubrió que el producto final (95 % puro según HPLC) tenía el PM deseado de 6897 g/mol (CL-EM), representando un total de 3,0 moléculas de AEM conjugadas por insulina, >85 % de las cuales se conjugaron en el sitio Phe-B1 (secuenciación del extremo N).

Ejemplo 26 - Química de armazón mixto y conjugación separada correspondiente del fármaco y los ligandos

Puede adquirirse benzoato de succinimidil-3,5-dimaleimidofenilo (SDMB) de Molecular Biosciences (Boulder, CO) y se usarse en el siguiente ejemplo sin purificación adicional. Se disolvió SDMB a 60 mM en 1,0 ml de DMSO anhidro, seguido de la adición de 400 ul (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agitó rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, el fármaco que porta la amina se disolvió por separado en 7,5 ml de DMSO anhidro a una concentración de 8,1 mM. Una vez disuelta, toda la solución de SDMB se añadió gota a gota durante el transcurso de diez minutos a la solución de fármaco en DMSO, seguido de mezclado a temperatura ambiente durante dos horas más para asegurar una reacción completa.

Después, la solución resultante se superdiluye 10x en una solución salina tamponada con HEPES 20 mM de pH 5,0 que contiene NaCl 0,150 M, seguido de ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8,0. La solución acuosa se purificó en primer lugar por exclusión de tamaño usando una fase sólida adecuada para la separación deseada de los materiales conjugados y no conjugados. Después, la solución que pasó a través del volumen hueco de la columna se concentró usando una membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada a aproximadamente

10 ml.

Por separado, se disolvieron 6,0 mmol de un ligando que contiene amina en una solución salina tamponada con HEPES 20 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M a una concentración de 450 mM. A esta solución, se añadieron 6,6 mmol de iminotiolano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se dejaron reaccionar a pH 8,2 durante 30 minutos a temperatura ambiente para convertir los grupos terminales de amina en grupos terminales de sulfhidrilo. El material resultante se mezcló con la solución de 10 ml de conjugado de fármaco-armazón-di-maleimida producida en la etapa previa. Los grupos maleimida se dejaron reaccionar con los grupos sulfhidrilo análogos de indicador a pH 8,2 durante 2 horas para asegurar una reacción completa. Después, la solución resultante se purificó por exclusión de tamaño usando una fase sólida adecuada para la separación deseada de los materiales conjugados y no conjugados. Después, la solución que pasó a través del volumen hueco de la columna se concentró usando una membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada a aproximadamente 10 ml.

Finalmente, esta solución se purificó adicionalmente para obtener el producto deseado usando HPLC preparativa de fase inversa en una columna Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm. El tampón A es agua desionizada que contiene un 0,1 % de TFA y el tampón B es acetonitrilo que contiene un 0,1 % de TFA. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 80 % de A/20 % de B usando un sistema Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución en bruto en la columna en el transcurso de 2 minutos a un caudal de 15 ml/minuto, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 80 % de A/20 % de B a 75 % de A/25 % de B durante los siguientes 5 minutos, seguido de un gradiente lineal más lento de 75 % de A/25 % de B a 62 % de A/38 % de B durante los siguientes 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado varía dependiendo del fármaco, el armazón y el ligando utilizados. Una vez recogida, la solución se sometió a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener un conjugado puro, cuya identidad pudo verificarse por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA).

Ejemplo 27 - **Insulina conjugada con sacáridos de aminoetilo usando química de armazón mixto**

Usando el método descrito en el Ejemplo 26 y el fármaco que porta amina, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina (PM = 6,008 g/mol), sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 8, se obtuvieron los siguientes conjugados de fármaco específicos. AEM (PM = 223 g/mol), AEBM (PM = 385 g/mol) y AETM (PM = 547 g/mol) se sintetizaron como se ha descrito previamente y se usaron como los ligandos en la síntesis. El medio de exclusión con un tamaño adecuadamente dimensionado es Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y el límite de peso molecular de la membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada es 3 kD.

En todos los casos, los grupos protectores BOC se retiraron disolviendo el polvo liofilizado obtenido de acuerdo con el Ejemplo 26 en TFA al 90 %/anisol a 10 % durante una hora a 4 °C, seguido de 10x superdisolución en tampón HEPES 25 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M. El pH se ajustó a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual el material se pasó a través de una columna Biogel P2 para retirar anisol, BOC y otros subproductos de la desprotección de bajo PM, así como cualquier otra sal contaminante. Después, la solución de conjugado acuosa, purificada y desprotegida se concentró usando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) a aproximadamente 58 U de insulina/ml (basándose en mediciones de A280) y se almacenaron a 4 °C hasta que se necesitaron. Debido a que el material de NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina de partida únicamente posee un grupo amina libre en el extremo de Phe-B1, el Phe-B1 será el único sitio de conjugación de insulina al armazón. Esto puede verificarse en cada producto final desprotegido secuenciando el extremo N.

Condiciones de síntesis			**Caracterización de conjugado esperada**	
Ligando	**PM de AE-azúcar**	**PM del intermedio de AE-iminotiolano**	**PM (CL-EM)**	**Azúcar/Insulina**
AEM	223	360	6822	2,0 AEM
AEBM	385	522	7146	2,0 AEBM
AETM	547	684	7470	2,0 AETM

Ejemplo 28 - Química de click generalizada para conjugación de fármaco con armazones complementarios

Un armazón (8,3 mmol) que contenía al menos una funcionalidad amino y uno o más grupos alquino terminales se recogió en THF (40 ml), agua (40 ml) y se agitó en solución. Se añadió un fármaco que porta un grupos azidoetilo (10,51 mmol), seguido de sulfato de cobre (500 mg, 2,0 mmol) y ascorbato sódico (400 mg, 2,0 mmol). La mezcla resultante se agitó a 55-60 °C (baño de aceite) durante 6 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se agitó durante una noche y se concentró al vacío a la mitad del volumen y se filtró a través de un filtro de microfibra de vidrio. El filtrado se cargó en una columna de resina (Dowex 50w 50x4-100) y se eluyó con agua (6 x 75 ml) hasta que fue neutro. Después, la columna se eluyó con hidróxido de amonio al 15 % (10 x 75 ml) y las fracciones positivas a nihidrina se combinaron y se concentraron para dar una espuma vítrea.

Ejemplo 29 - Conjugados preparados usando insulinas naturales de otras especies, tales como bovina y

porcina

Las insulinas de otras especies que contienen al menos una funcionalidad amina reactiva (por ejemplo, insulina bovina y porcina) pueden acoplarse usando cualquiera de los métodos usados para conjugar insulina humana. Los expertos en la materia apreciarán que los pesos moleculares de los conjugados resultantes preparados a partir de insulinas bovina y porcina diferirán de las preparadas a partir de insulina humana en las cantidades listadas en la siguiente tabla.

Tipo de insulina	Peso molecular (g/mol)	Diferencia de PM con insulina humana (g/mol)
Insulina humana	5808	-
Insulina porcina	5778	-30
Insulina bovina	5733	-75

Los expertos en la materia también apreciarán que los conjugados resultantes preparados a partir de insulinas bovina o porcina pueden tener tiempos de retención de picos cromatográficos que difieren ligeramente de los conjugados preparados a partir de insulina humana, debido a las pequeñas diferencias de estructura entre las insulinas.

Ejemplo 30 - **Conjugados preparados con análogos de insulina, tales como lispro, aspart, glulisina, glargina y detemir**

Todos los análogos de insulina que contienen al menos una funcionalidad de amina reactiva (por ejemplo, lispro, aspart, glulisina, glargina y detemir) pueden acoplarse usando cualquiera de los métodos usados para conjugar insulina humana. Los expertos en la materia apreciarán que los pesos moleculares de los conjugados resultantes preparados a partir de análogos de insulina diferirán de los preparados a partir de insulina humana en las cantidades listadas en la siguiente tabla.

Tipo de insulina	Peso molecular (g/mol)	Diferencia de PM con insulina humana (g/mol)
Insulina humana	5808	-
Insulina lispro	5808	-
Insulina aspart	5832	+24
Insulina glulisina	5823	+15
Insulina glargina	6063	+255
Insulina detemir	5913	105

Los expertos en la materia también apreciarán que los conjugados resultantes preparados a partir de análogos de insulina pueden tener tiempos de retención de picos cromatográficos que difieren ligeramente de los conjugados preparados a partir de insulina humana, debido a las pequeñas diferencias de estructura entre las insulinas.

El uso de insulina glulisina (que no contiene una lisina de B29, sino lisina de B3) dará predominantemente conjugados de B3 cuando se use insulina glulisina no protegida. Sin embargo, si se desean conjugados de insulina glulisina de B1, entonces se sintetiza en primer lugar BOC-(A1,B3)-insulina glulisina usando el mismo protocolo que BOC-(A1,B29)-insulina humana que se describe en el Ejemplo 8.

Ejemplo 31 - Conjugados preparados con conjugados secretagogos de insulina peptídica

Pueden acoplarse secretagogos de insulina peptídica (por ejemplo, sin limitación, GLP-1 o la exatinida análoga a GLP-1) que contienen una funcionalidad amina en el extremo N usando cualquiera de los métodos usados para conjugar insulina.

II. Ensayos *in vitro* de conjugados a modo de ejemplo

Este segundo conjunto de ejemplos describen diversos experimentos que investigan las propiedades *in vitro* de algunos conjugados a modo de ejemplo.

Ejemplo 32 - Síntesis de conjugados de insulina-glicógeno

Este ejemplo comparativo describe la síntesis de un conjugado de insulina-glicógeno de acuerdo con la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20070099820. En resumen, Se disuelve 1 g de glicógeno de ostras no purificado disponible en el mercado (Tipo II, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en agua desionizada a una concentración de 10 mg/ml. Se añade CNBr sólido a la solución resultante a una proporción de mase de CNBr con respecto a glicógeno de 0,68 y el pH se mantiene constante a 10,7 +/- 0,2 usando una solución 3 N de hidróxido sódico

(NaOH). Después de agitar durante 15 minutos, se añade otra mase igual de CNBr sólido y el pH se mantiene constante a 10,7 +/- 0,2 mientras se agita durante 45 minutos. Después, se añade insulina a o la solución a una proporción de mase de insulina con respecto a glicógeno de 0,60 y el pH se ajusta a 9,15 usando bicarbonato sódico sólido. La solución se agita durante una noche, se ultrafiltra exhaustivamente con agua desionizada usando un filtro de membrana de disco de polietersulfona MWCO de 50 kDa (Millipore, Bedford, MA) y se liofiliza. Después, el polvo resultante se purifica de insulina no conjugada mediante HPLC de filtración en gel (Waters, Milford, MA) usando una fase móvil de ácido acético 1 M ácido acético sobre una columna empaquetada Superdex™ 30 HiLoad 16/60 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Después, la fracción de glicógeno de insulina se liofiliza para obtener el conjugado en forma de un polvo puro de color blanco. El material purificado resultante contenía un 1,0 % en peso de insulina por conjugado de insulina-glicógeno según se midió usando análisis de aminoácidos (UCLA Biopolimers Laboratory, Los Angeles, CA).

Ejemplo 33 - **Análisis de cromatografía líquida**

Este ejemplo describe las diferencias entre los perfiles de HPLC FI de insulina-glicógeno sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 32 y un conjugado a modo de ejemplo sintetizado de acuerdo con la presente invención. Se inyectaron por separado 100 ul de una solución 5 mg/ml de insulina-glicógeno sintetizado de acuerdo con Ejemplo 32 y 100 ul de una solución 1 mg/ml de conjugado a modo de ejemplo en una columna Waters Symmetry C8, 5 um (4,6 mm x 250 mm), equilibrada con una fase móvil de 80 % de agua/20 % de acetonitrilo (CH_3CN) (conteniendo cada uno un 0,1 % de TFA). El conjugado a modo de ejemplo usado en este estudio se sintetizó usando TSAT-C6 como armazón, AEM como ligando y NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina como fármaco.

Las muestras se eluyeron a 1,0 ml/minuto usando el siguiente método de gradiente: 0-5 minutos - constante de 80 % de agua/20 % de CH_3CN, 5-35 minutos - gradiente lineal a 50 % de agua/50 % de CH_3CN. Los perfiles de elusión en la Figura 1 muestran un solo pico para el conjugado a modo de ejemplo, lo que indica una sola especie química distinta en comparación con el perfil amplio y heterogéneo para el conjugado de insulina-glicógeno, indicando una amplia distribución de entidades químicas y/o de peso molecular diferentes.

Ejemplo 34 - **Análisis de distribución del peso molecular**

Este ejemplo describe la diferencia en PM y distribución del PM entre la insulina-glicógeno sintetizada de acuerdo con el Ejemplo 32 y el mismo conjugado a modo de ejemplo. El PM y la distribución del PM del conjugado de insulina-glicógeno se determinó inyectando 1 ml de una solución 25 mg/ml en solución salina tamponada con HEPES de pH 7 en una columna de exclusión por tamaño Ultrahidrogel (Waters Corporation, Millford, MA) equilibrada con solución salina tamponada con HEPES. La columna se eluyó en el transcurso de 30 minutos a 0,5 ml por min, y el perfil de elusión se midió como una absorbancia a 280 nm. En experimentos separados usando el mismo protocolo, se inyectaron patrones de PM de dextrano de 1000, 5000, 12000, 25000, 50000, 80000, 150000, 270000 y 410000 g/mol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para establecer una curva de calibración del PM frente al tiempo de retención. Basándose en la curva de calibración y el perfil de elusión del conjugado de insulina-glicógeno, se determinó que el PM promedio era 500.000 g/mol con el 67 % de la distribución eluyéndose el amplio intervalo de 250.000 a 1.000.000 g/mol (datos no mostrados). Por el contrario, se determinó que el conjugado a modo de ejemplo tiene un solo PM de exactamente 6,730 g/mol según se determinó por CL/EM (HT Laboratories, San Diego, CA) (datos no mostrados).

Ejemplo 35 - Estabilidad química y física de conjugados

Este ejemplo compara la estabilidad de un conjugado a modo de ejemplo con la de insulina no conjugada en condiciones aceleradas de acuerdo con el método descrito en Hinds et al. (Bioconj. Chem. 11:195-201, 2000) a 37 °C y una velocidad de agitación mecánica de 150 golpes/min. Se seleccionó insulina humana recombinante de calidad farmacéutica (IHR) como el control para el estudio de estabilidad acelerado. Holcombe et al. (Diabetes Care 27:1241-1242, 2004) describe que la estabilidad de la IHR en condiciones no aceleradas se mantiene durante al menos 30 días a temperatura ambiente (TA) y un tiempo considerablemente mayor cuando se refrigera. La Figura 2 muestra los resultados del ensayo de estabilidad de agregación para IHR y dos conjugados a modo de ejemplo en solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4 (PBS) a 50 U/ml. En todos los casos, el % restante en la solución se determinó centrifugando (4500xg, 5 min) la solución en un momento dado, midiendo la A280 del sobrenadante y dividiendo la A280 del sobrenadante entre la de la solución de partida original. El conjugado **I-1** (véase Figura 45) se sintetizó usando TSAT-C6 como armazón, AEM como ligando y NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina como fármaco. El conjugado **I-16** (véase Figura 45) se sintetizó usando TSPE como armazón, AEM como ligando y NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina como fármaco.

Después de 48 horas de agitación continua a 37 °C, menos de un 6 % de la IHR permanecía estable en la solución, con la mayoría de la IHR precipitada como agregados insolubles. Después de la misma cantidad de tiempo, ambos conjugados permanecieron sustancialmente más estables, puesto que un 96 %- 99 % de los conjugados permanecía intacto y soluble en la solución de PBS. Los datos muestran concluyentemente que los conjugados son significativamente más estables que la IHR en estas condiciones.

Se utilizó HPLC FI se usó para evaluar la estabilidad química de los conjugados (véase Figura 3a). Después de 48 horas es ensayo estabilidad acelerado, las soluciones de conjugado se analizaron usando una columna de fase inversa C8 usando un gradiente de elusión de agua-acetonitrilo. Los tiempos de retención de las muestras de conjugado antes y después del ensayo de estabilidad se muestran junto con el porcentaje de insulina no conjugada (libre) y desamido insulina encontrada en las trazas de CL resultantes. No se observaron cantidades detectables de insulina libre o desamido insulina, indicando que (i) la unión covalente entre los sacáridos y la molécula de insulina es estable, y (ii) no sucede ninguna degradación química significativa del conjugado durante el ensayo de estabilidad acelerada (AST). Antes de, y en paralelo, con el AST, el conjugado también se sometió a un ensayo de estabilidad no acelerado de 90 días que incluyó un ciclo térmico diario entre 4 °C y TA. A la finalización del estudio en paralelo, la HPLC FI demostró que el conjugado todavía era químicamente y físicamente estable (datos no mostrados).

Se proporciona una confirmación adicional de la estabilidad del conjugado en tampón HEPES a partir de los datos de CL-EN obtenidos antes y después de someter el conjugado al AST. Curiosamente, las muestras de conjugado en el AST de 48 horas en PBS mostraron que había sucedido una degradación sustancial, mientras que las muestras de conjugado en el AST de 48 horas en tampón HEPES estaban completamente intactas y eran estables (véase Figura 3b). El conjugado **I-7** almacenado en HEPES tiene un PM de 6730 Da antes y después del AST, demostrando que los residuos de manosa, el armazón de conjugado y la insulina permanecen químicamente sin cambios y bastante estables. Para asegurar la estabilidad del conjugado, todos los tampones usados para el almacenaje, ensayo *in vitro* y ensayo *in vivo* contienen HEPES como agente tamponante. En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un conjugado de la invención en un tampón HEPES.

Los datos de CL-EM mejoran en gran medida el cumplimiento normativo de fabricación de la FDA, puesto que el ensayo de CL-EM puede actuar fácilmente como ensayo de identidad química del conjugado. Puesto que el fármaco (por ejemplo, insulina), el armazón de conjugado y el conjugado tienen todos pesos moleculares discretos, puede calcularse fácilmente la proporción de ligando resultante restando el PM del armazón de conjugado del PM del conjugado para dar la masa restante debida a los grupos sacáridos. En el caso del conjugado **I-7**, la proporción molar de manosa:insulina se calcula exactamente como 2,0.

Ejemplo 36 - Estabilidad funcional de los conjugados

Tras demostrar que un conjugado era química y físicamente estable, se evaluó el conjugado AST a las 72 horas para determinar su bioactividad subcutánea *in vivo* frente al conjugado reciente usando ratas Sprague-Dawley a 5 U/kg (véase la Figura 4).

El análisis de los datos del conjugado HEPES AST a las 72 horas mostró que el tiempo para alcanzar el nadir de la glucosa (T_{nadir}) fue de 60 minutos, y el tiempo para volver al 70 % de los valores de la glucosa en sangre en ayunas (T_{70} $\%_{BG}$) fue menor de 128 **±** 15 min. Una comparación de las curvas de bioactividad del conjugado reciente frente al conjugado AST a las 72 horas en cada punto temporal usando el test de la t de Student (n=4 para cada grupo) no mostró diferencias significativas (todos los valores p > 0,21). Estos resultados estuvieron dentro de las dianas especificadas para la formulación, indicando que la estabilidad química del conjugado preservada se traduce en un comportamiento funcional *in vivo* preservado.

III. Ensayos *in vivo* de conjugados ilustrativos

Este tercer conjunto de ejemplos describe diversos experimentos que investigan las propiedades *in vivo* de algunos conjugados ilustrativos.

Ejemplo 37 - Bioactividad del conjugado frente a IHR y dextrano o conjugados de glucógeno

(a) Bioactividad de insulina-dextrano

Este ejemplo comparativo evalúa el perfil farmacodinámico *in vivo* de la insulina-dextrano administrada por vía subcutánea (Sigma-Aldrich, MW ~ 70K). Como se muestra a continuación, los conjugados de insulina-dextrano sintetizados de acuerdo con la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040202719 actúan de forma relativamente lenta tras la inyección subcutánea, debido a que el MW alto del polímero conjugado impide significativamente la tasa de absorción en la circulación sistémica. Se sintetizó la insulina-dextrano usando una reacción de acoplamiento modificada del bromuro de cianógeno (CNBr). En resumen, 500 mg de dextrano (MW = 70K, Sigma-Aldrich) se disolvieron en 50 ml de agua desionizada. se añadieron 56 mg de CNBr sólido a la solución resultante y se mantuvo el pH a 10,7 ± 0,2 usando una solución de NaOH 5 N. Después de agitar durante 15 min, se añadieron otros 56 mg de CNBr sólido y se mantuvo el pH a 10,7 ± 0,2 agitando a la vez durante 45 minutos. a continuación se añadieron 300 mg de insulina humana recombinante (IHR) a la solución, y se ajustó el pH a 9,15 usando bicarbonato de sodio sólido. La solución se agitó durante la noche, se ultrafiltró exhaustivamente frente a agua DI usando un filtro de membrana de disco de poliétersulfona de MWCO 10K (Millipore, Bedford, MA), y se liofilizó. A continuación se purificó el polvo resultante a partir de la insulina sin conjugar mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (Waters, Milford, MA) usando una fase móvil de ácido acético 1 M sobre una columna empaquetada Superdex™ 75 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). A continuación se liofilizó la fracción de

insulina-dextrano para obtener el conjugado como un polvo puro. El grado de conjugación de la insulina era del 10 % (p/p) como se determinó mediante el análisis de aminoácidos (UCLA Biopolymers Laboratory, Los Ángeles, CA).

Se administraron inyecciones subcutáneas de la insulina-dextrano usando 0,25 ml de una solución 1x PBS esterilizada (20 U de insulina equivalente/ml) detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 200-250 g, n = 4). Se recogieron las muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a -15 y 0 minutos, y a 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos después de la inyección. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Como se muestra en la Figura 5, se descubrió que los tiempos para alcanzar la concentración nadir de la glucosa (T_{nadir}) eran aproximadamente de 3 horas después de la inyección, y los niveles de glucosa en suero siguen estando deprimidos durante al menos cinco horas después de la inyección.

(b) Bioactividad de insulina-glucógeno

Este ejemplo evalúa el perfil farmacodinámico in vivo de la insulina-glucógeno administrada por vía subcutánea. Se sintetizó el conjugado de insulina-glucógeno de acuerdo con el Ejemplo 32. Se evaluó la bioactividad del conjugado de insulina-glucógeno inyectando una dosis de 2,5 U equivalentes de insulina/kg por detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 200-250 g, n = 4). Se recogieron las muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a -15 y 0 minutos, y a 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos después de la inyección. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). En comparación con los conjugados de insulina-dextrano anteriores, los niveles de glucosa de los conjugados de insulina-glucógeno de alto MW disminuyeron mucho más rápidamente y en una mayor extensión (véase la Figura 6). Esta rápida acción y el perfil de eliminación es debido a la rápida digestión enzimática de la cadena de polímero de glucógeno de alto MW tras la inyección subcutánea.

(c) Un conjugado ilustrativo y bioactividad de IHR

Este ejemplo evalúa y compara el perfil farmacodinámico *in vivo* de un conjugado ilustrativo administrado por vía subcutánea y la insulina humana recombinante (IHR). El conjugado ilustrativo, **I-1** en la Figura 45, se sintetizó usando TSAT-C6 como bastidor, AEM como análogo del indicador, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina como fármaco. En cada caso, el conjugado o IHR se inyectó a 3,5 U/kg por detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 400-500 g, n = 6). Se recogieron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a los 0 minutos y a 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Como se muestra en la Figura 7, los perfiles de depresión de la glucosa para la IHR y el conjugado ilustrativo son casi idénticos a pesar de la incapacidad del conjugado ilustrativo de ser digerido enzimáticamente *in vivo*. La rápida acción y los perfiles de eliminación del conjugado se deben más probablemente al hecho de que el conjugado sea solo un 14 % más grande que la IHR convirtiendo en poco importante el posible efecto del MW mayor en términos de propiedades farmacodinámicas.

Ejemplo 38 - Comparación PK con la IHR

Este ejemplo describe y compara los perfiles de insulina en suero obtenidos a partir de un conjugado ilustrativo administrado por vía subcutánea y la insulina humana recombinante (IHR). El conjugado ilustrativo, **I-1** en la Figura 45, se sintetizó usando TSAT-C6 como armazón, AEM como ligando, y NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina como fármaco. En cada caso, el conjugado o IHR se inyectó a 3,5 U/kg por detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 400-500 g, n = 6). Se recogieron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a los 0 minutos y a 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección. Se centrifugó la sangre de cada punto temporal a 4º C para recoger el suero. Se midieron posteriormente las concentraciones de insulina en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (ELISA para insulina humana, Mercodia, Upsala, Suecia). Como se puede observar en la Figura 8, el perfil farmacocinético del conjugado es estadísticamente indistinguible del de la IHR, demostrando que este conjugado se absorbe rápidamente y se elimina desde el suero tras una inyección subcutánea.

Ejemplo 39 - PK y bioactividad de una versión sustituida en B29 del conjugado de insulina AEM-2-TSAT-C6

Este ejemplo describe los perfiles de depresión de la insulina en suero y la glucosa en sangre obtenidos de un conjugado ilustrativo administrado por vía subcutánea. El conjugado ilustrativo, **I-7** en la Figura 45, se sintetizó usando TSAT-C6 como armazón, AEM como ligando y la insulina humana recombinante como fármaco (para producir un conjugado sustituido en B29 en vez de un conjugado sustituido en B1 como en los Ejemplos 37 y 38). En este caso, el conjugado se inyectó a 5 U/kg por detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 400-500 g, n = 3). Se recogieron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a los 0 minutos y a 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, se centrifugó la sangre de cada punto temporal a 4º C para recoger el suero.

Se midieron posteriormente las concentraciones de insulina en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (ELISA para insulina humana, Mercodia, Upsala, Suecia). Como se puede observar en la Figura 9, el perfil farmacocinético para el conjugado sustituido en B29 es estadísticamente indistinguible del de la IHR así como del conjugado sustituido en B1 del Ejemplo 38, demostrando que este conjugado se absorbió también rápidamente y se eliminó desde el suero tras una inyección subcutánea.

Ejemplo 40 - PK y comparación de bioactividad con Lispro

Este ejemplo compara los niveles de insulina en suero y glucosa en sangre obtenidos para un conjugado ilustrativo administrado por vía subcutánea y la insulina lispro. la insulina lispro (HUMALOG®) es un análogo de insulina de acción rápida en el que los penúltimos restos de lisina y prolina en el extremo terminal C del péptido B se han invertido. Esta modificación bloquea la formación de multímeros de insulina. Los datos de la insulina humana recombinante soluble (IHR) se proporcionan también a fines comparativos (véase el Ejemplo 38 y la Figura 8).

El conjugado ilustrativo, **I-1** en la Figura 45, se sintetizó usando TSAT-C6 como armazón, AEM como ligando, y NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina como fármaco. En cada caso, el conjugado o la insulina lispro se inyectó a 3,5 U/kg por detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 400-500 g, n = 6). Se recogieron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a los 0 minutos y a 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, se centrifugó la sangre de cada punto temporal a 4º C para recoger el suero. Se midieron posteriormente las concentraciones de insulina en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (ELISA para insulina humana, Mercodia, Upsala, Suecia). Como se puede observar en la Figura 12, el perfil farmacocinético del conjugado es estadísticamente indistinguible del de la insulina lispro.

Ejemplo 41 - **Efecto del ligando sobre la bioactividad**

Este ejemplo compara los perfiles de glucosa en sangre obtenidos para una serie conjugados ilustrativos administrados por vía subcutánea. Los conjugados ilustrativos se sintetizaron usando TSAT-C6 como armazón, y NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina como fármaco. La composición del ligando varió a través de los conjugados para cubrir un intervalo de afinidades: AEM-2, AEBM-2, AETM-1-AEBM-1 y AETM-2 (desde la afinidad más baja a la afinidad más alta). Los conjugado de insulina se muestran como **I-1**, **I-2**, **I-3**, y **I-4** en la Figura 45. En cada caso, los conjugados se inyectaron a 5 U/kg (3,5 U/kg para AEM-2) por detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 400-500 g, n = 6). Se recogieron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a los 0 minutos y a 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, se centrifugó la sangre de cada punto temporal a 4º C para recoger el suero. Se midieron posteriormente las concentraciones de insulina en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (ELISA para insulina humana, Mercodia, Upsala, Suecia).

Como se puede observar en la Figura 13, la respuesta reductora de la glucosa disminuyó a medida que aumentó la afinidad del ligando. Estos datos proporcionaron la primera indicación de que la naturaleza del ligando puede afectar a la bioactividad del conjugado. Las Figuras 14-16 muestran los niveles de glucosa en sangre junto a los niveles de insulina en suero para cada uno de los cuatro conjugados ensayados. Estos resultados muestran muy claramente que la respuesta reducida a la glucosa de los conjugados con ligandos de mayor afinidad es el resultado del perfil PK reducido del conjugado (comparar la Figura 14 para AEM-2 con la Figuras 17 para AETM-2).

Ejemplo 42 - Efecto de inhibidores exógenos sobre la PK y la Bioactividad

A la vista de los datos descritos en el Ejemplo 41, los inventores supusieron que la reducción en el perfil PK y en la bioactividad observados con los conjugados que tienen ligandos mayores podría ser el resultado de una unión más fuerte a las moléculas endógenas de unión al sacárido. Por ejemplo, sin pretender quedar limitado a cualquier teoría concreta, los inventores supusieron que la unión a proteínas endógenas "de tipo lectina" tales como las proteínas tensioactivas A y D o miembros de la familia de las selectinas puede hacer que estos conjugados se clarifiquen más rápidamente que los conjugados con ligandos de afinidad más baja.

Para someter a ensayo esta hipótesis, los inventores realizaron un conjunto de experimentos para determinar si los ligandos exógenos podrían competir por la unión a estas moléculas endógenas de unión a sacáridos propuestas y aumentar por tanto el perfil PK de los conjugados después de la administración. Se usó para todos los experimentos el conjugado **I-2** AETM-2 de alta afinidad. En cada caso, la misma dosis del conjugado se inyectó por detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 400-500 g, n = 6). Después de 15 minutos de retraso, se inyectó IP una dosis del ligando exógeno. Se recogieron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a 0 minutos y a 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la conjugado inyección. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, se centrifugó la sangre de cada punto temporal a 4º C para recoger el suero. Se midieron posteriormente las concentraciones de insulina en suero con un

kit ELISA comercialmente disponible (ELISA para insulina humana, Mercodia, Upsala, Suecia). Se llevó a cabo un control inyectando solución salina en vez del ligando exógeno después de 15 minutos.

La Figura 18 muestra los resultados obtenidos cuando se administró alfa-metil manosa. Alfa-metil manosa es un sacárido de muy alta afinidad que puede competir con AETM por la unión a lectinas tales como Con A. Como se muestra, el cambio en el perfil PK/PD que resulta de la inyección de alfa-metil manosa es muy significativo ($p<0,05$).

La Figura 19 es un experimento de control en el que se usó insulina humana recombinante soluble (IHR) para la inyección inicial en vez del conjugado AETM-2. Como se muestra, no hubo cambio en el perfil PK/PD cuando se inyectó alfa-metil manosa ($p>>0,05$).

Se sabe que la lectina endógena de unión a manano (MBL) se une a sacáridos con las siguientes afinidades relativas: D-manosa, L-fucosa > D-glucosa, N-acetil-D-glucosamina >> D-galactosa. Los inventores decidieron por tanto analizar dos experimentos comparando los efectos de la L-fucosa (ligando de alta afinidad), D-glucosa (ligando de afinidad intermedia) y D-galactosa (ligando de baja afinidad) sobre el perfil PK/PD para el conjugado AETM-2. Los resultados con la L-fucosa se compararon con los resultados obtenidos con la alfa-metil manosa en la Figura 20. Como se muestra, alfa-metil manosa y L-fucosa parecen presentar el mismo tipo de efecto. Los resultados con la D-glucosa y la D-galactosa se compararon en la Figura 21. La galactosa no presenta efectos en comparación con la solución salina. La glucosa parece presentar un pequeño efecto; sin embargo, esto se complica por el hecho de que la insulina exógena procedente del conjugado disminuye rápidamente la glucosa, de tal manera que no se produce el efecto sostenido observado con la alfa-metil manosa y L-fucosa.

Ejemplo 43 - Efecto del inhibidor exógeno en el sitio de inyección local

En vista de los datos descritos en el Ejemplo 42, los inventores se propusieron determinar si la alfa-metil manosa (a-MM) indujo un aumento en la concentración del conjugado en suero y la bioactividad fue un resultado de una tasa de absorción aumentada desde el sitio de inyección subcutánea. Se usó para todos los experimentos del conjugado **I-2** TSAT-C6-AETM-2 de alta afinidad. En primer lugar, el conjugado se diluyó hasta una concentración de 5 U/ml (0.2 mg/ml equivalentes de insulina) usando tanto una solución salina tamponada como una solución salina tamponada que contenía a-MM 1 M. Se inyectó cada solución sub-Q a una dosis de 5 U/kg en la parte posterior del cuello de tres ratas SD macho no diabéticas en el tiempo 0 y se recogieron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a los 0 minutos y a, los 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, y 300 minutos después de la inyección. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, se centrifugó la sangre de cada punto temporal a 4º C para recoger el suero. Se midieron posteriormente las concentraciones de insulina en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Upsala, Suecia). En este experimento, las ratas que recibieron una solución de conjugado a-MM recibieron también una inyección de solución salina tamponada sub-Q en un sitio de inyección del cuarto trasero separado a los 15 minutos. Las ratas que recibieron la solución salina del conjugado recibieron también una inyección de solución a-MM sub-Q en un sitio de inyección de un cuarto trasero separado a los 15 minutos. Estas inyecciones retrasadas 15 minutos se usaron para asegurar que la cantidad de a-MM inyectada sub-Q con la solución del conjugado no aumentarían la concentración sistémica de a-MM suficientemente alta para invocar el tipo de efectos inducidos por a-MM presentados en la Figura 18.

Los resultados que se muestran en la Figura 22 indican que, dentro del error experimental, los perfiles PK y de bioactividad del conjugado no se mejoraron en absoluto al inyectar simultáneamente a propósito una alta concentración de un inhibidor a-MM con el conjugado. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que los sacáridos exógenos no actúan sobre los conjugados cambiando el perfil de absorción en la circulación sistémica desde el sitio de inyección.

Ejemplo 44 - Efecto de retrasar la inyección del inhibidor exógeno tras la inyección inicial del conjugado

Basándose en los resultados de la Figura 22, los resultados de la PK y la bioactividad mejoradas con a-MM no se pueden explicar por la absorción aumentada en el sitio de inyección sino más bien deben ser el resultado de un efecto sistémico que se produce una vez que se ha absorbido el conjugado. Las siguientes dos hipótesis podrían explicar dicho comportamiento: (a) el conjugado se está eliminando del cuerpo mediante un mecanismo dependiente de lectina que puede ser alterado por el sacárido competitivo o (b) el conjugado se está uniendo a las lectinas en el cuerpo y solo se libera la circulación en presencia de un sacárido competitivo. En el caso de (b), se podría esperar que la introducción de a-MM en el animal después que se ha absorbido completamente el conjugado desde el depósito sub-Q produciría que el conjugado absorbido se liberara desde los sitios de las lectinas en el cuerpo aumentando por tanto su concentración y bioactividad en suero. Sin embargo, Si está en funcionamiento un mecanismo de eliminación como se describe en (a), inyectar entonces un a-MM después que se ha absorbido completamente el conjugado desde el depósito sub-Q no producirá ningún aumento en la concentración sérica o la bioactividad debido a que el conjugado habrá sido ya completamente eliminado del cuerpo.

Para determinar el probable mecanismo, el conjugado **I-2** TSAT-C6-AETM-2 de alta afinidad se inyectó a 5 U/kg por detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 400-500 g, n = 3 por grupo).

Después de cuatro tiempos de retraso diferentes (15 minutos, 60 minutos, 120 minutos, y 240 minutos) se inyectó IP una dosis de 4 g/kg de una solución a-MM. Se recogieron muestras de sangre sangrando la vena de la cola a los 0 minutos y a los siguientes intervalos para cada experimento:

Tiempo de retraso de una inyección IP de a-MM (min)	Puntos temporales de las muestras (minutos después de la inyección)
15	15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360
60	15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360
120	15, 30, 45, 60, 90, 120, 135, 150, 180, 240, 300, 360
240	15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 255, 270, 300, 360

Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, se centrifugó la sangre de cada punto temporal a 4º C para recoger el suero. Se midieron posteriormente las concentraciones de insulina en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Upsala, Suecia).

Como se muestra en la Figura 23, el aumento en la concentración sérica del conjugado y la bioactividad debida a una inyección IP de a-MM es menor y menos prevalente que el tiempo de retraso más largo entre la inyección del conjugado y la inyección IP de a-MM. Por ejemplo, tras 240 minutos, no se observó aumento en la concentración sérica del conjugado indicando que no existe depósito de conjugado unido a lectina presente en el cuerpo tras la absorción completa del conjugado. Estos resultados son consistentes con el mecanismo propuesto (a) e inconsistentes con el mecanismo propuesto (b). Debe entenderse que aunque los inventores suponen que el mecanismo (a) puede ser responsable de las propiedades PK observadas con los conjugados de la presente divulgación, las reivindicaciones presentadas en el presente documento no se limitan de ninguna manera a un mecanismo de acción específico.

Ejemplo 45 - Efecto de a-MM sobre PK y bioactividad como una función de afinidad del ligando

En vista de los datos descritos en el Ejemplo 42, los inventores intentaron determinar el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de los conjugados sintetizados usando diferentes ligandos de sacárido que el ligando AETM utilizado en el Ejemplo 42. En este ejemplo, se usó el armazón TSAT-C6 y se sintetizaron los siguientes conjugados de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 20 (nota: la glucosamina-HCl o GA-HCl se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se usaron sin purificación adicional):

Conjugado	Armazón	Armazón MW	Ligando	AE-azúcar MW	Pureza (HPLC)	MW (CL-EM)	Azúcar/Insulina
I-7: TSAT-C6-AEM-2 (B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	95 %	6729	2,0
I-5: TSAT-C6-GA-2 (B29)	TSAT-C6	822	GA-HCl	216	95 %	6641	2,0

De acuerdo con la secuenciación del extremo N, aproximadamente un 90 % de cada armazón que contiene un sacárido se conjugó con insulina mediante la Lys-B29. TSAT-C6-AEM-2 (B29) y TSAT-C6-GA-2 (B29) se muestra en la Figura 45 como los conjugados **I-7** y **I-5**, respectivamente.

El mismo tipo de experimentos descritos en el Ejemplo 42 se repitieron para los conjugados descritos en la tabla anterior. En cada caso, la misma dosis del conjugado (5 U/kg) se inyectó por detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 400-500 g, n = 3). Después de 15 minutos de retraso, se inyectó IP una dosis de 4 g/kg de a-MM. Se recogieron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a 0 minutos y a 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la conjugado inyección. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, se centrifugó la sangre de cada punto temporal a 4º C para recoger el suero. Se midieron posteriormente las concentraciones de insulina en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Upsala, Suecia). Se llevó a cabo un control inyectando solución salina en vez de a-MM después de 15 minutos.

Las Figuras 24 y 25 muestran los resultados obtenidos cuando se administró a-MM mediante inyección IP 15 minutos después de la inyección sub-Q de **I-7** y **I-5**, respectivamente. Como se muestra, el aumento en el perfil PK/PD que era el resultado de la inyección de a-MM fue muy significativo ($p<0,05$) para el conjugado **I-7** cuando se comparó con la inyección de solución del grupo del control. Sin embargo, la extensión del aumento inducido por a-MM en la concentración sérica del conjugado fue menor que la obtenida por los conjugados de AETM-2 del Ejemplo 42. El perfil del conjugado **I-5** no se vio afectado por la inyección de a-MM, al igual que los resultados obtenidos para IHR en la Figura 19. Tomados en conjunto, estos datos ilustran que ambos conjugados derivados de manosa (AEM-2 y AETM-2) presentan el perfil PK/PD mejorado para a-MM mientras que los conjugados derivados de glucosamina

de menor afinidad no. Además, el cambio relativo en el perfil PK para los conjugados AEM-2 de afinidad menor es menor que el cambio observado para los conjugados AETM-2 de afinidad mayor.

Ejemplo 46 - Efecto de a-MM sobre PK y bioactividad como una función de la valencia del ligando

En este ejemplo, los inventores intentaron determinar el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de los conjugados a los cuales se han unido covalentemente un número creciente de ligandos de sacáridos ilustrativos. Todos los conjugados se sintetizaron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 20 usando los armazones y los ligandos de sacáridos especificados a continuación:

Conjugado	Armazón	Armazón MW	Ligando	AE-azúcar MW	Pureza (HPLC)	MW (CL-EM)	Azúcar/ Insulina
I-8: DSS-AEM-1 (B29)	DSS	368	AEM	223	>95 %	6168	1,0
I-9: TSPE-AEM-3 (B29)	TSPE	813	AEM	223	>95 %	6829	3,0
I-10: DSS-AETM-1 (B29)	DSS	368	AETM	547	>95 %	6491	1,0
I-11: TSPE-AETM-3 (B29)	TSPE	813	AETM	547	>95 %	7800	3,0

De acuerdo con la secuenciación del extremo N, aproximadamente un 90 % de cada armazón que contiene un sacárido se conjugó con insulina mediante la Lys-B29. Los conjugados se muestran en la figura 45 como **I-8**, **I-9**, **I-10**, y **I-11.**

El mismo tipo de experimento descrito en el Ejemplo 45 se repitió para los conjugados descritos en la tabla anterior. En cada caso, la misma dosis del conjugado (5 U/kg) se inyectó por detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 400-500 g, n = 3). Después de 15 minutos de retraso, se inyectó IP una dosis de 4 g/kg de a-MM. Se recogieron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a 0 minutos y a 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la conjugado inyección. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, se centrifugó la sangre de cada punto temporal a 4º C para recoger el suero. Se midieron posteriormente las concentraciones de insulina en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Upsala, Suecia). Se llevó a cabo un control inyectando solución salina en vez de a-MM después de 15 minutos.

Las Figuras 26 y 27 muestran los resultados obtenidos cuando se administró a-MM mediante inyección IP 15 minutos después de la inyección sub-Q de **I-8** y **I-9**, respectivamente. Como se muestra, el aumento en el perfil PK/PD que era el resultado de la inyección de a-MM fue muy significativo ($p<0,05$) para **I-9** en favor de **I-8** cuando se comparó con la inyección de solución del grupo del control. Además, el conjugado I-9 presentó aproximadamente el mismo perfil PK inducido por a-MM como el conjugado **I-2** del Ejemplo 42, ambos cuales fueron mucho más pronunciados que el obtenido de **I-8.**

Las Figuras 28 y 29 muestran los resultados obtenidos cuando se administró a-MM mediante inyección IP 15 minutos después de la inyección sub-Q de **I-10** y **I-11**, respectivamente. Como se muestra, el aumento en el perfil PK/PD que era el resultado de la inyección de a-MM fue muy significativo ($p<0,05$) para **I-11** y un poco menos para **I-10** cuando se comparó con la inyección de solución del grupo del control. Además, el conjugado I-11 presentó aproximadamente el mismo perfil PK inducido por a-MM como el conjugado **I-2** del Ejemplo 42, ambos cuales fueron ligeramente más pronunciados que el obtenido de **I-10.**

Ejemplo 47 - Comparación de la semivida *in vivo*/tasa de eliminación

Los resultados obtenidos en el Ejemplo 44 son consistentes con los conjugados ilustrativos que se eliminan del cuerpo mediante un mecanismo dependiente de lectina que se puede alterar por la presencia de un sacárido competitivo. A fin de explorar este mecanismo con más detalle, los inventores llevaron a cabo los siguientes experimento sobre los conjugados ilustrativos para determinar la tasa a la cual se aclararon a partir de suero in vivo frente a insulina sin conjugar. Todos los conjugados usados en este estudio se sintetizaron de acuerdo con los métodos generales descritos en el Ejemplo 20.

En cada caso, el conjugado soluble se dosificó a 0,4 mg de conjugado/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley macho que se habían canulado por duplicado en la vena yugular (Taconic, JV/JV, 350-400 g, n=3). Una solución estéril de conjugado o insulina del control se inyectó por vía intravenosa mediante una cánula JV, seguido inmediatamente por una solución de búsqueda de heparina-solución salina para asegurar que se administró toda la dosis del conjugado en el animal. La segunda cánula se usó para extraer muestras de sangre en t = 0 (dosis previa), y a los 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, y 180 minutos después de la dosis.

Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, se centrifugó la sangre de cada punto temporal a 4º C para recoger el suero. Se midieron posteriormente las concentraciones de insulina en suero o conjugado en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Upsala, Suecia).

La Figura 30 muestra la concentración en suero tanto de la IHR como del conjugado TSAT-C6-AETM-2, que se muestra como **I-6** en la Figura 45, en función del tiempo tras la inyección intravenosa. Claramente, **I-6** se elimina mucho más rápidamente de el suero que la IHR. Los datos se ajustan mejor usando un modelo biexponencial de dos compartimentos con la siguiente fórmula general: $C(t) = A_o\ EXP(-at) + B_o\ EXP(-bt)$ donde t es el tiempo, C(t) es la concentración en suero en función del tiempo, A_o es la constante de concentración del primer compartimento, a es la constante de tiempo exponencial del primer compartimento, B_o es la constante de concentración del segundo compartimento, y b es la constante de tiempo exponencial del segundo compartimento. Las semividas de eliminación (en minutos) asociadas con cada componente son t1/2(a) = 0,693/a y t1/2(b) = 0,693/b. En la Figura 30, para IHR la t1/2(a) = 0,76 y t1/2(b) = 11,46 y para **I-6** la t1/2(a) = 0,47 y t1/2(b) = 2,87. En otras palabras, la t1/2(b) para **I-6** es aproximadamente cuatro veces más corta que la t1/2(b) para IHR.

La siguiente tabla resume los parámetros t1/2 para numerosos conjugados ensayados usando exactamente el mismo procedimiento descrito anteriormente (en la Figura 45 se muestran las estructuras):

Formulación	t1/2 (a)	t1/2 (b)	Relación para IHR t1/2 (a)	relación para IHR t1/2 (b)
IHR	0,76	11,46	1,00	1,00
I-5: TSAT-C6-GA-2	0,81	12,02	1,07	1,05
I-8: DSS-AEM-1	0,90	9,61	1,18	0,84
I-7: TSAT-C6-AEM-2	0,45	2,77	0,60	0,24
I-9: TSPE-AEM-3	0,66	2,62	0,87	0,23
I-10: DSS-AETM-1	0,82	4,48	1,08	0,39
I-6: TSAT-C6-AETM-2	0,47	2,87	0,62	0,25
I-11: TSPE-AETM-3	0,22	1,33	0,29	0,12

Este dato es consistente con la hipótesis de que los conjugados ilustrativos se eliminan del suero más rápidamente que la insulina sin conjugar, cuya extensión se rige por la afinidad del conjugado concreto por la lectina endógena y el número de ligandos sustituidos por conjugado. Además, el aumento inducido por a-MM en los perfiles PK/PD demostrado en los Ejemplos 42 y 44-46 se correlaciona bien con la reducción de la semivida en fase b de cada uno de los conjugados ensayados.

Ejemplo 48 - semivida *in vivo*/tasa de eliminación para infusión de glucosa

En este ejemplo, se supuso que la tasa de aclaramiento de los conjugados ilustrativos podría inhibirse por la presencia de concentraciones fisiológicas de glucosa. Para determinar la tasa a la cual los conjugados se aclaran del suero *in vivo* en condiciones hiperglucémicas, se realizaron los siguientes experimentos. En cada caso, se dosificó **I-7** a 0,4 mg de conjugado/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley macho que se habían canulado por duplicado en la vena yugular (Taconic, JV/JV, 350-400 g, n=3).

Una hora antes del inicio del experimento se conectó una cánula de rata a la bomba de infusión de la jeringuilla que contenía una solución de glucosa estéril al 50 % p/v. La tasa de infusión de la bomba se ajustó por el experimentador para asegurar que los niveles de glucosa en sangre en el animal permanecían por encima de 300 mg/dl en todos los tiempos durante el experimento. Se midió la glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). En un experimento típico, se descubrió que la tasa de la bomba de infusión requerida para mantener a los animales por encima de 300 mg/dl era normalmente mayor de 85 ul/min. Se tomó una muestra de sangre a t = 0 min, tras lo cual se inyectó por vía intravenosa una solución estéril de conjugado o insulina del control mediante la segunda cánula de rata, seguido inmediatamente por una solución de búsqueda de heparina-solución salina para asegurar que se administró toda la dosis del conjugado en el animal. Tras un lavado adicional de la línea de la cánula con heparina-solución salina, La segunda cánula se usó para extraer muestras de sangre en t = 1,2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, y 180 minutos después de la dosis.

La sangre de cada punto temporal se centrifugó a 4C para recoger el suero, y se midieron posteriormente las concentraciones de la insulina en suero o el conjugado en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Upsala, Suecia). Los datos de la concentración de la insulina en suero o del conjugado en suero frente al tiempo se ajustaron mejor con la suma de dos exponenciales independientes en descomposición ($C(t) = a\ exp(-k_a t) + b\ exp(-k_b t)$) de acuerdo con el modelo de dos compartimentos, donde $t1/2(a) = (In\ 2)/k_a$ y $t1/2(b) = (In\ 2)/k_b$. La siguiente tabla resume los parámetros **t1/2** de **I-7** con y sin la infusión de glucosa junto con los obtenidos para la IHR del Ejemplo 47:

Infusión	Formulación	t1/2 (a)	t1/2 (b)	Relación para IHR t1/2 (a)	relación para IHR t1/2 (b)
Ninguna	IHR	0,76	11,46	1,00	1,00
Solución salina	TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**)	0,45	2,77	0,60	0,24
Glucosa (400 mg/dl)	TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**)	0,64	5,11	0,84	0,45

Los inventores pueden concluir a partir de estos datos que la glucosa es capaz de inhibir la eliminación acelerada del suero de este conjugado duplicando por tanto la semivida de eliminación de la Fase b de 2,77 a 5,11 minutos.

Ejemplo 49 - Semivida *in vivo*/ tasa de eliminación en una infusión de a-MM

En este ejemplo, se supuso adicionalmente que la tasa de aclaramiento de los conjugados de insulina-sacárido podría inhibirse por la presencia de concentraciones arbitrariamente altas de sacáridos inhibidores diferentes de la glucosa, tales como α-metilmanosa (a-MM). Para determinar la tasa a la cual se aclararon los conjugados ilustrativos del suero *in vivo* en presencia de a-MM, se realizaron los siguientes experimentos. En cada caso, el conjugado soluble se dosificó a 0,4 mg de conjugado/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley macho que se habían canulado por duplicado en la vena yugular (Taconic, JV/JV, 350-400 g, n=3).

Una hora antes del inicio del experimento se conectó una cánula de rata a una bomba de infusión de la insulina que contenía una solución de a-MM estéril al 25 % p/v. El experimentador ajustó la tasa de infusión de la bomba, pero se ajustó normalmente a 85 ul/min. Se tomó una muestra de sangre a t = 0 min, tras lo cual se inyectó por vía intravenosa una solución estéril de conjugado o insulina del control mediante la segunda cánula de rata, seguido inmediatamente por una solución de búsqueda de heparina-solución salina para asegurar que se administró toda la dosis del conjugado en el animal. Tras un lavado adicional de la línea de la cánula con heparina-solución salina, La segunda cánula se usó para extraer muestras de sangre en t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, y 180 minutos después de la dosis.

Además, Se midió la glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). La sangre de cada punto temporal se centrifugó a 4C para recoger el suero, y se midieron posteriormente las concentraciones de la insulina en suero o el conjugado en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Upsala, Suecia). Los datos de la concentración de la insulina en suero o del conjugado en suero frente al tiempo se ajustaron mejor con la suma de dos exponenciales independientes en descomposición ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$) de acuerdo con el modelo de dos compartimentos, donde $t1/2(a) = (\ln 2)/k_a$ y $t1/2(b) = (\ln 2)/k_b$. La siguiente tabla resume los parámetros t1/2 del conjugado TSAT-C6-AEM-2 con y sin infusión de a-MM junto con los obtenidos con la infusión de glucosa del Ejemplo 48 y los obtenidos para la IHR sin la infusión de sacárido del Ejemplo 47:

Infusión	Formulación	t1/2 (a)	t1/2 (b)	Relación para IHR t1/2 (a)	relación para IHR t1/2 (b)
Ninguna	IHR	0,76	11,46	1,00	1,00
Solución salina	TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**)	0,45	2,77	0,60	0,24
a-MM	TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**)	0,92	10,09	1,21	0,88
Glucosa (400 mg/dl)	TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**)	0,64	5,11	0,84	0,45

Los inventores pueden concluir a partir de estos datos que no solo a-MM inhibe la eliminación acelerada del suero para este conjugado, lo hace en mayor medida que la glucosa. En este caso, la semivida de eliminación de la Fase b se cuadriplica casi desde 2,77 a 10,09 minutos.

IV. Otros ejemplos

Este cuarto conjunto de ejemplos describe diversos experimentos que investigan la síntesis, la formulación, y las propiedades de algunos conjugados ilustrativos.

Ejemplo 50 - Conjugados de insulina de acción prolongada usando protamina, cinc, y otros excipientes

Dado que los datos de los ejemplos anteriores son consistentes con un mecanismo de eliminación del suero dependiente de sacárido, los inventores intentaron desarrollar formulaciones de conjugados proporcionarían una tasa de absorción sostenida en estado estacionario a partir de un sitio de inyección subcutánea. En la tasa de absorción en estado estacionario, la concentración del conjugado en suero en cualquier punto en el tiempo se regirá principalmente por la tasa de eliminación dependiente de sacárido. De tal manera, los inventores pueden formular una insulina de liberación sostenida de acción prolongada que presente un perfil PK sensible a sacárido.

A fin de generar conjugados de acción prolongada, los inventores prepararon formulaciones de PZI (protamina cinc insulina) a partir de las soluciones de conjugados. Los conjugados sustituidos con insulina en el término B1 no

forman formulaciones de PZI amorfas o cristalinas tan fácilmente, por tanto, los inventores utilizaron conjugados sustituidos en B29 preparados basándose en los métodos del Ejemplo 20. Los excipientes usados en estas formulaciones comprende protamina, cinc, m-cresol, y sales, todas las cuales se obtuvieron comercialmente de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las concentraciones de estos componentes se pueden variar a fin de obtener una tasa de absorción sostenida óptimamente uniforme. Además, en algunos casos se descubrió que la adición de una pequeña cantidad de insulina sin modificar ayudó a estabilizar la formulación. En estos casos, la concentración de la insulina sin modificar contenida en la muestra se varió para obtener una tasa de absorción sostenida óptimamente uniforme. En todas las formulaciones ensayadas, se utilizó la siguiente receta:

Componente	Variable	Volumen (ml)
Solución de conjugado en 2,7 mg/ml	% de contenido de insulina sin modificar (M/M)	1,000
solución salina tamponada con HEPES 250 mM	concentración de NaCl (M)	0,111
Solución de acetato de cinc	Concentración de cinc (mg/ml)	0,124
Solución de cresol en agua	% en v/v	0,159
Solución de protamina pH 7.2 en solución tamponada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina (mg/ml)	4 alícuotas x 0,194

A menos que se especifique otra cosa, una vez que se prepararon las formulaciones tras la adición de los componentes en el orden descrito en la tabla anteriormente, se mezclaron suavemente durante 30 minutos antes del ensayo *in vivo*.

Para ensayar el perfil de liberación sostenida para una formulación dada así como el perfil PK sensible a glucosa, se realizaron los siguientes experimentos. La formulación se inyectó a una dosis predeterminada (~ 15 U/kg en la mayoría de los casos salvo que se especifique de otra manera) por detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 400-500 g, n = 3). Después de un retraso de 240 minutos, se inyectó IP una dosis de glucosa (4 g/kg). Se recogieron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a 0 minutos y a 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la conjugado inyección. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, se centrifugó la sangre de cada punto temporal a 4º C para recoger el suero. Se midieron posteriormente las concentraciones de insulina en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Upsala, Suecia). De acuerdo con las especificaciones de ensayo del fabricante, la Iso-Insulin ELISA tiene reactividad cruzada en un 71 % con insulina de rata. Las muestras de suero se diluyeron por 10**×** a fin de minimizar la cantidad de insulina de rata endógena detectada en cada muestra, pero la posibilidad de detección de la insulina de rata podría no descartarse completamente. Por lo tanto, los resultados se notifican generalmente como "insulina medida", que puede consistir en alguna cantidad de insulina de rata endógena además del conjugado o IHR, dependiendo del experimento. No obstante, todas las muestras recogidas en cada uno de los siguientes ejemplos se trataron idénticamente y se pueden comparar directamente en el comportamiento.

Ejemplo 51 - Efecto de la concentración de protamina sobre el comportamiento del conjugado de insulina de acción prolongada

El objetivo de este ejemplo era demostrar el efecto de la concentración de protamina sobre el tiempo de acción y el perfil PK sensible a glucosa de un conjugado ilustrativo. En este ejemplo **I-6**, sintetizado de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 20, se ensayó usando la formulación generalizada y en el protocolo *in vivo* descrito en el Ejemplo 50:

Componente	Variable	Volumen (ml)
solución de TSAT-C6-AETM-2 (**I-6)** en 2,7 mg/ml	insulina sin modificar = 16,7 %	1,000
solución salina tamponada con HEPES 250 mM	concentración de NaCl = 1,5 M	0,111
Solución de acetato de cinc	Concentración de cinc (mg/ml) = véase a continuación	0,124
Solución de cresol en agua	3 % en v/v	0,159
Solución de protamina pH 7.2 en solución tamponada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina (mg/ml) = véase a continuación	4 alícuotas x 0,194

Formulación	Concentración de cinc (mg/ml)	Concentración de protamina (mg/ml)
1xP-1xZ	1,15	1,25
4xP-4xZ	4,60	5,00
10xP-4xZ	4,60	12,50

Se llevaron a cabo experimentos de inyección de glucosa IP de cuatro horas (4 g/kg) dosificando 15 U/kg (peso corporal en gramos/1,87 = microlitros de volumen de inyección) de cada una de las tres formulaciones descritas anteriormente. Los resultados que se muestran en la Figura 31a-c demuestran que a medida que aumenta la concentración de protamina en la formulación, más prolongada es la formulación resultante, y más pronunciado es el aumento de la medición en el perfil de insulina sérica después de la inyección de glucosa de cuatro horas. La formulación 1xP-1xZ liberó una porción significativa de la carga útil del conjugado de insulina durante un corto periodo de tiempo inmediatamente después de la inyección de tal manera que se detectó muy poca señal tras la carga de la glucosa IP. Por otro lado, la formulación 10xP-4xZ liberó una cantidad basal baja de insulina durante las primeras cuatro horas sin hipoglucemia y posteriormente alcanzó un aumento > 4x en la concentración de insulina medida inmediatamente después de la inyección de glucosa IP.

Ejemplo 52 - Efecto de la concentración de cinc sobre el comportamiento del conjugado de insulina de acción prolongada

El objetivo de este ejemplo era demostrar el efecto de la concentración del cinc sobre la estabilidad de la formulación, el tiempo de acción y el perfil PK sensible a glucosa de un conjugado ilustrativos. En este ejemplo **I-6**, sintetizado de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 20, se ensayó usando la formulación generalizada y en el protocolo *in vivo* descrito en el Ejemplo 50:

Componente	Variable	Volumen (ml)
solución de TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) en 2,7 mg/ml	insulina sin modificar = 0 %	1,000
solución salina tamponada con HEPES 250 mM	concentración de NaCl = 1,5 M	0,111
Solución de acetato de cinc	Concentración de cinc (mg/ml) = véase a continuación	0,124
Solución de cresol en agua	3 % en v/v	0,159
Solución de protamina pH 7.2 en solución tamponada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina (mg/ml) = véase a continuación	4 alícuotas x 0,194

Formulación	Concentración de cinc (mg/ml)	Concentración de protamina (mg/ml)
4xP-1xZ	1,15	5,00
4xP-2xZ	2,30	5,00
10xP-1xZ	1,15	12,5
10xP-2xZ	2,30	12,5

Se llevaron a cabo experimentos de inyección de glucosa IP de cuatro horas (4 g/kg) dosificando 15 U/kg (peso corporal en gramos/1,87 = microlitros de volumen de inyección) de cada una de las cuatro formulaciones descritas anteriormente. Los resultados que se muestran el la Figura 32a-b y 33a-b demuestran que dentro del error experimental, la concentración de cinc no tiene un efecto significativo sobre la naturaleza global de la liberación sostenida de la formulación o el perfil sensible a glucosa. En todos los casos, se observó un aumento estadísticamente significativo en la concentración de insulina medida tras la inyección de glucosa IP. Como se demostró en el Ejemplo 51, cuanto mayores son las formulaciones de protamina (10xP) liberadas, menores son los conjugados en el tiempo que las menores formulaciones de protamina (4xP) con respecto a la concentración del cinc. Sin embargo, cuando las formulaciones se dejaron a temperatura ambiente durante más de 24 horas, ambas formulaciones de 10cP se transformaron a partir de una solución particulada fácilmente dispersable en una solución pegajosa, aglomerada, en dos fases. Esto no sucedió con la correspondiente formulación 10xP-4xZ. De manera similar, se descubrió que la formulación 4xP-1xZ se transforma de la misma manera que la formulación 10xP-1xZ mientras que 4xP-2xZ fue relativamente estable a la temperatura ambiente durante semanas. Por lo tanto, la concentración de cinc para una concentración de protamina dada se puede ajustar para preparar formulaciones fácilmente dispersables que son estables durante largos periodos de tiempo.

Ejemplo 53 - Efecto de la concentración de m-cresol sobre el comportamiento del conjugado de insulina a largo plazo

El objetivo de este ejemplo era demostrar el efecto de la concentración de m-cresol sobre el tiempo de acción y el perfil PK sensible a glucosa de un conjugado ilustrativo. En este ejemplo **I-6**, sintetizado de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 20, se ensayó usando la formulación generalizada y en el protocolo *in vivo* descrito en el Ejemplo 50:

Componente	Variable	Volumen (ml)
solución de TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) en 2,7 mg/ml	insulina sin modificar = 0 %	1,000
solución salina tamponada con HEPES 250 mM	concentración de NaCl = 1,5 M	0,111
Solución de acetato de cinc	Concentración de cinc = 4,6 mg/ml	0,124
Solución de cresol en agua	% en v/v = véase a continuación	0,159
Solución de protamina pH 7.2 en solución tamponada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina= 12,5 mg/ml	4 alícuotas x 0,194

Formulación	Concentración de cresol
Sin cresol	0
4x cresol	12 % en v/v

Se llevaron a cabo experimentos de inyección de glucosa IP de cuatro horas (4 g/kg) dosificando 15 U/kg (peso corporal en gramos/1,87 = microlitros de volumen de inyección) de las dos formulaciones descritas anteriormente. Los resultados que se muestran en la Figura 34a-b demuestran que la presencia de m-cresol mantiene una formulación más prolongada. La formulación sin cresol libera unas porción significativa de carga útil del conjugado de insulina durante un corto periodo de tiempo inmediatamente después de la inyección de tal manera que so observó muy poco aumento en la concentración de insulina medida cuando se estimuló con glucosa IP. Por otro lado, la formulación 4x cresol libera una cantidad basal baja de insulina durante las primeras cuatro horas sin hipoglucemia y posteriormente alcanza un aumento de 3-4x en la concentración de insulina medida inmediatamente después de la inyección de glucosa IP.

Ejemplo 54 - Efecto de la concentración de la sal/agente isotónico sobre el comportamiento del conjugado de insulina de acción prolongada

El objetivo de este ejemplo era demostrar el efecto de la concentración de sal y la elección del agente isotónico en el tiempo de acción y el perfil PK sensible a glucosa de un conjugado ilustrativo. En este ejemplo **I-6**, sintetizado de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 20, se ensayó usando la formulación generalizada y en el protocolo *in vivo* descrito en el Ejemplo 50:

Componente	Variable	Volumen (ml)
solución de TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) en 2,7 mg/ml	insulina sin modificar = 16,7 %	1,000
solución salina tamponada con HEPES 250 mM	concentración de NaCl o glicerol (M) = véase a continuación	0,111
Solución de acetato de cinc	Concentración de cinc = 4,6 mg/ml	0,124
Solución de cresol en agua	3 % en v/v	0,159
Solución de protamina pH 7.2 en solución tamponada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina= 12,5 mg/ml	4 alícuotas x 0,194

Formulación	Concentración de NaCl
Sin sal	0,0 M
3,3x de sal	5,0 M
Glicerol	Solución pura de glicerol en vez de solución salina

Se llevaron a cabo experimentos de inyección de glucosa IP de cuatro horas (4 g/kg) dosificando 15 U/kg (peso corporal en gramos/1,87 = microlitros de volumen de inyección) de cada una de las tres formulaciones descritas anteriormente. Los resultados que se muestran en la Figura 35a-c demuestran que la presencia de sal en la formulación mantiene una formulación más prolongada. La formulación sin sal liberó una porción significativa de la carga útil del conjugado de insulina durante las primeras cuatro horas del experimento que se observó muy poco aumento en la concentración de insulina medida cuando se estimuló con glucosa IP. Por otro lado, la formulación 3,3x de sal liberó una cantidad basal baja de conjugado durante las primeras cuatro horas sin hipoglucemia y posteriormente alcanzó un aumento~4x en la concentración de insulina medida inmediatamente después de la inyección de glucosa IP. Este comportamiento fue similar al obtenido con la formulación 10xP-4xZ del Ejemplo 51, que fue exactamente la misma que la formulación 3,3x de sal pero que contenía aproximadamente 1/3 de la concentración de sal (1,5 M en comparación con 5,0 M). Finalmente,Finalmente, la sustitución del glicerol por NaCl como el agente isotónico no parece afectar gravemente la naturaleza prolongada de la formulación.

Ejemplo 55 - Efecto de la concentración de insulina sin modificar sobre el comportamiento del consulado de insulina de acción prolongada

El objetivo de este ejemplo era demostrar el efecto de incluir diferentes concentraciones de insulina sin modificar

sobre el tiempo de acción y el perfil PK sensible a glucosa de un conjugado ilustrativo. En este ejemplo 1-6, sintetizado de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 20, se ensayó usando la formulación generalizada y en el protocolo *in vivo* descrito en el Ejemplo 50:

Componente	Variable	Volumen (ml)
solución de TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) en 2,7 mg/ml	% de insulina sin modificar = véase a continuación	1,000
solución salina tamponada con HEPES 250 mM	concentración de NaCl = 1,5 M	0,111
Solución de acetato de cinc	Concentración de cinc = 4,6 mg/ml	0,124
Solución de cresol en agua	3 % en v/v	0,159
Solución de protamina pH 7.2 en solución tamponada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina= 12,5 mg/ml	4 alícuotas x 0,194

Formulación	% de insulina sin modificar
1/24	4,17
1/12	8,33
1/6	16,7

Se llevaron a cabo experimentos de inyección de glucosa IP de cuatro horas (4 g/kg) dosificando 15 U/kg (peso corporal en gramos/1,87 = microlitros de volumen de inyección) de cada una de las tres formulaciones descritas anteriormente. Los resultados que se muestran en la Figura 36a-c demuestran que la presencia de insulina sin modificar en la formulación produce de forma ventajosa una formulación más prolongada con un aumento sustancial en la concentración de insulina medida tras una inyección de glucosa IP. Además, la presencia de insulina sin modificar ayuda a preservar el comportamiento de la formulación incluso después de algunas semanas de incubación a temperatura ambiente (véase el Ejemplo 57 a continuación).

Ejemplo 56 - Conjugados de insulina de acción prolongada - Efecto de respuesta a la dosis

En este ejemplo, los inventores evaluaron el efecto de respuesta a la dosis de una formulación concreta de un conjugado ilustrativo de acción prolongada. Conjugado 1-6, sintetizado de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 20, se ensayó usando la formulación generalizada y en el protocolo *in vivo* descrito en el Ejemplo 50:

Componente	Variable	Volumen (ml)
solución de TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) en 2,7 mg/ml	insulina sin modificar = 16,7 %	1,000
solución salina tamponada con HEPES 250 mM	concentración de NaCl = 1,5 M	0,111
Solución de acetato de cinc	Concentración de cinc = 4,6 mg/ml	0,124
Solución de cresol en agua	3 % en v/v	0,159
Solución de protamina pH 7.2 en solución tamponada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina= 12,5 mg/ml	4 alícuotas x 0,194

Se llevó a cabo el experimento de inyección de glucosa IP de cuatro horas (4 g/kg) dosificando 5 o 15 U/kg (peso corporal en gramos/1,87 = microlitros de volumen de inyección) de la formulación descrita anteriormente.

Como se muestra en la Figura 37, el conjugado presentó un perfil PK uniforme hasta que se inyectó la glucosa. El aumento en la concentración de insulina medida tras el estímulo de glucosa IP fue drástico y dependiente de la dosis (comparar los datos obtenidos con una dosis de conjugado de 5 U/kg (izquierda) y 15 U/kg (derecha)). No se observó hipoglucemia en los puntos temporales inicial o final.

Ejemplo 57 - Estabilidad de los conjugados sensibles a glucosa de acción prolongada ilustrativos

En este ejemplo, los inventores sintetizaron la misma formulación exacta de acción prolongada del Ejemplo 56 a escala 2x. La mitad del material se almacenó a 2-8 C y la otra mitad se almacenó a temperatura ambiente durante una semana o dos semanas. Tas el tiempo de almacenamiento especificado, el material se redispersó y ensayó utilizando el mismo protocolo de inyección de glucosa IP de cuatro horas descrito en el Ejemplo 56 a una dosis de 15 U/kg (peso corporal en gramos/1,87 = microlitros de volumen de inyección). Como se muestra en las Figuras 38-39, esta formulación demuestra un comportamiento similar incluso después de almacenarse refrigerada (Figura 38) o a temperatura ambiente (Figura 39) durante al menos dos semanas.

Ejemplo 58 - Comportamiento de conjugados de acción prolongada preparados a partir de conjugados con afinidad y multivalencia del ligando variables

En este ejemplo, los inventores intentaron determinar el tiempo de acción y el perfil PK sensible a glucosa de las formulaciones de conjugados de acción prolongada construidas a partir de diferentes tipos y números de ligandos. Todos los conjugados de este ejemplo se sintetizaron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 20 usando los armazones y los ligandos de sacáridos especificados a continuación:

Conjugado	Armazón	Armazón MW	Ligando	AE-azúcar MW	Pureza (HPLC)	(CL-EM)	Azúcar/ Insulina
I-8: DSS-AEM-1 (B29)	DSS	368	AEM	223	>95 %	6168	1,0
I-7: TSAT-C6-AEM-2 (B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	95 %	6729	2,0
I-9: TSPE-AEM-3 (B29)	TSPE	813	AEM	223	>95 %	6829	3,0
I-10: DSS-AETM-1 (B29)	DSS	368	AETM	547	>95 %	6491	1,0
I-11: TSPE-AETM-3 (B29)	TSPE	813	AETM	547	>95 %	7800	3,0
I-17: C6-amida-AEM-2 (B29)	C6-amida	838	AEM	223	95 %	6745	2,0

La siguiente formulación de acción prolongada se usó para cada conjugado:

Componente	Variable	Volumen (ml)
Solución de conjugado en 2,7 mg/ml	insulina sin modificar = 16,7 %	1,000
solución salina tamponada con HEPES 250 mM	concentración de NaCl = 1,5 M	0,111
Solución de acetato de cinc	Concentración de cinc = 4,6 mg/ml	0,124
Solución de cresol en agua	3 % en v/v	0,159
Solución de protamina pH 7.2 en solución tamponada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina= 12,5 mg/ml	4 alícuotas x 0,194

Se llevaron a cabo experimentos de inyección de glucosa IP de cuatro horas (4 g/kg) dosificando 15 U/kg (peso corporal en gramos/1,87 = microlitros de volumen de inyección) de cada uno de los conjugados descritos anteriormente. Como se muestra en la Figura 40a-e, Todos los conjugados presentaron un perfil de absorción prolongado con algún elemento de aumento en la concentración de insulina en suero medida tras la inyección de glucosa de 4 horas. parece ser que la absorción del conjugado fue algo significativa en las primeras cuatro horas después de la inyección del conjugado 1-11 TSPE-AETM-3 de acción prolongada. Sin embargo, los demás conjugados presentaron perfiles de absorción uniformes similares a los observados para los conjugados TSAT-C6-AETM-2. Estos resultados se correlacionan bien con el hecho de que las semividas de estos conjugados son menores que las de la insulina modificada que se describe en los Ejemplos 47-48 y que cada una de ellas demuestra un aumento inducido por a-MM en el perfil PK/PD como se describe en los Ejemplos 45-46.

Ejemplo 59 - Comportamiento de los conjugados de acción prolongada en condiciones de ensayo IP de a-MM

En este ejemplo, los inventores ensayaron el perfil sensible a a-MM-de las formulaciones de conjugados de acción prolongada construidos a partir de los conjugados TSAT-C6-AETM-2 (1-6) y TSAT-C6-GA-2 (1-5). Se prepararon ambos conjugados de acuerdo con los métodos generales descritos en el Ejemplo 20. Además, se usó la siguiente formulación de acción prolongada para cada conjugado:

Componente	Variable	Volumen (ml)
Solución de conjugado en 2,7 mg/ml	insulina sin modificar = 16,7 %	1,000
solución salina tamponada con HEPES 250 mM	concentración de NaCl = 1,5 M	0,111
Solución de acetato de cinc	Concentración de cinc = 4,6 mg/ml	0,124
Solución de cresol en agua	3 % en v/v	0,159
Solución de protamina pH 7.2 en solución tamponada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina= 12,5 mg/ml	4 alícuotas x 0,194

Para ensayar la naturaleza de liberación sostenida de las formulaciones así como el perfil PK sensible a a-MM, se realizaron los siguientes experimentos. se inyectaron las formulaciones a 15 U/kg (peso corporal en gramos/1,87 = microlitros de volumen de inyección) por detrás del cuello de ratas no diabéticas normales en ayunas (Sprague-Dawley macho, 400-500 g, n = 3). Después de un retraso de 240 minutos, se inyectó IP una dosis a-MM (4 g/kg). Se recogieron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola a 0 minutos y a 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la conjugado inyección. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, se centrifugó la sangre de cada punto temporal a 4º C para recoger el suero. Se midieron posteriormente las concentraciones de insulina en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (Iso-Insulin ELISA, Mercodia,

Upsala, Suecia).

Como se muestra en la Figura 41a, La relación de la concentración en suero del máximo:valor inicial tras la inyección IP de a-MM para la formulación TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) de acción prolongada fue incluso mayor que la observada para la misma formulación cuando la glucosa se sustituyó por a-MM. Además, la formulación TSAT-C6-GA-2 (**I-5**) (Figura 41b) no demuestra ningún aumento en la concentración del conjugado en suero tras el estímulo de a-MM. Estos resultados se correlacionan bien con el hecho de que la semivida de eliminación del conjugado TSAT-C6-GA-2 (**I-5**) fue casi idéntica a la insulina sin modificar (Ejemplo 47) y que no presentó cambio inducido de a-MM en la PK (Ejemplo 45).

Ejemplo 60 - Conjugados de acción prolongada en sujetos diabéticos y no diabéticos

A fin de confirmar la utilidad *in vivo* de la formulación TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) de acción prolongada, los inventores administraron esta (5, 10 y 20 U/kg) a ratas normales y ratas diabéticas inducidas con STZ Sprague-Dawley macho, 400-500 g, n = 6). Se preparó la formulación usando el siguiente procedimiento:

Componente	Variable	Volumen (ml)
solución de TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) en 2,7 mg/ml	insulina sin modificar = 0 %	1,000
solución salina tamponada con HEPES 250 mM	concentración de NaCl = 1,5 M	0,111
Solución de acetato de cinc	Concentración de cinc = 4,6 mg/ml	0,124
Solución de cresol en agua	3 % en v/v	0,159
Solución de protamina pH 7.2 en solución tamponada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina= 12,5 mg/ml	4 alícuotas x 0,194

No se usaron inyecciones IP externas de glucosa para estimular la bioactividad de los conjugados. En vez de esto, los inventores se basaron en los niveles endógenos de glucosa en las ratas para controlar el perfil PK y PD de la formulación del conjugado. Se recogieron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola en diversos puntos temporales tras la inyección inicial de conjugado. Se midieron los valores de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Como se muestra en la Figura 42, no se observó hipoglucemia en los puntos temporales inicial o final para las ratas normales o diabéticas. Los perfiles de glucosa observados con las diabéticas son drásticos y demuestran que los conjugados se activaron por las concentraciones de glucosa mayores y ejercieron su efecto reductor de la glucosa de una manera proporcional a la dosis durante un periodo de tiempo largo (durante 8 horas a la dosis más alta).

El experimento se repitió usando diferentes dosis (7, 14 y 28 U/kg) y un periodo de tiempo más largo (24 horas). En la Figura 43 se muestran los resultados de ese experimento.

Ejemplo 61 - Conjugación con ésteres de ácidos grasos para generar formulaciones de acción prolongada

Se apreciará que los inventores podrían haber usado una estrategia alternativa a la protamina cinc insulina para preparar una forma de acción prolongada de un conjugado ilustrativo. En este ejemplo, los inventores demuestran como convertir un conjugado de insulina sustituido con B1 en una formulación de acción prolongada modificando covalentemente el grupo épsilon-amina en B29 con un ácido graso de cadena larga. Como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.869.930, acilación de la insulina con ácido mirístico C14, por ejemplo, conduce a un material soluble con un perfil de acción uniforme de tiempo prolongado. se sintetizó TSAT-C6-AETM-2 (**I-2**) sustituido en B1 de acuerdo con los métodos en el Ejemplo 12. A continuación se puede liofilizar el material en polvo seco y usarse como material de partida en el siguiente procedimiento.

Se disolvió éster NHS de ácido mirístico a 60 mM en 1 ml de DMSO anhidro seguido por la adición de 400 ul (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agitó rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. El Conjugado **I-2** se disolvió a continuación por separado en 7,5 ml de DMSO anhidro a una concentración de 8,1 mM. Una vez disuelta, se añadió toda la solución durante el transcurso de un minuto a la solución de éster NHS de ácido mirístico seguido por mezcla a temperatura ambiente durante dos hora más para asegurar la reacción completa.

A continuación se superdiluyó la solución resultante por 10x a 20 mM pH 5,0 de solución salina tamponada con HEPES que contenía 0,150 m de NaCl seguido por un ajuste del pH n HCl diluido hasta un pH final de 8,0. La solución acuosa se purificó en primer lugar mediante exclusión por tamaño usando una fase sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y sin conjugar. La solución que pasa a través del volumen vacío de la columna se concentra a continuación usando una membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada para aproximadamente 10 ml. Esta solución se purificó además para obtener el producto deseado usando HPLC preparativa en fase inversa en una columna SymmetryPrep C18, de 7 um de Waters, 19 x 150 mm. El tampón A es agua desionizada que contiene TFA al 0,1 % y el Tampón B es acetonitrilo que contiene TFA al 0,1 %. Antes de la purificación, se equilibró la columna a 15 ml/minutos con una fase móvil de 80 %A/20 %B usando un sistema DeltraPrep 600 de Waters. Aproximadamente 5 ml de la solución en bruto se inyectaron sobre la columna en el transcurso de 2 minutos a un caudal de 15 ml/minutos, tras lo cual se empleó un gradiente lineal de 80 % de A/20 %

de B a 75 % de A/25 %de B durante los siguientes 5 minutos seguido por un gradiente lineal más lento de 75 % de A/25 % de B a 62 % de A/38 % de B durante los siguientes 22 minutos. el tiempo de retención del pico deseado variará dependiendo del fármaco, el armazón, y el ligando utilizado. Una vez recogida, la solución se pasó por el evaporador rotatorio para eliminar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener el conjugado puro cuya identidad puede verificarse mediante CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA). El perfil PK/PD prolongado y sensible a sacáridos del conjugado resultante se puede evaluar a continuación usando las condiciones de la glucosa IP de 4 horas o a-MM descritas en los Ejemplos 50 y 59.

Ejemplo 62 - Conjugados de acción prolongada con insulina que poseen un punto isoeléctrico neutro

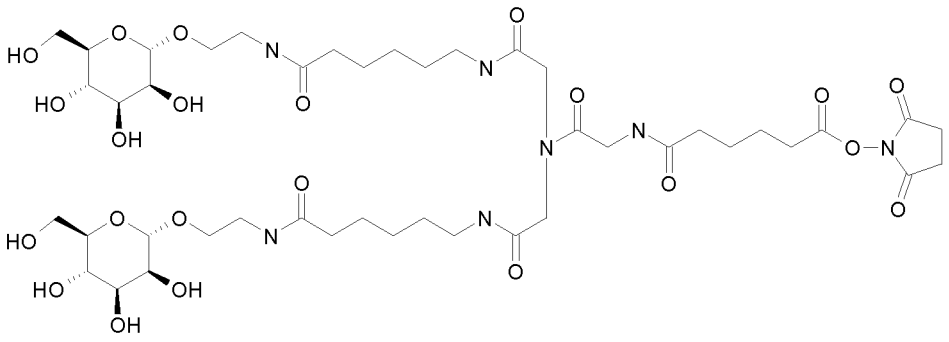
Se apreciará que los inventores podrían haber usado otras estrategias alternativas más a la protamina cinc insulina para preparar una forma de acción prolongada del conjugado. En este ejemplo, los inventores demuestran como sintetizar conjugados de acción prolongada sustituyendo la insulina glargina (LANTUS®), por ejemplo, en vez de la insulina humana natural en la preparación del conjugado. Se pueden usar cualquiera y todos los métodos de síntesis descritos en los ejemplos precedentes para formar conjugados de insulina glargina. La insulina glargina es un análogo de insulina ilustrativa de acción prolongada en la que Asp-A21 se ha sustituido por glicina y se han añadido dos argininas al extremo C de la cadena B. El efecto de estos cambios es desplazar el punto isoeléctrico, produciendo una solución que es completamente soluble a pH 4 pero insoluble a pH fisiológico. Una vez sintetizado y purificado, el perfil PK/PD prolongado y sensible a sacáridos del conjugado resultante se puede evaluar a continuación usando las condiciones de la glucosa IP de 4 horas o a-MM descritas en los Ejemplos 50 y 59.

Ejemplo 63 - Uso de conjugados solubles en un sistema de administración mediante bomba

En vez de conjugar los conjugados sensibles a sacáridos en formulaciones de acción prolongada, cada una puede infundirse continuamente de manera intravenosa, subcutánea, o intraperitoneal usando un sistema de administración mediante bomba. La solución estéril de conjugado a una concentración conocida (normalmente 25-100 U/ml) se carga en el depósito de la bomba y se administra continuamente en el compartimento de elección a una tasa estacionaria. Esta tasa se ajusta al nivel máximo en el que no se observa hipoglucemia en el sujeto. A continuación, usando las condiciones de glucosa IP de 4 horas o a-MM descritas en los Ejemplos 50 y 59, se puede evaluar el perfil PK/PD sensible a glucosa. El método de la bomba es ventajoso porque no se requieren excipientes para proporcionar una entrada estacionaria y una tasa de absorción para los conjugados. Se han descrito en la técnica varias bombas de insulina y se pueden usar para este fin. Por ejemplo, véase una cualquiera de las bombas descritas en las patentes de Estados Unidos números 4.435.173, 4.498.843, 4.923.375, 5.062.841, 6.650.951, 6.744.350, 6.852.104, 7.377.907 y 7.515.060, y las publicaciones de patentes de Estados Unidos números 20080172028, 20090005726, 20090112165, 20090137957, 20090177142, 20090177154 y 20100004598, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia.

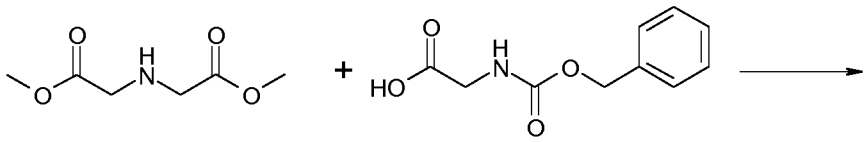
Ejemplo 64 - Síntesis de intermedio de C6-amida-AEM-2

Este ejemplo describe un proceso sintético para preparar un intermedio de ZC-AEM-2 que tiene la siguiente estructura química:

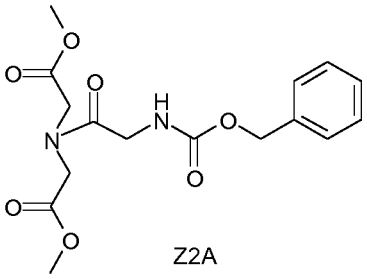


a. Intermedio Z2A

La primera fase del proceso implicó combinar los reactivos Z1A y Z1B para producir el intermedio Z2A como se muestra en el siguiente esquema de reacción:



Z1A Z1B



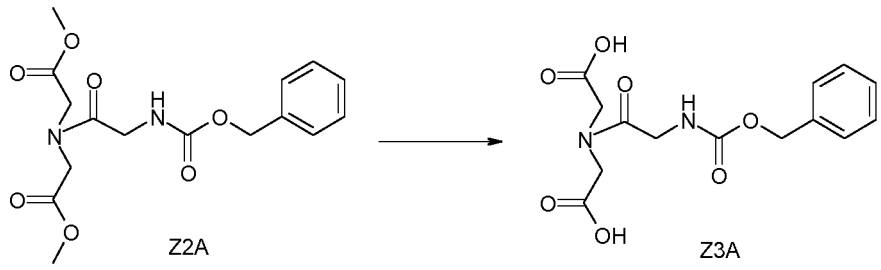
Z2A

Esto se consiguió de la siguiente manera. En un matraz de dos bocas y 250 ml se añadió el compuesto Z1B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 13,9 g), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 11,0 g) y dimetilformamida (DMF, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfrió a 0 °C, tiempo después del cual se añadieron que el Compuesto Z1A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 9,5 ml) y di-isopropilcarbodiimida (DIC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 9,8 ml) a la mezcla en una atmósfera de nitrógeno. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después de 36 horas de reacción, se añadió (dimetilamino)piridina (DMAP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 7,71 g) y después de 48 horas, la mezcla de reacción se filtró con un embudo Buchner. El filtrado se mantuvo a 4 °C durante una noche se sometió a tratamiento al día siguiente.

El filtrado se evaporó y el residuo resultante se recogió en 120 ml de acetato de etilo y se lavó sucesivamente con una solución acuosa al 10 % de HCl (3 x 30 ml), una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (3 x 30 ml) y salmuera (3 x 20 ml), y se secó sobre sulfato sódico anhidro. La solución se concentró a sequedad al vacío para producir el producto que pudo usarse sin purificación adicional.

b. Intermedio Z3A

La segunda fase del proceso implicó convertir el intermedio Z2A en el intermedio Z3A como se muestra en el siguiente esquema de reacción:

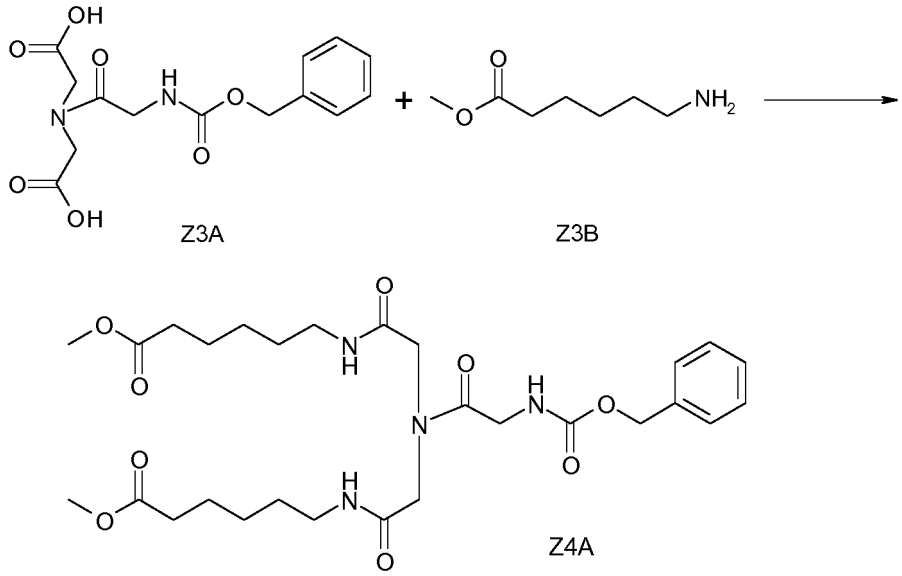


Z2A Z3A

El compuesto Z2A (16,0 g) se disolvió en metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 85 ml) y la solución se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota una solución acuosa al 10 % de hidróxido sódico (19 ml) y la reacción se agitó a 0 °C durante 3 horas. A continuación, la suspensión se disolvió con una cantidad mínima de agua (15 ml). A esta solución se le añadió Amberlite IR-120 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, forma H+), en alícuotas de 15 x 2 g a 0 °C. La suspensión de perlas se agitó durante 0,5 h, dando como resultado un pH de la solución de ~5. La mezcla resultante se filtró para retirar las perlas de Amberlite y el filtrado se concentró y se secó al vacío para producir un sólido de color blanco-rojo, rendimiento del 13,0 g.

c. Intermedio Z4A

La tercera fase del proceso implicó combinar el intermedio Z3A con el reactivo Z3B para producir el intermedio Z4A como se muestra en el siguiente esquema de reacción:



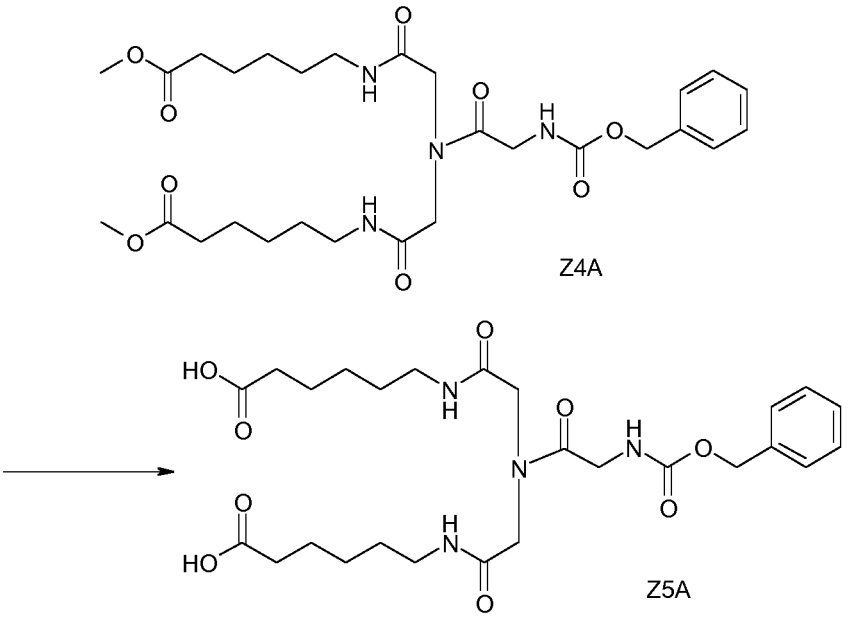
El compuesto Z3B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 19,0 g) se disolvió en DMF (50 ml). La suspensión se enfrió a 0 °C, tiempo después del cual se añadió trietilamina (15,0 ml) a la solución. La temperatura de la solución se mantuvo a 0 °C durante 0,75 horas. A continuación, la solución se cargó con una solución del Compuesto Z3A (13,0 g) disuelto en DMF (24 ml) a 0 °C, seguido de HOBT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 15,9 g), DMF (50 ml) y DIC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 15,0 ml). La solución resultante se agitó durante una hora más a 0 °C y después se dejó calentar a temperatura ambiente y se hizo reaccionar durante una noche durante 18 horas más.

A continuación, la reacción se enfrió de nuevo a 0 °C y se añadió N,N-diisopropiletilamina (DIPEA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 15 ml) y la solución resultante se agitó durante 0,5 h hasta que el pH de la solución fue aproximadamente 9,0. Se añadieron cloruro de metileno anhidro (25 ml) y DIC (3,5 ml) y la agitación se continuó durante 10 horas más. Se añadió más cantidad del compuesto Z3B (base libre, 2,5 g) y la reacción se dejó tener lugar durante 50 horas más a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno.

Finalmente, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró mediante evaporación rotatoria. El residuo se disolvió en cloruro de metileno (CH_2Cl_2, 400 ml) y la fase orgánica se lavó con una solución al 5 % de HCl (3 x 200 ml). La capa orgánica se enfrió a 0 °C y se neutralizó con a una solución saturada de bicarbonato sódico (3 x 100 ml) y salmuera (2 x 200 ml). La solución orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, que después se separó por filtración y se concentró usando evaporación rotatoria. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (fase eluyente: 50:1 a 5:1 de cloruro de metileno/metanol). Las fracciones de la columna se concentraron y se secaron al vacío durante una noche. Se obtuvo un sólido de color blanco como Z4A (18,9 g, rendimiento 81 %).

d. Intermedio Z5A

La cuarta fase del proceso implicó convertir el intermedio Z4A en el intermedio Z5A como se muestra en el siguiente esquema de reacción:

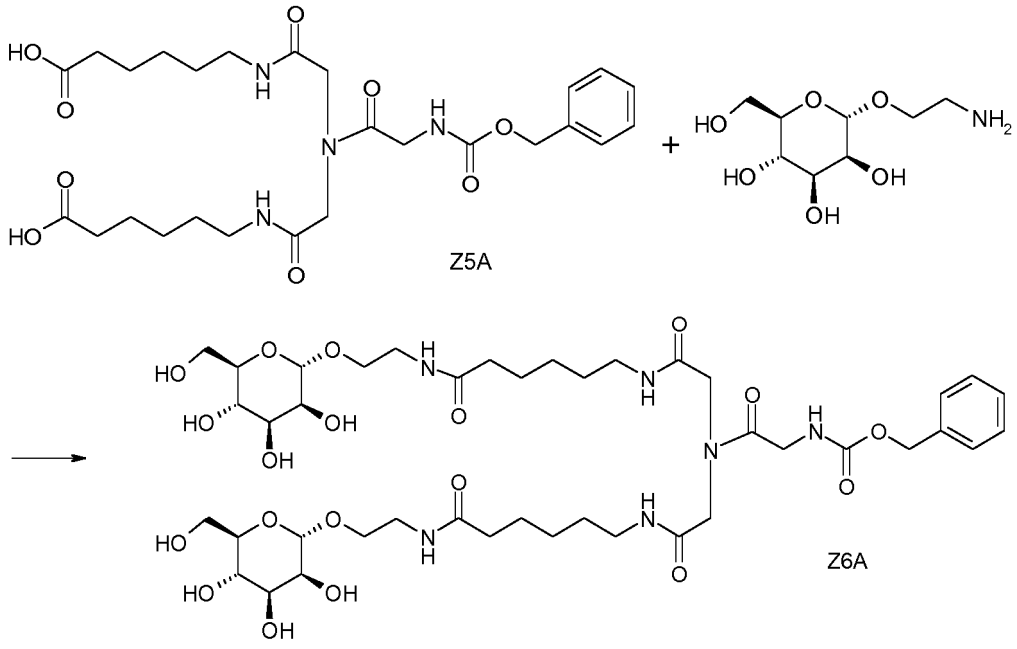


El éster Z4A (2,27 g) se disolvió en metanol (10 ml) y a esta solución se añadieron 5,0 ml de una solución 1,0 M de hidróxido sódico a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 38 horas. Al final de este tiempo, se añadieron 1,5 ml más de solución acuosa 2,0 M de hidróxido sódico y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas más.

A continuación, la mezcla de reacción se acidificó con una solución acuosa al 10 % de HCl a 0 °C. El producto se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y después se concentraron a sequedad al vacío durante una noche para producir Z5A en forma de un sólido de color blanco (2,2 g).

e. Intermedio Z6A

La quinta fase de este proceso implicó combinar el intermedio Z5A con aminoetilmanosa (AEM) para producir el intermedio Z6A como se muestra en el siguiente esquema de reacción:



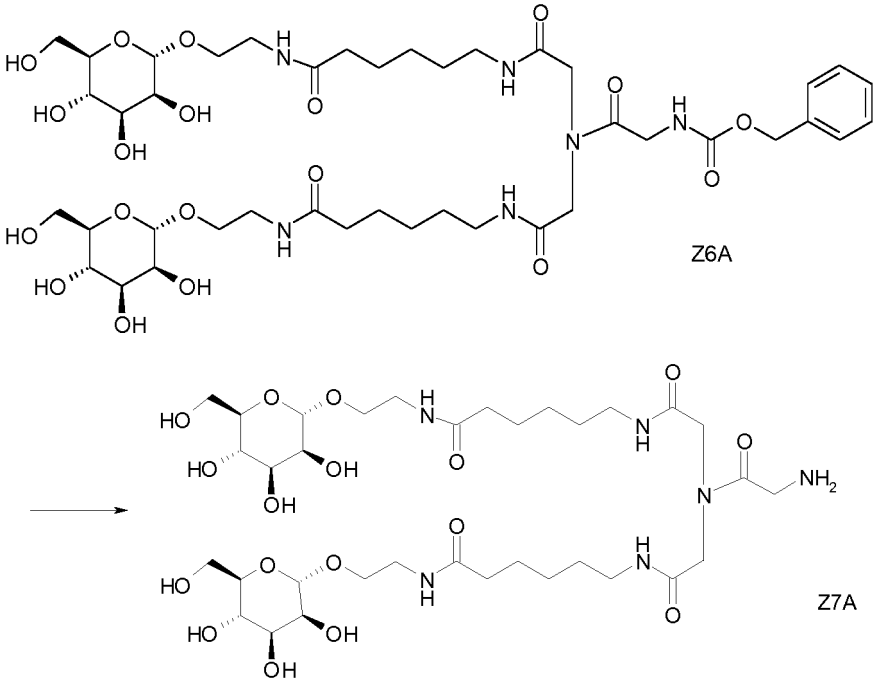
Se disolvieron el compuesto de diácido Z5A (2,0 g), aminoetilmanosa (1,46 g), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 2,7 g) en DMF seca (80 ml) en una atmósfera de nitrógeno a 0 °C. Se añadió gota a gota DIPEA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 3,0 ml) a la mezcla a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 1 h a 0 °C y después durante 4 h más a

temperatura ambiente. En este punto, se añadió otra alícuota de aminoetilmanosa (0,5 g) y HATU (0,52 g) a la solución de reacción a temperatura ambiente y la solución se agitó durante 3 horas más. La mezcla se concentró mediante evaporación rotatoria y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (20:1 de cloruro de metileno/metanol, después 6:1 eluyendo a 1:1). Las fracciones se recogieron y se evaporaron al vacío para producir el producto purificado (TLC: punto superior, Fr 0,6, 1:3 de cloruro de metileno:metanol).

Se apreciará que todo este proceso puede repetirse para obtener conjugados con diferentes ligandos, reemplazando AEM por otro reactivo que contiene amina (por ejemplo, sin limitación, AEG, AEBM, AETM, etc.) cuando se convierte el intermedio Z5A en el intermedio Z6A.

f. Intermedio Z7A

La sexta fase del proceso implicó convertir el intermedio Z6A en el intermedio Z7A como se muestra en el siguiente esquema de reacción:

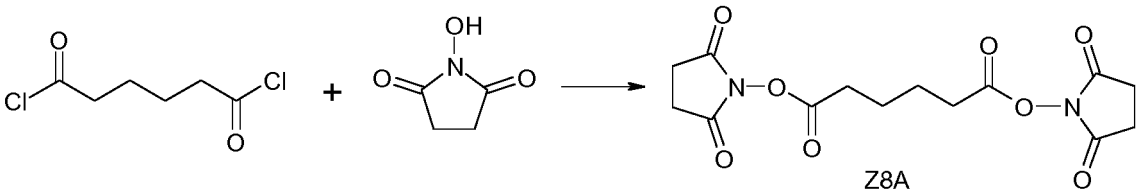


El Compuesto Z6A (1,43 g) se disolvió en metanol anhidro (100 ml). A esta solución se le añadió (1,00 g de paladio sobre carbono (Pd/C)) y se burbujeó gas de hidrógeno en la solución para reducir el grupo protector para dar la amina correspondiente. Se descubrió que la reacción había alcanzado una conversión completa después de aproximadamente 9 horas de reacción.

La mezcla de reacción se filtró a través de una capa de Celite y el filtrado se concentró y se secó al vacío. El Compuesto Z7A se obtuvo en forma de un sólido de color pardo (1,16 g, rendimiento 94 %).

g. Intermedio Z8A

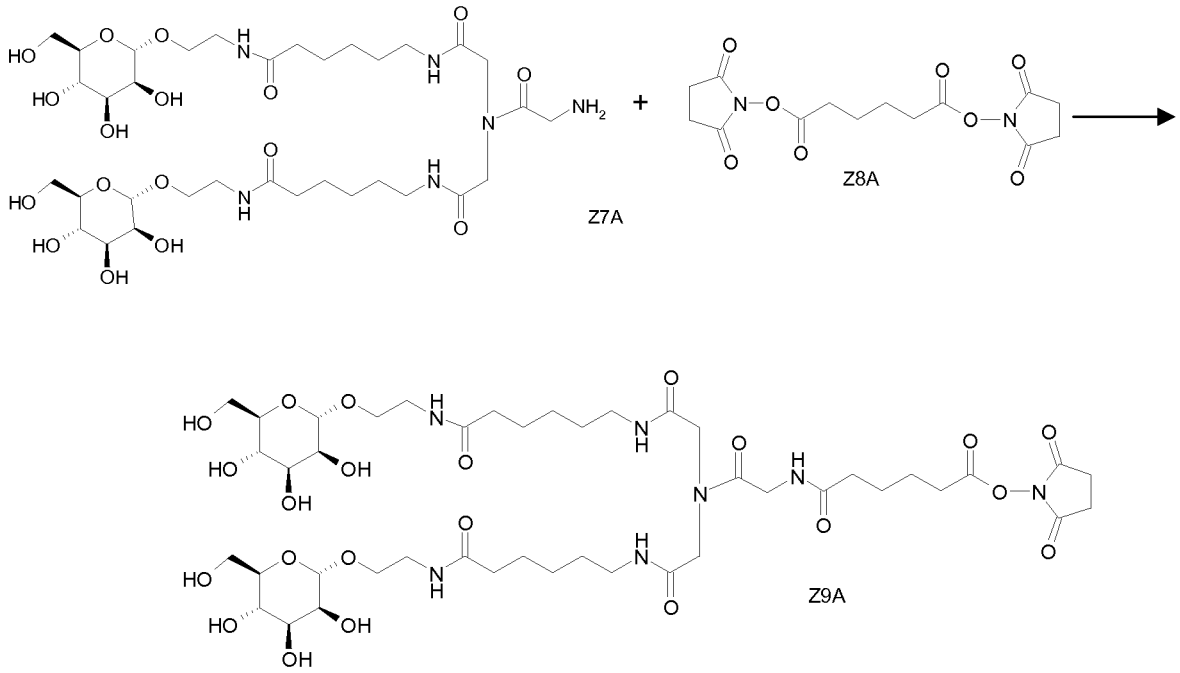
El siguiente esquema muestra como se preparó el agente de acoplamiento Z8A:



A una solución enfriada de N-hidroxisuccinimida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, NHS, 7,0 g) en CH_2Cl_2 seco (65 ml) a 0 °C se añadió trietilamina (9,5 ml) y cloruro de adipoílo (3,97 ml, 5,0 g). La mezcla resultante se agitó durante 2 h a 0 °C. La mezcla se lavó con una solución acuosa saturada de NaCl (3 x 30 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. La solución se filtró y se concentró al vacío y después el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice para obtener un sólido de color blanco (6,6 g) como producto Z8A.

h. Intermedio Z9A

El siguiente esquema muestra como se combinó el agente de acoplamiento Z8A con el intermedio Z7A para producir el intermedio Z9A:



El Compuesto Z7A (0,256 g) se disolvió en DMF seca y la solución se enfrió a 0 °C. A esta solución se le añadió una solución de Z8A (0,710 g) en DMF anhidra (15 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a 0 °C durante 2 horas.

El volumen de la solución se concentró a un tercio y se retiró por filtración el exceso de DSS sin reaccionar. El filtrado se concentró adicionalmente a aproximadamente 3 ml de columna y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: 20:1 a 4:1 de cloruro de metileno/metanol, después 3:1 a 1:1). Las fracciones recogidas se concentraron y se secaron al vacío para dar 151 mg de producto purificado. RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO) δ 1,28-1,63 (banda, 20H), 2,07-2,22 (banda, 6H), 2,85 (s, 4H), 3,08-3,64 (banda, 22H), 3,91 (s, 4H), 4,08 (s, 2H), 4,49 (s, 2H), 4,57 (d, 2H, J = 5,70 Hz), 4,64 (s, 2H), 4,73 (t, 4H, J = 5,10 Hz), 7,85 (s, 2H, amida NH), 8,68, 8,19, 7,98 (s, 3H, amida NH). CL-EM (Encontrado 1074,67 [M + Na+], M = 1051,57 Da; Calculada 1052,08 Da).

Ejemplo 65 - **Síntesis de conjugado de C6-amida-AEM-2 (B1)**

Este ejemplo describe un método para preparar un conjugado de insulina B1 a partir del intermedio Z9A del Ejemplo 64. El Compuesto Z9A se conjugó con insulina de la siguiente manera. Se disolvió NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulina sintetizada de acuerdo con el Ejemplo 8 (0,167 g) en DMSO seco (3 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno y se agitó durante 0,5 horas a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió trietilamina anhidra (0,013 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió el Compuesto Z9A (0,177 g) en DMSO seco (1,5 ml) mediante una bomba de jeringa a una tasa de (4,2 ul/min) a la mezcla de insulintrietilamina a temperatura ambiente a una velocidad de agitación de 80 rpm. La conversión de la reacción se controló por HPLC analítica. Después de 4 horas, se añadieron 3 equivalentes más de TEA (0,010 ml) a la mezcla de reacción. Después de un total de 10,5 horas a temperatura ambiente, la reacción se detuvo y se puso en un congelador a -20 °C durante una noche.

Al día siguiente, la mezcla de reacción se descongeló y se puso en una pequeña columna empaquetada de perlas de intercambio iónico (perlas SP Sephadex, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, condiciones isocráticas). La columna se centrifugó brevemente durante 4 min a 1000 x g para purificar el conjugado de insulina (evaluado por HPLC analítica). Las fracciones recogidas de la columna de intercambio iónico (6 ml) se añadieron gota a gota a acetona seca (30 ml) con agitación a 140 rpm durante 10 min. La suspensión resultante se vertió en un tubo de centrifugación de 50 ml que se centrifugó durante 10 min a 3500 x g. El sobrenadante transparente se retiró de los tubos y la torta se dejó a un lado. El sobrenadante se añadió a 30 ml más de acetona para obtener un segundo cultivo de precipitado (después de añadir unas gotas de HCl 5 N), que después se centrifugó durante 10 min a 3500 x g para obtener una segunda torta de centrifugado.

Las tortas combinadas se secaron al vacío durante 1 hora, para obtener un sólido de color blanco (197 mg, rendimiento del 92 %) a una pureza de >98 % según HPLC analítica. Los grupos BOC del conjugado de insulina se retiraron por el procedimiento expuesto en el Ejemplo 12 para obtener el conjugado de insulina biológicamente activo.

El proceso descrito en este ejemplo tiene la ventaja de producir con alto rendimiento y alta pureza un conjugado de insulina sin que necesite HPLC de fase inversa.

Ejemplo 66 - Síntesis de 1-17: conjugado de C6-amida-AEM-2 (B29)

Este ejemplo describe un método para preparar un conjugado de insulina B29 a partir del intermedio Z9A del Ejemplo 64. El Compuesto Z9A se conjugó con insulina de la siguiente manera. Se disolvió NH_2-B29-BOC2(A1,B1)-insulina sintetizada de acuerdo con el Ejemplo 16 (0,167 g) en DMSO seco (3 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno y se agitó durante 0,5 horas a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió trietilamina anhidra (0,013 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió el Compuesto Z9A (0,177 g) en DMSO seco (1,5 ml) mediante una bomba de jeringa a una tasa de (4,2 ul/min) a la mezcla de insulina-trietilamina a temperatura ambiente a una velocidad de agitación de 80 rpm. La conversión de la reacción se controló por HPLC analítica. Después de 4 horas, se añadieron 3 equivalentes más de TEA (0,010 ml) a la mezcla de reacción. Después de un total de 10,5 horas a temperatura ambiente, la reacción se detuvo y se puso en un congelador a -20 °C durante una noche.

Al día siguiente, la mezcla de reacción se descongeló y se puso en una pequeña columna empaquetada de perlas de intercambio iónico (perlas SP Sephadex, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, condiciones isocráticas). La columna se centrifugó brevemente durante 4 min a 1000 x g para purificar el conjugado de insulina (evaluado por HPLC analítica). Las fracciones recogidas de la columna de intercambio iónico (6 ml) se añadieron gota a gota a acetona seca (30 ml) con agitación a 140 rpm durante 10 min. La suspensión resultante se vertió en un tubo centrifugación de 50 ml que se centrifugó durante 10 min a 3500 x g. El sobrenadante transparente se retiró de los tubos y la torta se dejó a un lado. El sobrenadante se añadió a 30 ml más de acetona para obtener un segundo cultivo de precipitado (después de añadir unas gotas de HCl 5 N), que después se centrifugó durante 10 min a 3500 x g para obtener una segunda torta de centrifugado.

Las tortas combinadas se secaron al vacío durante 1 hora, para obtener un sólido de color blanco. Los grupos BOC del conjugado de insulina se retiraron por el procedimiento expuesto en el Ejemplo 12 para obtener el conjugado de insulina biológicamente activo.

Ejemplo 67 - Síntesis alternativa de 1-17: conjugado de C6-amida-AEM-2 (B29)

Este ejemplo describe otro método para preparar un conjugado de insulina B29 a partir del intermedio Z9A del Ejemplo 64. Específicamente, este método alternativo implica acoplar directamente el compuesto Z9A a insulina no protegida en el grupo epsilon amino de B29. El Compuesto Z9A se disolvió a 53 mM en 1,0 ml de DMSO anhidro, seguido de la adición de 0,4 ml (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agitó rápidamente durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se disolvió por separado polvo de insulina humana recombinante (IHR) a 17,2 mM en 1 ml de un tampón de carbonato sódico 0,1 M de pH 11 y a continuación el pH se ajustó a 10,8 con hidróxido sódico 1,0 N. Una vez disuelta, toda la solución de Compuesto Z9A se añadió gota a gota durante el transcurso de 10 minutos a la solución de insulina/tampón carbonato. La solución se dejó en agitación durante 15 minutos más tras la adición gota a gota para asegurar una reacción completa.

Después, la solución resultante se superdiluyó 10x en una solución salina tamponada con HEPES 20 mM de pH 5,0 que contenía NaCl 0,150 M, seguido de ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8,0. La solución acuosa se purificó en primer lugar por exclusión de tamaño usando Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para la separación deseada de conjugado y materiales no conjugados. Después, la solución que pasó a través del volumen hueco de la columna se concentró usando una membrana de ultrafiltración de 3 kDa a aproximadamente 15 ml. Esta solución se purificó adicionalmente para obtener el producto deseado usando HPLC preparativa de fase inversa en una columna Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm. El tampón A fue agua desionizada que contenía 0,1 % de TFA y el tampón B fue acetonitrilo que contenía un 0,1 % de TFA. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 80 % de A/20 % de B usando un sistema Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución en bruto en la columna en el transcurso de 2 minutos a un caudal de 15 ml/minuto, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 80 % de A/20 % de B a 75 % de A/25 % de B durante los siguientes 5 minutos, seguido de un gradiente lineal más lento de 75 % de A/25 % de B a 62 % de A/38 % de B durante los siguientes 22 minutos. Una vez se recogió la fracción deseada, la solución se sometió a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener un conjugado puro, cuya identidad se verificó por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA). Se descubrió que el producto final (95 % puro según HPLC) tenía el PM deseado de 6744 g/mol (CL-EM), representando un total de 2,0 moléculas de AEM conjugadas por insulina, con más del 85 % de las moléculas de conjugado conjugadas en el sitio de Lys-B29 (según se determinó por secuenciación del extremo N).

Ejemplo 68 - **Conjugados 1-17 de acción prolongada**

En este ejemplo, los inventores se propusieron determinar el tiempo de acción y el perfil farmacocinético sensible a glucosa de formulaciones de acción prolongada de conjugados construidos a partir del Compuesto Z9A del Ejemplo 64. El conjugado para este ejemplo se sintetizó de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 67. La siguiente formulación de acción prolongada se usó para este conjugado:

Componente	Variable	Volumen (ml)
solución de conjugado **I-17** a 2,7 mg/ml	insulina no modificada = 16,7 %	1,000
solución salina tamponada con HEPES 250 mM	concentración de NaCl = 1,5 M	0,111
Solución de acetato de cinc	Concentración de cinc = 4,6 mg/ml	0,124
Solución de cresol en agua	3 % v/v	0,159
Solución de protamina de pH 7,2 en solución salina tamponada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12,5 mg/ml	4 x 0,194 alícuotas

Los experimentos de inyección IP de glucosa de cuatro horas (4 g/kg) se realizaron dosificando 15 U/kg (peso corporal en gramos/1,87 = microlitros de volumen de inyección) de la formulación descrita anteriormente. Como se muestra en la Figura 44, el conjugado muestra un perfil de absorción prolongado con un aumento significativo de la concentración de insulina en suero medida después de la inyección de glucosa de 4 horas.

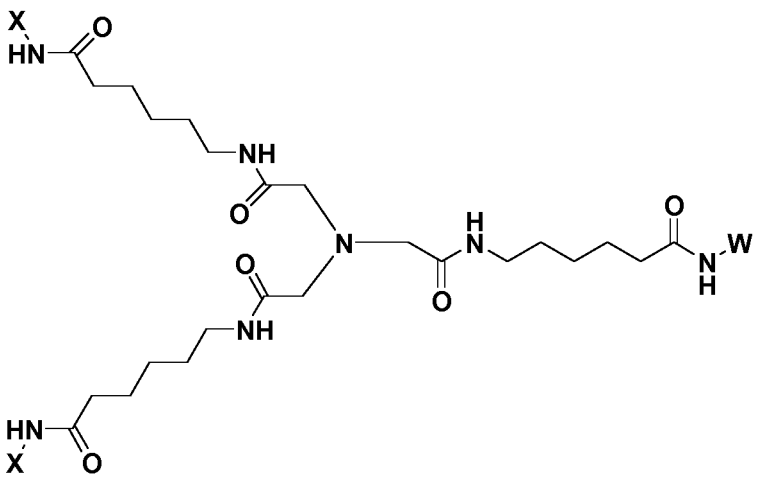
Ejemplo 69 - **Conjugados preparados a partir de 2-aminoetil alfa-L-fucopiranósido y 2-aminoetil N-acetil-beta-D-glucosamina y evaluación**

Los datos del Ejemplo 42 demuestran la capacidad de la L-fucosa de inhibir la supuesta ruta de lectina que conduce al perfil farmacocinético aumentado de conjugados a modo de ejemplo. También se sabe que la N-acetil glucosamina beta-enlazada puede inhibir también las rutas para las cuales son inhibidores la manosa y la fucosa (por ejemplo, véase Haurum et al. en Biochem. J. 293:873-878, 1993). Este ejemplo describe como pueden sintetizarse conjugados de insulina, tales como los descritos anteriormente, usando ligandos de 2-aminoetil alfa-L-fucopiranósido o 2-aminoetil N-acetil-beta-D-glucosamina. El 2-aminoetil alfa-L-fucopiranósido (PM = 207 g/mol) se prepara de acuerdo con el método de Ni et al. en Bioconjugate Chem. 14:232-238, 2003. La 2-aminoetil N-acetil-beta-D-glucosamina (PM = 264 g/mol) se sintetiza de acuerdo con el método de Cai et al. en Organic Letters 7:4021-4024, 2005. Uno cualquiera de estos ligandos puede sustituirse fácilmente por los ligandos de azúcar funcionalizados con amino en cualquiera de los métodos de síntesis de conjugados descritos anteriormente en los Ejemplos 11-13, 15, 17-27 y 29-31.

La farmacocinética de los conjugados resultantes se ensayó *in vivo* para aumentos inducidos por a-MM, L-fucosa o glucosa en perfiles farmacocinéticos/farmacodinámicos tras inyección subcutánea en ratas de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 42. Los conjugados también pueden formularse como formulaciones de liberación sostenida de acuerdo con los métodos de los Ejemplos 50-55 y posteriormente pueden evaluarse sus farmacocinéticas prolongadas y sensibles a la glucosa de acuerdo con el protocolo de inyección IP de glucosa de 4 horas indicado en esos mismos ejemplos. También pueden emplearse métodos de sostenimiento de la liberación alternativos de estos conjugados, tales como los descritos en los Ejemplos 61-63.

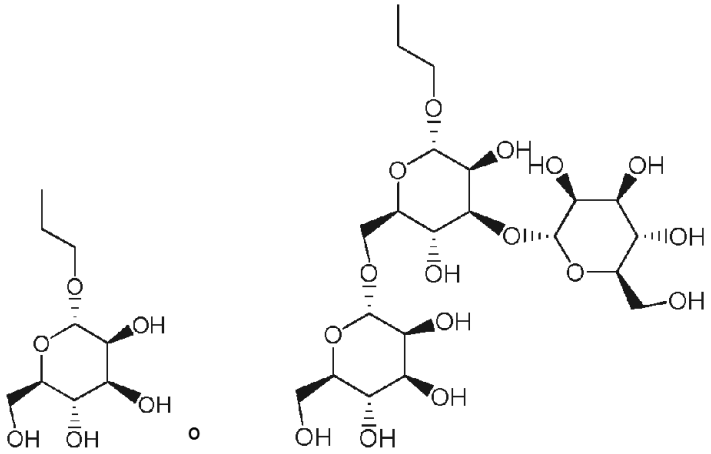
Ejemplo 70 - **Conjugado a modo de ejemplo de fórmula (VIb-3)**

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un conjugado de fórmula (VIb-3):



en la que:

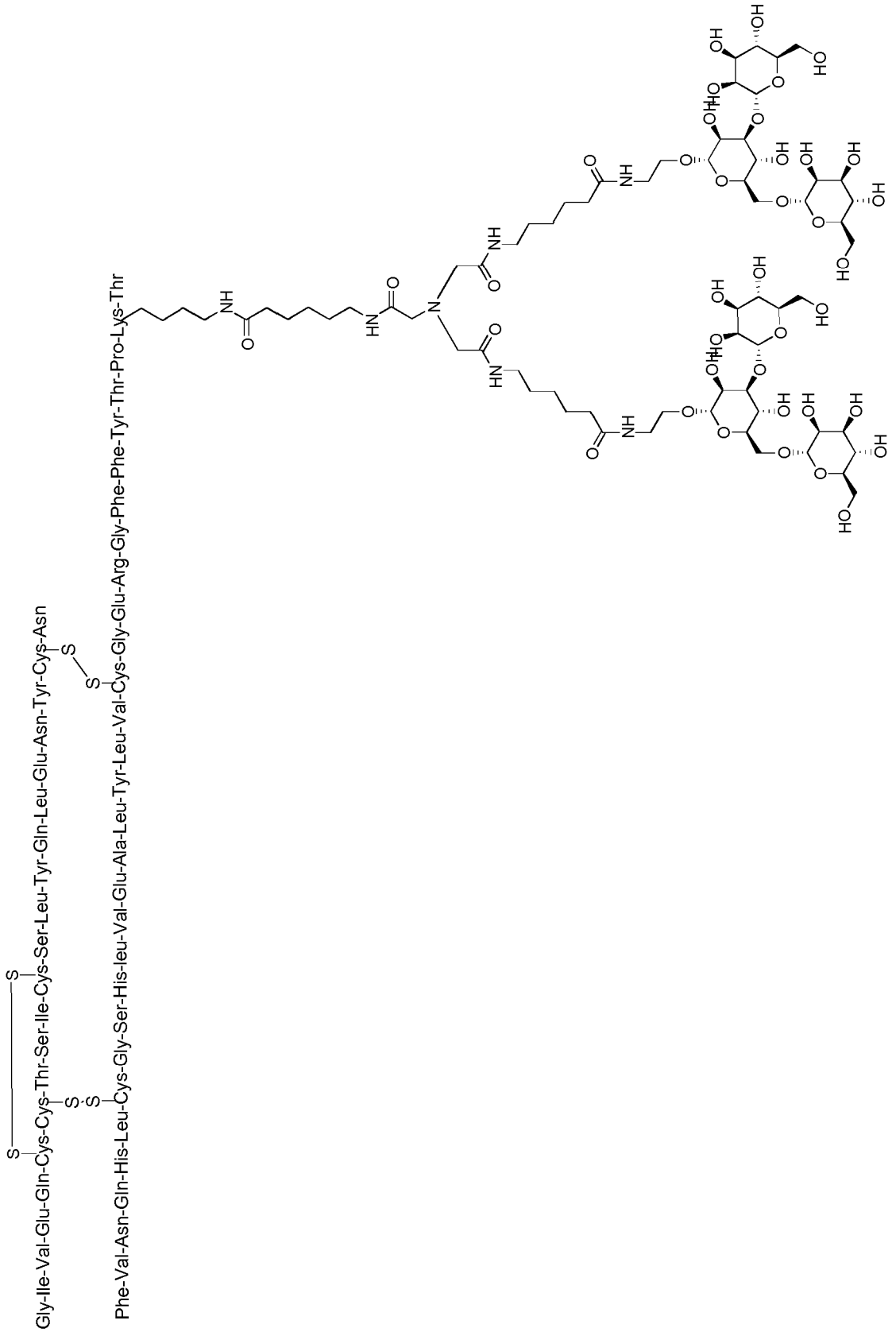
W es una molécula de insulina; y
cada vez que aparece -X es



En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se selecciona entre el grupo que consiste en insulina humana, insulina porcina e insulina bovina. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina incluye tres puentes disulfuro.

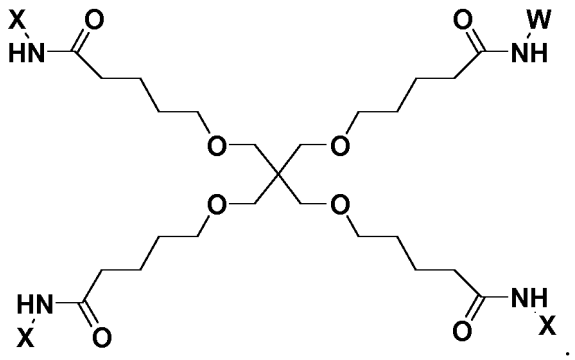
Ejemplo 71 - Conjugado a modo de ejemplo I-6

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona el conjugado **I-6**:



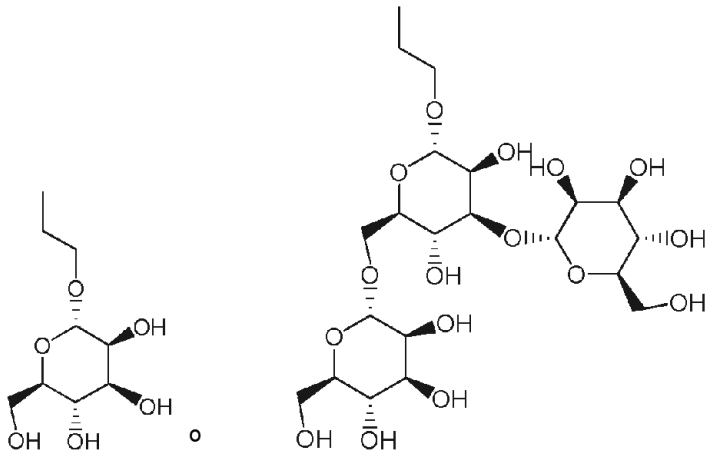
Ejemplo 72 - Conjugado a modo de ejemplo de fórmula (VIc-2)

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un conjugado de fórmula (VIc-2):



en la que:

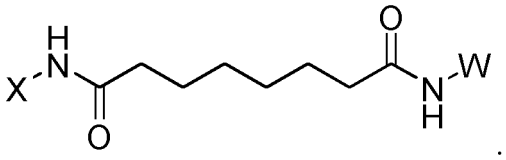
W es una molécula de insulina; y
cada vez que aparece -X es



En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se selecciona entre el grupo que consiste en insulina humana, insulina porcina e insulina bovina. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina incluye tres puentes disulfuro.

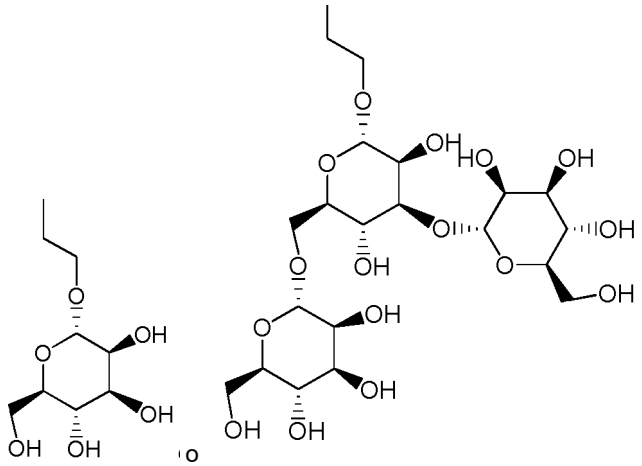
Ejemplo 73 - **Conjugado a modo de ejemplo de fórmula (VId-1)**

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un conjugado de fórmula (VId-1):



en la que:

W es una molécula de insulina; y
-X es



En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se selecciona entre el grupo que consiste en insulina humana, insulina porcina e insulina bovina. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina incluye tres puentes disulfuro.

Ejemplo 74 - **Formulaciones ilustrativas**

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona formulaciones de liberación sostenida que comprenden un conjugado, en el que la formulación comprende protamina y cinc. debe entenderse que la presente divulgación abarca formulaciones de liberación contenida con uno cualquiera de los conjugados descritos en el presente documento (por ejemplo, aunque no de forma limitativa, uno cualquiera de los conjugados de las Figuras 45, 49, 55, 60, 61, o 62).

En determinadas realizaciones, la formulación incluye desde aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg de protamina/mg de conjugado; y de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,25 mg de zinc/mg de conjugado.

En determinadas realizaciones, la formulación incluye protamina y cinc en una relación (p/p) en el intervalo de aproximadamente 40:1 a aproximadamente 10:1.

En determinadas realizaciones, la formulación comprende además una cantidad de molécula de insulina sin conjugar. En determinadas realizaciones, la formulación comprende una relación molar de una molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina sin conjugar en el intervalo de aproximadamente 25:1 a aproximadamente 2:1.

En determinadas realizaciones, la formulación comprende además un conservante antimicrobiano. En determinadas realizaciones, el conservante antimicrobiano es m-cresol. En determinadas realizaciones, la formulación comprende desde aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,35 % en v/v de m-cresol.

En determinadas realizaciones, la formulación comprende además un agente isotónico. En determinadas realizaciones, el agente isotónico es glicerol. En determinadas realizaciones, el agente isotónico es NaCl. En determinadas realizaciones, la formulación comprende desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,2 M de NaCl.

En determinadas realizaciones, la formulación comprende:

protamina y cinc en una relación (p/p) en el intervalo de aproximadamente 40:1 a aproximadamente 10:1;
una relación molar de una molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina sin conjugar en el intervalo de aproximadamente 25:1 a aproximadamente 2:1;
aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0.35 % en v/v de m-cresol; y glicerol o desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,2 M de NaCl.

En determinadas realizaciones, la formulación comprende:

aproximadamente 3,6 mg de protamina/mg de conjugado; y
aproximadamente 0,2 mg de cinc/mg de conjugado.

En determinadas realizaciones, la formulación comprende:

aproximadamente 3,6 mg de protamina/mg de conjugado;
aproximadamente 0,2 mg de cinc/mg de conjugado; y

una relación molar de una molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina sin conjugar en el intervalo de aproximadamente 5:1.

En determinadas realizaciones, la formulación comprende:

aproximadamente 3,6 mg de protamina/mg de conjugado;
aproximadamente 0,2 mg de cinc/mg de conjugado;
una relación molar de una molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina sin conjugar de aproximadamente 5:1; y
aproximadamente 0.2 % en v/v de m-cresol.

En determinadas realizaciones, la formulación comprende:

aproximadamente 3,6 mg de protamina/mg de conjugado;
aproximadamente 0,2 mg de cinc/mg de conjugado;
una relación molar de una molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina sin conjugar de aproximadamente 5:1;
aproximadamente 0.2 % en v/v de m-cresol; y
glicerol o aproximadamente 0.15 M de NaCl.

Ejemplo 75 - Conjugación de insulina con ésteres activados multivalentes en disolvente orgánico (fármaco añadido en primer lugar) para dar conjugados de insulina sustituidos en A1 - procedimiento general

Etapa 1

Se disolvió insulina en una mezcla 66:37 vol:vol de tapón carbonato sódico 100 mM (pH 11) y acetonitrilo a una concentración de 14,7 mM. Por separado, se disolvió un éster activado de grupo protector monofuncional (por ejemplo, BOC-NHS) a 467 mM en acetonitrilo. Una vez se disolvió la insulina, se añadieron pequeñas alícuotas del éster activado de grupo protector monofuncional (por ejemplo, BOC-NHS) a la solución de insulina. El pH se controló a lo largo del proceso y se mantuvo entre 10,2-11,0 mediante la adición de hidróxido sódico 0,1 M. La reacción se controló por HPLC de fase inversa. Se añadieron alícuotas del éster activado de grupo protector monofuncional hasta que el cromatograma de HPLC mostró que se había hecho reaccionar toda la insulina no modificada y que una porción sustancial de la mezcla de reacción se había convertido en insulina protegida en B29. Normalmente, el grupo protector tendrá una naturaleza más hidrófoba y, una vez reaccione en la insulina, se eluirá a un tiempo de retención de HPLC que es más largo que el de la insulina no modificada.

Etapa 2

Por separado, un armazón que contenía ésteres con el extremo N activado se disolvió a 174 mM en 1,267 ml de DMSO anhidro, seguido de la adición de 100 µl (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agitó rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. En otro vial, una solución 370 mM de ligando se preparó en un volumen adecuado de DMSO seco. Una vez disuelta, se añadió suficiente solución para proporcionar un número de equivalentes reactivos igual a tres veces el número de grupos éster activados inicial, N, menos uno. Por ejemplo, si había N=3 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añadieron (3x(3-1)x60 mM/370 mM) = 0,973 ml de solución de ligando. Si había N=4 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añadieron (3x(4-1)x60 mM/370 mM)=1,46 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de añadir la solución de ligando, la solución se agitó durante una hora más a temperatura ambiente para asegurar una reacción completa.

Etapa 3

Una vez la insulina había reaccionado lo suficiente con el grupo protector como se describe en la Etapa 1, y después de haber sucedido una reacción suficiente entre el armazón y el ligando en la Etapa 2, la solución de armazón-ligando de la Etapa 2 se añadió gota a gota a la solución de insulina en alícuotas. La reacción resultante se controló por HPLC. Se añadieron alícuotas hasta que la insulina protegida en B29 había reaccionado por completo para dar el conjugado de A1-armazón/ligando, insulina protegido en B29 deseado. Puesto que el ligando-armazón es habitualmente más hidrófilo que la insulina, la aparición del producto deseado se indicó por un desplazamiento distinto a tiempos de retención de HPLC más cortos en comparación con la insulina B29 (de la Etapa 1). Una vez se había alcanzado el nivel deseado de reacción, la solución de reacción se superdiluyó 10x en una solución salina tamponada con HEPES 20 mM de pH 5,0 que contenía NaCl 0,150 M, seguido de ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8,0. La solución acuosa se purificó en primer lugar por exclusión de tamaño usando una fase sólida adecuada para la separación deseada de los materiales conjugados y no conjugados. Después, la solución que pasó a través del volumen hueco de la columna se concentró usando una membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purificó adicionalmente para obtener el producto deseado usando HPLC preparativa de fase inversa en una columna Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm. El tampón A es agua desionizada que contiene un 0,1 % de TFA y el tampón B es acetonitrilo que contiene un 0,1 % de TFA. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 80 % de A/20 % de B usando un sistema

Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución en bruto en la columna en el transcurso de 2 minutos a un caudal de 15 ml/minuto, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 80 % de A/20 % de B a 75 % de A/25 % de B durante los siguientes 5 minutos, seguido de un gradiente lineal más lento de 75 % de A/25 % de B a 62 % de A/38 % de B durante los siguientes 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado varía dependiendo de la insulina, el armazón y el ligando utilizados. Una vez recogida, la solución se sometió a evaporación rotatoria para retirar acetonitrilo y se liofilizó para obtener conjugado de insulina mono-protegido.

Etapa 4

En todos los casos, el grupo protector se retiró después del conjugado de insulina. En los casos en los que se usó un grupo protector BOC en la Etapa 1, los grupos BOC se retiraron disolviendo el polvo liofilizado obtenido de acuerdo con Etapa 3 en TFA al 90 %/anisol al 10 % durante una hora a 4 °C, seguido de 10x superdisolución en tampón HEPES 25 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M. (Si un grupo protector distinto de BOC está presente en el fármaco que porta amina, entonces se emplean las condiciones de desprotección adecuadas en lugar de TFA/anisol. Pueden encontrarse un listado de agentes de protección y condiciones de desprotección en Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999, como se describe en la sección de Definiciones). El pH se ajustó a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual el material se pasó a través de una columna Biogel P2 para retirar anisol, BOC y otros subproductos de la desprotección de bajo PM, así como cualquier otra sal contaminante. Después, la solución de conjugado acuosa, purificada y desprotegida se concentró usando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) a aproximadamente 66 U de insulina/ml (basándose en mediciones de A280) y se almacenaron a 4 °C hasta que se necesitaron. La identidad del conjugado final se verifica por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA). El sitio de conjugación de A1 se confirmó secuenciando el extremo N (Western Analytical, St. Louis, MO), lo que reveló una presencia de > 95 % del extremo de cadena Phe-B1 y una presencia de < 5 % del extremo de cadena Gly^{A1}debidas a la sustitución de Gly^{A1} con el armazón que contiene ligando.

Alguien con una habilidad habitual en la técnica apreciará que pueden conjugarse otros fármacos funcionalizados con amina a armazones que contienen ligandos usando procedimientos análogos a los descritos en el Ejemplo 75. Alguien con una habilidad habitual en la técnica apreciará también que Ejemplo 75 es pertinente no solo para la insulina de tipo silvestre, sino también para mutantes de insulina como se describe en el presente documento.

Los siguientes conjugados de insulina se prepararon de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 75 usando BOC-NHS como reactivo protector.

Conjugado	Armazón	PM del Armazón	Ligando	PM de AE-azúcar	Pureza (HPLC)	PM (CL-EM)	Azúcar/ Insulina
I-13: TSAT-C6-AEM-2 (A1)	TSAT-C6	822	AEM	223	97 %	6730	2,0
I-12: TSAT-C6-AETM-2 (A1)	TSAT-C6	822	AETM	547	97 %	7378	2,0
I-15: TSPE-AEM-3 (A1)	TSPE	813	AEM	223	98 %	6829	3,0
I-14: TSPE-AETM-3 (A1)	TSPE	813	AETM	547	94 %	7802	3,0

Los siguientes conjugados de insulina pueden prepararse de acuerdo con el procedimiento en el Ejemplo 75. En algunas realizaciones, los conjugados de insulina se prepararon usando BOC-NHS como reactivo protector.

Conjugado	Armazón	PM del armazón	Ligando	PM de AE-azúcar	PM (CL-EM) (esperado)	Azúcar/Insulina (esperada)
DSS-AEM-1 (A1)	DSS	368	AEM	223	6169	1,0
DSS-AEBM-1 (A1)	DSS	368	AEBM	385	6331	1,0
DSS-AETM-1 (A1)	DSS	368	AETM	547	6493	1,0
TSAT-C6-AEBM-2 (A1)	TSAT-C6	822	AEBM	385	7054	2,0
TSPE-AEBM-3 (A1)	TSPE	813	AEBM	385	7314	3,0

Ejemplo 76 - Conjugación de insulina con ésteres activados multivalentes en disolvente orgánico (fármaco añadido en primer lugar) para dar conjugados de insulina sustituidos en A1,B29 - Procedimiento general

Etapa 1

Un armazón que contenía ésteres con el extremo N activado se disolvió a 147 mM en 2,5 ml de DMSO anhidro, seguido de la adición de 1,0 ml (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agitó rápidamente durante 10 minutos

a temperatura ambiente. En otro vial, se preparó una solución 272 mM de ligando en un volumen adecuado de DMSO seco. Una vez disuelta, se añadió suficiente solución para proporcionar un número de equivalentes reactivos igual a tres veces el número de grupos éster activados inicial, N, menos uno. Por ejemplo, si había N=3 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añadieron (3x(3-1)x60 mM/370 mM) = 0,973 ml de solución de ligando. Si había N=4 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añadieron (3x(4-1)x60 mM/370 mM)=1,46 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de añadir la solución de ligando, la solución se agitó durante una hora más a temperatura ambiente para asegurar una reacción completa.

Etapa 2

Se disolvió insulina en 1,5 ml de tampón carbonato sódico 100 mM (pH 11) a una concentración de 17,2 mM. El pH de la solución se mantuvo a ~11 mediante la adición de NaOH 0,1 M según se necesitó. Una vez se disolvió la insulina, se añadieron pequeñas alícuotas de la solución de armazón-ligando a la solución de insulina. El pH se controló a lo largo del proceso y se mantuvo entre 10,2-11,0 mediante la adición de hidróxido sódico 0,1 M. La reacción se controló por HPLC de fase inversa. Se añadieron alícuotas de la solución de armazón-ligando hasta que el cromatograma de HPLC mostró que habían reaccionado sustancialmente todas las insulinas no modificadas y que una porción sustancial de la mezcla de reacción se había convertido en una pequeña porción de conjugado de insulina/armazón/ligando monorreaccionado y que la mayoría del producto era conjugado de insulina/armazón/ligando dirreaccionado. Normalmente, la construcción de armazón-ligando será más hidrófila que la de la insulina no modificada, provocando que los productos de fármaco que portan amina mono y dirreaccionada se eluyan a tiempos de retención de HPLC más cortos que los de la insulina no modificada. De forma análoga, el pico de HPLC del producto deseado, el conjugado de insulina disustituido, aparecerá a un tiempo de retención que es más corto que el del conjugado de insulina monosustituido.

Etapa 3

Una vez la insulina había reaccionado lo suficiente con el ligando de armazón como se describe en la Etapa 2, la solución se superdiluyó después 10x en una solución salina tamponada con HEPES 20 mM de pH 5,0 que contenía NaCl 0,150 M, seguido de ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8,0. La solución acuosa se purificó en primer lugar por exclusión de tamaño usando una fase sólida adecuada para la separación deseada de los materiales conjugados y no conjugados. Después, la solución que pasó a través del volumen hueco de la columna se concentró usando una membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purificó adicionalmente para obtener el producto deseado usando HPLC preparativa de fase inversa en una columna Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm. El tampón A es agua desionizada que contiene un 0,1 % de TFA y el tampón B es acetonitrilo que contiene un 0,1 % de TFA. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 80 % de A/20 % de B usando un sistema Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución en bruto en la columna en el transcurso de 2 minutos a un caudal de 15 ml/minuto, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 80 % de A/20 % de B a 75 % de A/25 % de B durante los siguientes 5 minutos, seguido de un gradiente lineal más lento de 75 % de A/25 % de B a 62 % de A/38 % de B durante los siguientes 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado varía dependiendo de la insulina, el armazón y el ligando utilizados. Una vez recogida, la solución se sometió a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener un conjugado puro. La identidad del conjugado final se verificó por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA). Los sitios de conjugación de A1, B29 se confirmaron secuenciando el extremo N (Western Analytical, St. Louis, MO), lo que reveló una presencia de > 95 % del extremo de cadena Phe-B1 y una presencia de < 5 % del extremo de cadena Gly^{A1}debidas a la sustitución de Gly^{A1} con el armazón que contiene ligando.

Alguien con una habilidad habitual en la técnica apreciará que pueden conjugarse otros fármacos funcionalizados con amina a armazones que contienen ligandos usando procedimientos análogos a los descritos en el Ejemplo 76. Alguien con una habilidad habitual en la técnica apreciará también que Ejemplo 76 es pertinente no solo para la insulina de tipo silvestre, sino también para mutantes de insulina como se describe en el presente documento.

Los siguientes conjugados de insulina se prepararon de acuerdo con el procedimiento en el Ejemplo 76.

Conjugado	Armazón	PM del Armazón	Ligando	PM de AE-azúcar	Pureza (HPLC)	PM (CL-EM)	Azúcar/ Insulina
II-4: DSS-Di-sub-AEM-1 (A1, B29)	DSS	368	AEM	223	92 %	6531	2,0
II-3: DSS-Di-sub-AETM-1 (A1, B29)	DSS	368	AETM	547	94 %	7179	2,0
II-1: TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (A1, B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	97 %	7653	4,0
II-2: TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1, B29)	TSAT-C6	822	AETM	547	97 %	8949	4,0

Los siguientes conjugados de insulina pueden prepararse de acuerdo con el procedimiento en el Ejemplo 76.

Conjugado	Armazón	PM del Armazón	Ligando	PM de AE-azúcar	PM (CL-EM)	Azúcar/ Insulina
DSS-Di-sub-AEBM-1 (A1, B29)	DSS	368	AEBM	385	6855	2,0
TSAT-C6-Di-sub-AEBM-2(A1, B29)	TSAT-C6	822	AEBM	385	8301	4,0
TSPE-Di-sub-AEM-3 (A1, B29)	TSPE	813	AEM	223	7852	6,0
TSPE-Di-sub-AEBM-3 (A1, B29)	TSPE	813	AEBM	385	8824	6,0
TSPE-Di-sub-AETM-3 (A1, B29)	TSPE	813	AETM	547	9796	6,0

Ejemplo 77 - Conjugación de insulina con ésteres activados multivalentes en disolvente orgánico (fármaco añadido en primer lugar) para dar conjugados de insulina sustituidos en A1,B1

Etapa 1

Un armazón que contenía ésteres con el extremo N activado se disolvió a 147 mM en 2,5 ml de DMSO anhidro, seguido de la adición de 1,0 ml (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agitó rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. En otro vial, se preparó una solución 272 mM de ligando en un volumen adecuado de DMSO seco. Una vez disuelta, se añadió suficiente solución para proporcionar un número de equivalentes reactivos igual a tres veces el número de grupos éster activados inicial, N, menos uno. Por ejemplo, si había N=3 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añadieron (3x(3-1)x60 mM/370 mM) = 0,973 ml de solución de ligando. Si había N=4 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añadieron (3x(4-1)x60 mM/370 mM)=1,46 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de añadir la solución de ligando, la solución se agitó durante una hora más a temperatura ambiente para asegurar una reacción completa.

Etapa 2

Una insulina que contenía tres grupos amina reactivos, cada uno con una pKa distinguible (por ejemplo, en el caso de la insulina de tipo silvestre, pKa Gly^{A1} = 8,0, Phe^{B1} = 6,7, $Lys^{\varepsilon B29}$ = 11,2; véase Mei et al., Pharm. Res. 16:1680-1686, 1999) que se había monoprotegido previamente en el grupo amina de mayor pKa (por ejemplo, Lys^{B29}) con un éster activado de grupo protector monofuncional (por ejemplo, BOC-NHS) se disolvió en 1,5 ml de DMSO a una concentración de 17,2 mM. Una vez se disolvió la B29-BOC-insulina, se añadieron pequeñas alícuotas de la solución de armazón-ligando a la solución de B29-BOC-insulina. La reacción se controló por HPLC de fase inversa. Se añadieron alícuotas de solución de armazón-ligando hasta que el cromatograma de HPLC mostró que había reaccionado sustancialmente toda la B29-BOC-insulina y que una porción sustancial de la mezcla de reacción se había convertido en una pequeña porción de conjugado de B29-BOC-insulina/armazón/ligando monorreaccionado y la mayoría del producto era conjugado de B29-BOC-insulina/armazón/ligando dirreaccionado. Normalmente, la construcción de armazón-ligando será más hidrófila que la B29-BOC-insulina, provocando que los conjugados de B29-BOC-insulina monoconjugados y diconjugados se eluyan a tiempos de retención de HPLC más cortos que los de B29-BOC-insulina no modificada. De forma análoga, el pico de HPLC para el producto deseado, el conjugado de B29-BOC-insulina disustituido, aparecerá a un tiempo de retención que es más corto que el de conjugado de B29-BOC-insulina monosustituido.

Etapa 3

Una vez la B29-BOC-insulina había reaccionado lo suficiente con un armazón que contiene ligandos como se describe en la Etapa 2, la solución se superdiluyó después 10x en una solución salina tamponada con HEPES 20 mM de pH 5,0 que contenía NaCl 0,150 M, seguido de ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8,0. La solución acuosa se purificó en primer lugar por exclusión de tamaño usando una fase sólida adecuada para la separación deseada de los materiales conjugados y no conjugados. Después, la solución que pasó a través del volumen hueco de la columna se concentró usando una membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purificó adicionalmente para obtener el producto deseado usando HPLC preparativa de fase inversa en una columna Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm. El tampón A es agua desionizada que contiene un 0,1 % de TFA y el tampón B es acetonitrilo que contiene un 0,1 % de TFA. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 80 % de A/20 % de B usando un sistema Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución en bruto en la columna en el transcurso de 2 minutos a un caudal de 15 ml/minuto, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 80 % de A/20 % de B a 75 % de A/25 % de B durante los siguientes 5 minutos, seguido de un gradiente lineal más lento de 75 % de A/25 % de B a 62 % de A/38 % de B durante los siguientes 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado varía dependiendo de la insulina, el armazón y el ligando utilizados. Una vez recogida, la solución se sometió a

evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener un conjugado puro.

Etapa 4

En todos los casos, el grupo protector se retiró después del conjugado. En los casos en los que se usó un grupo protector BOC en la Etapa 1, los grupos BOC se retiraron disolviendo el polvo liofilizado obtenido de acuerdo con Etapa 3 en TFA al 90 %/anisol al 10 % durante una hora a 4 °C, seguido de 10x superdisolución en tampón HEPES 25 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M. (Si un grupo protector distinto de BOC está presente en el fármaco que porta amina, entonces se emplean las condiciones de desprotección adecuadas en lugar de TFA/anisol. Pueden encontrarse un listado de agentes de protección y condiciones de desprotección en Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999, como se describe en la sección de Definiciones). El pH se ajustó a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual el material se pasó a través de una columna Biogel P2 para retirar anisol, BOC y otros subproductos de la desprotección de bajo PM, así como cualquier otra sal contaminante. Después, la solución de conjugado acuosa, purificada y desprotegida se concentró usando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) a aproximadamente 66 U de insulina/ml (basándose en mediciones de A280) y se almacenaron a 4 °C hasta que se necesitaron. La identidad del conjugado final se verificó por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA). Los sitios de conjugación de A1, B1 se confirmaron secuenciando el extremo N (Western Analytical, St. Louis, MO), lo que reveló esencialmente ninguna presencia de extremo de cadena de Phe-B1 y ninguna presencia de extremo de cadena de Gly-A1 debidas a la sustitución en ambos extremos con el armazón que contiene ligando.

Alguien con una habilidad habitual en la técnica apreciará que pueden conjugarse otros fármacos funcionalizados con amina a armazones que contienen ligandos usando procedimientos análogos a los descritos en el Ejemplo 77. Alguien con una habilidad habitual en la técnica apreciará también que Ejemplo 77 es pertinente no solo para la insulina de tipo silvestre, sino también para mutantes de insulina como se describe en el presente documento.

El Conjugado **II-5** se preparó de acuerdo con el procedimiento en el Ejemplo 77 usando BOC-NHS como reactivo protector.

Conjugado	Armazón	PM del Armazón	Ligando	PM de AE-azúcar	Pureza (HPLC)	PM (CL-E)	Azúcar/ Insulina
II-5: TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1, B1)	TSAT-C6	822	AETM	547	97 %	8949	4,0

Los siguientes conjugados de insulina pueden prepararse de acuerdo con el procedimiento en el Ejemplo 77.

Identidad	Armazón	PM del Armazón	Ligando	PM de AE-azúcar	PM (CL-EM) (esperado)	Azúcar/Insulina (esperada)
DSS-Di-sub-AEM-1 (A1, B1)	DSS	368	AEM	223	6531	2,0
DSS-Di-sub-AEBM-1 (A1, B1)	DSS	368	AEBM	385	6855	2,0
DSS-Di-sub-AETM-1 (A1, B1)	DSS	368	AETM	547	7179	2,0
TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (A1, B1)	TSAT-C6	822	AEM	223	7653	4,0
TSAT-C6-Di-sub-AEBM-2 (A1, B1)	TSAT-C6	822	AEBM	385	8301	4,0
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1, B1)	TSAT-C6	822	AETM	547	8949	4,0
TSPE-Di-sub-AEM-3 (A1, B1)	TSPE	813	AEM	223	7852	6,0
TSPE-Di-sub-AEBM-3 (A1, B1)	TSPE	813	AEBM	385	8824	6,0
TSPE-Di-sub-AETM-3 (A1, B1)	TSPE	813	AETM	547	9796	6,0

Ejemplo 78 - Conjugación de insulina con ésteres activados multivalentes en disolvente orgánico (fármaco añadido en primer lugar) para dar conjugados de insulina sustituidos en B1,B29

Etapa 1

Un armazón que contenía ésteres con el extremo N activado se disolvió a 147 mM en 2,5 ml de DMSO anhidro. No

se añadió ninguna base, en contraste con los ejemplos previos. La solución se agitó rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. En otro vial, se preparó una solución 272 mM de ligando en un volumen adecuado de DMSO seco. Una vez disuelta, se añadió suficiente solución para proporcionar un número de equivalentes reactivos igual a tres veces el número de grupos éster activados inicial, N, menos uno. Por ejemplo, si había N=3 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añadieron (3x(3-1)x60 mM/370 mM) = 0,973 ml de solución de ligando. Si había N=4 grupos éster activados iniciales por armazón, entonces se añadieron (3x(4-1)x60 mM/370 mM)=1,46 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de añadir la solución de ligando, la solución se agitó durante una hora más a temperatura ambiente para asegurar una reacción completa.

Etapa 2

Una insulina que contenía tres grupos amina reactivos, cada uno con una pKa distinguible (por ejemplo, en el caso de la insulina de tipo silvestre, pKa Gly^{A1} = 8,0, Phe^{B1} = 6,7, Lys^{sB29} = 11,2; véase Mei et al., Pharm. Res. 16:1680-1686, 1999) que se había monoprotegido previamente en el grupo amina con una pKa intermedia (por ejemplo, Gly^{A1} para insulina de tipo silvestre) con un éster activado de grupo protector monofuncional (por ejemplo, BOC-NHS) se disolvió en 1,5 ml de DMSO a una concentración de 17,2 mM. (Puede prepararse A1-BOC-insulina usando el procedimiento en el Ejemplo 8, pero haciendo reaccionar con menos equivalentes del reactivo BOC para producir una distribución de productos de A1,B29-diBOC-insulina, A1-BOC-insulina y B29-BOC-insulina. Puede aislarse A1-BOC-insulina por HPLC FI y confirmarse secuenciando el extremo N). Una vez se disolvió la A1-BOC-insulina, se añadieron pequeñas alícuotas de la solución de armazón-ligando a la solución de A1-BOC-insulina. La reacción se controló por HPLC de fase inversa. Se añadieron alícuotas de solución de armazón-ligando hasta que el cromatograma de HPLC mostró que había reaccionado sustancialmente toda la A1-BOC-insulina no modificada y que una porción sustancial de la mezcla de reacción se había convertido en una pequeña porción de conjugado de A1-BOC-insulina/armazón/ligando monoconjugado y la mayoría del producto era conjugado de A1-BOC-insulina/armazón/ligando diconjugado. Normalmente, la construcción de armazón-ligando será más hidrófila que la A1-BOC-insulina, provocando que los conjugados de A1-BOC-insulina mono y disustituidos se eluyan a tiempos de retención de HPLC más cortos que los de la A1-BOC-insulina no modificada. De forma análoga, el pico de HPLC del producto deseado, el conjugado de A1-BOC-insulina disustituido, aparecerá a un tiempo de retención que es más corto que el de conjugado de A1-BOC-insulina monosustituido.

Etapa 3

Una vez la A1-BOC-insulina había reaccionado lo suficiente con el ligando de armazón como se describe en la Etapa 2, la solución se superdiluyó después 10x en una solución salina tamponada con HEPES 20 mM de pH 5,0 que contenía NaCl 0,150 M, seguido de ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8,0. La solución acuosa se purificó en primer lugar por exclusión de tamaño usando una fase sólida adecuada para la separación deseada de los materiales conjugados y no conjugados. Después, la solución que pasó a través del volumen hueco de la columna se concentró usando una membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purificó adicionalmente para obtener el producto deseado usando HPLC preparativa de fase inversa en una columna Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm. El tampón A es agua desionizada que contiene un 0,1 % de TFA y el tampón B es acetonitrilo que contiene un 0,1 % de TFA. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil de 80 % de A/20 % de B usando un sistema Waters DeltraPrep 600. Se inyectaron aproximadamente 5 ml de la solución en bruto en la columna en el transcurso de 2 minutos a un caudal de 15 ml/minuto, después de lo cual se empleó un gradiente lineal de 80 % de A/20 % de B a 75 % de A/25 % de B durante los siguientes 5 minutos, seguido de un gradiente lineal más lento de 75 % de A/25 % de B a 62 % de A/38 % de B durante los siguientes 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado varía dependiendo del fármaco, el armazón y el ligando utilizados. Una vez recogida, la solución se sometió a evaporación rotatoria para retirar el acetonitrilo y se liofilizó para obtener un conjugado puro.

Etapa 4

En todos los casos, el grupo protector se retiró después del conjugado. En los casos en los que se usó un grupo protector BOC en la Etapa 1, los grupos BOC se retiraron disolviendo el polvo liofilizado de acuerdo con Etapa 3 en TFA al 90 %/anisol al 10 % durante una hora a 4 °C. Si estaba presente un grupo protector distinto de BOC en el fármaco que porta amina, entonces se emplearon las condiciones de desprotección adecuadas en lugar de TFA/anisol. Pueden encontrarse un listado de agentes de protección y condiciones de desprotección en Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999, como se describe en la sección de Definiciones. La etapa de desprotección se siguió de 10x superdisolución en tampón HEPES 25 mM de pH 8,2 que contenía NaCl 0,150 M. El pH se ajustó a entre 7,0 y 8,0 usando una solución de NaOH, después de lo cual el material se pasó a través de una columna Biogel P2 para retirar anisol, BOC y otros subproductos de la desprotección de bajo PM, así como cualquier otra sal contaminante. Después, la solución de conjugado acuosa, purificada y desprotegida se concentró usando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) a aproximadamente 66 U de insulina/ml (basándose en mediciones de A280) y se almacenaron a 4 °C hasta que se necesitaron. La identidad del conjugado final se verificó por CL-EM (HT Laboratories, San Diego, CA). El sitio de conjugación de B1 se confirmó secuenciando el extremo N (Western Analytical, St. Louis, MO), lo que reveló una presencia de > 95 % del extremo de cadena Gly-A1 y una presencia de < 5 % del extremo de cadena Phe-B1

debidas a la sustitución de Phe-B1 con el armazón que contiene ligando.

Alguien con una habilidad habitual en la técnica apreciará que pueden conjugarse otros fármacos funcionalizados con amina a armazones que contienen ligandos usando procedimientos análogos a los descritos en el Ejemplo 78. Alguien con una habilidad habitual en la técnica apreciará también que Ejemplo 78 es pertinente no solo para la insulina de tipo silvestre, sino también para mutantes de insulina como se describe en el presente documento.

Los siguientes conjugados de insulina pueden prepararse de acuerdo con el procedimiento en el Ejemplo 78.

Conjugado	Armazón	PM del Armazón	Ligando	PM de AE-azúcar	PM (CL-EM) (esperado)	Azúcar/Insulina (esperada)
II-7: DSS-Di-sub-AETM-1 (B1, B29)	DSS	368	AETM	547	7179	2,0
II-6: TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (B1, B29)	TSAT-C6	822	AETM	547	8949	4,0
DSS-Di-sub-AEM-1 (B1, B29)	DSS	368	AEM	223	6531	2,0
DSS-Di-sub-AEBM-1 (B1, B29)	DSS	368	AEBM	385	6855	2,0
TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (B1, B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	7653	4,0
TSAT-C6-Di-sub-AEBM-2 (B1, B29)	TSAT-C6	822	AEBM	385	8301	4,0
TSPE-Di-sub-AEM-3 (B1, B29)	TSPE	813	AEM	223	7852	6,0
TSPE-Di-sub-AEBM-3 (B1, B29)	TSPE	813	AEBM	385	8824	6,0
TSPE-Di-sub-AETM-3 (B1, B29)	TSPE	813	AETM	547	9796	6,0

Ejemplo 79 - Comparación de la semivida *in vivo*/tasa de eliminación

Para determinar la tasa a la cual se aclaró el conjugado 1-6 del suero *in vivo* en presencia o ausencia de azúcares inhibidores tales como glucosa o a-MM, se realizaron los siguientes experimentos. En cada caso, el conjugado soluble (o la IHR como un control) se dosificó a 0,4 mg de conjugado/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley macho que se habían canulado por duplicado en la vena yugular (Taconic, JV/JV, 350-400 g, n=3).

Para determinar la tasa de eliminación en presencia de niveles elevados de glucosa, una hora antes del inicio del experimento se conectó una cánula de rata a la bomba de infusión de la jeringuilla que contenía una solución de glucosa estéril al 50 % p/v. La tasa de infusión de la bomba se ajustó por el experimentador para asegurar que los niveles de glucosa en sangre en el animal permanecían por encima de 300 mg/dl en todos los tiempos durante el experimento. Se midió la glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). En un experimento típico, se descubrió que la tasa de la bomba de infusión requerida para mantener a los animales por encima de 300 mg/dl era normalmente mayor de 85 ul/min. Se tomó una muestra de sangre a t = 0 min, tras lo cual se inyectó por vía intravenosa una solución estéril de conjugado o insulina del control mediante la segunda cánula de rata, seguido inmediatamente por una solución de búsqueda de heparina-solución salina para asegurar que se administró toda la dosis del conjugado en el animal. Tras un lavado adicional de la línea de la cánula con heparina-solución salina, La segunda cánula se usó para extraer muestras de sangre en t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, y 180 minutos después de la dosis.

Para determinar la tasa de eliminación en presencia de a-MM, una hora antes del inicio del experimento se conectó una cánula de rata a una bomba de infusión de la insulina que contenía una solución de a-MM estéril al 25 % p/v. El experimentador ajustó la tasa de infusión de la bomba, pero se ajustó normalmente a 85 ul/min. Se tomó una muestra de sangre a t = 0 min, tras lo cual se inyectó por vía intravenosa una solución estéril de conjugado o insulina del control mediante la segunda cánula de rata, seguido inmediatamente por una solución de búsqueda de heparina-solución salina para asegurar que se administró toda la dosis del conjugado en el animal. Tras un lavado adicional de la línea de la cánula con heparina-solución salina, La segunda cánula se usó para extraer muestras de sangre en t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, y 180 minutos después de la dosis.

A lo largo del experimento, Se midió la glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). La sangre de cada punto temporal se centrifugó a 4C para recoger el suero, y se midieron posteriormente las concentraciones de la insulina en suero o el conjugado en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Upsala, Suecia). Los datos de la concentración de la insulina en suero o del conjugado en suero frente al tiempo se ajustaron mejor con la suma de

dos exponenciales independientes en descomposición ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$) de acuerdo con el modelo de dos compartimentos, donde $t1/2(a) = (\ln 2)/k_a$ y $t1/2(b) = (\ln 2)/k_b$. En la Figura 46 se muestran los resultados. El panel izquierdo demuestra la tasa de eliminación significativamente mayor (> 5x) del conjugado 1-6 frente a la IHR en ausencia de a-MM o glucosa. El panel derecho muestra que la tasa de eliminación disminuye algo (~ 50 %) en presencia de glucosa (infusión de G400) y muy sustancialmente (~400 %) en presencia de a-MM (infusión de a-MM).

Ejemplo 80 - PK sensible a glucosa para una infusión i.v. de 1-6

En este ejemplo, el experimento de la tasa de eliminación i.v. descrito en el Ejemplo 79 se modificó a partir de un único bolo i.v. individual de 0,4 mg de conjugado/kg de peso corporal en una infusión i.v. continua. El objetivo del experimento era mantener una tasa de entrada constante de conjugado (o IHR como un control) durante seis horas con una inyección i.p. de glucosa administrada en el punto temporal de las cuatro horas para determinar el efecto resultante sobre el conjugado (o la IHR) o la concentración en suero. Se usaron en cada experimento ratas Sprague-Dawley macho a las que se había canulado por duplicado la vena yugular (Taconic, JV/JV, 350-400 g, n=3) de tal manera que se usó una línea de la vena yugular para el conjugado o una infusión de IHR y la otra para la extracción de sangre.

Para la IHR, se filtró en estéril una solución de 50 mU/ml mediante una membrana de filtración de 0,2 um y se infundió a 0,07 ml/min para proporcionar una tasa de entrada constante de 3,5 mU/min durante las seis horas del experimento. Se tomó una muestra de sangre a t = 0 min, tras la cual se inició la infusión i.v. constante. La segunda cánula se usó para extraer muestras de sangre en t = 30, 60, 120, 180, y 240 min. En t = 240 min., se administró una dosis de 4 g/kg de glucosa mediante inyección i.p. seguido por extracción de sangre en t = 255, 270, 300, 330 y 360 min.

Para el conjugado 1-6, se filtró en estéril una solución de 150 mU/ml mediante una membrana de filtración de 0,2 µm y se infundió a 0,10 ml/min para proporcionar una tasa de entrada constante de 15 mU/min durante las seis horas del experimento. Se tomó una muestra de sangre a t = 0 min, tras la cual se inició la infusión i.v. constante. La segunda cánula se usó para extraer muestras de sangre en t = 30, 60, 120, 180, y 240 min. En t = 240 min., se administró una dosis de 1,2 o 4 g/kg de glucosa mediante inyección i.p. seguido por extracción de sangre en t = 255, 270, 300, 330 y 360 min.

A lo largo de los experimentos, Se midió la glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). La sangre de cada punto temporal se centrifugó a 4C para recoger el suero, y se midieron posteriormente las concentraciones de la insulina en suero o el conjugado en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Upsala, Suecia).

Los primeros dos paneles de la Figura 47 comparan la glucosa en sangre y los perfiles de concentración de la insulina/conjugado en suero durante una infusión de 3,5 mU/min de IHR y una infusión de 15 mU/min de **I-6** antes y después de una inyección de glucosa i.p. de 4 g/kg. La infusión de IHR produce una hipoglucemia significativa antes de la inyección de glucosa en comparación con la infusión de **I-6.** Tras la inyección i.p. de glucosa, la concentración de insulina en suero medida de **I-6** aumenta inmediatamente en aproximadamente un 300 % a medida que aumenta la concentración de glucosa en sangre seguido por una rápida vuelta a los niveles iniciales a medida que disminuye la concentración de glucosa. Por otro lado, no se midió cambio significativo en la concentración de insulina en suero medida para la IHR después de una inyección i.p. de glucosa en las mismas condiciones experimentales. Los siguientes tres paneles de la Figura 47 muestran que la extensión a la cual aumenta la concentración de insulina medida durante la inyección i.p. de glucosa está directamente relacionada con la dosis de glucosa administrada y los niveles de glucosa en sangre resultantes. Por ejemplo, solo se observó un pico del 50 % para cambiar el valor inicial en la concentración de insulina en suero para la inyección de 1 g/kg de glucosa frente a un pico del 300 % para cambiar el valor inicial observado para la dosis de 4 g/kg.

Ejemplo 81 - Tasa de eliminación *in vivo* para los conjugados de insulina con y sin azúcar

Para determinar la tasa a la cual se aclaró el conjugado 1-9 del suero *in vivo* en presencia o ausencia de azúcares inhibidores tales como glucosa o a-MM, se realizaron los siguientes experimentos. En cada caso, el conjugado soluble (o la IHR como un control) se dosificó a 0,4 mg de conjugado/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley macho que se habían canulado por duplicado en la vena yugular (Taconic, JV/JV, 350-400 g, n=3).

Para determinar la tasa de eliminación en presencia de niveles elevados de glucosa, una hora antes del inicio del experimento se conectó una cánula de rata a la bomba de infusión de la jeringuilla que contenía una solución de glucosa estéril al 50 % p/v. La tasa de infusión de la bomba se ajustó por el experimentador para asegurar que los niveles de glucosa en sangre en el animal permanecían por encima de 300 mg/dl en todos los tiempos durante el experimento. Se midió la glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). En un experimento típico, se descubrió que la tasa de la bomba de infusión requerida para mantener a los animales por encima de 300 mg/dl era normalmente mayor de 85 µl/min. Se tomó una muestra de sangre a t = 0 min, tras lo cual se inyectó por vía intravenosa una solución estéril de conjugado o insulina del control mediante la segunda cánula de rata, seguido inmediatamente por una solución de búsqueda de heparina-

solución salina para asegurar que se administró toda la dosis de conjugado en el animal. Tras un lavado adicional de la línea de la cánula con heparina-solución salina, La segunda cánula se usó para extraer muestras de sangre en t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, y 180 minutos después de la dosis.

Para determinar la tasa de eliminación en presencia de a-MM, una hora antes del inicio del experimento se conectó una cánula de rata a una bomba de infusión de la insulina que contenía una solución de a-MM estéril al 25 % p/v. El experimentador ajustó la tasa de infusión de la bomba, pero se ajustó normalmente a 85 ul/min. Se tomó una muestra de sangre a t = 0 min, tras lo cual se inyectó por vía intravenosa una solución estéril de conjugado o insulina del control mediante la segunda cánula de rata, seguido inmediatamente por una solución de búsqueda de heparina-solución salina para asegurar que se administró toda la dosis del conjugado en el animal. Tras un lavado adicional de la línea de la cánula con heparina-solución salina, La segunda cánula se usó para extraer muestras de sangre en t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, y 180 minutos después de la dosis.

A lo largo del experimento, Se midió la glucosa en sangre utilizando tiras reactivas comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). La sangre de cada punto temporal se centrifugó a 4C para recoger el suero, y se midieron posteriormente las concentraciones de la insulina en suero o el conjugado en suero con un kit ELISA comercialmente disponible (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Upsala, Suecia). Los datos de la concentración de la insulina en suero o del conjugado en suero frente al tiempo se ajustaron mejor con la suma de dos exponenciales independientes en descomposición ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$) de acuerdo con el modelo de dos compartimentos, donde $t1/2(a) = (\ln 2)/k_a$ y $t1/2(b) = (\ln 2)/k_b$.

El primer panel de la Figura 48 muestra que la tasa de eliminación de la insulina sin modificar no se ve afectada en presencia de azúcares (glucosa G400 o a-MM). A título de comparación, el último panel de la Figura 48 que muestra el conjugado **I-6** con la infusión de azúcar se volvió a representar gráficamente a partir de los resultados del Ejemplo 79. El panel medio de la Figura 48 que muestra el conjugado **I-9** con la infusión de azúcar muestra una disminución mucho más pronunciada en la tasa de eliminación (~ 350 % frente a ~ 50 %) en presencia de glucosa (infusión de G400) frente al conjugado 1-6. El conjugado I**-9** demuestra también una disminución más significativa en la tasa de eliminación (~ 700 % frente a ~ 400 %) en presencia de a-MM (infusión de a-MM) frente al conjugado **I-6**.

Ejemplo 82 - Verificación del mecanismo y comportamiento sensible a glucosa en cerdos en miniatura

Para determinar si los resultados que se han descrito anteriormente del conjugado de insulina sensible a glucosa podrían extenderse a otras especies más allá de ratas, los inventores se centraron es explorar la tasa de eliminación *in vivo* dependiente de azúcar de cerdos en miniatura macho, no diabéticos, representativos de seres humanos (raza Yucatan), denominados también "minicerdos" en el presente documento. Se ensayaron un subconjunto de conjugados de insulina resumidos en la Figura 49 para determinar inicialmente los efectos de afinidad por los azúcares y la multivalencia de las tasas de eliminación dependientes de azúcares. Los conjugados se muestran en la Figura 45 como **I-7**, **I-6, I-11,** y **II-2.** Todos los conjugados usados en este estudio se sintetizaron de acuerdo con los métodos generales descritos en el Ejemplo 20. Para producir el conjugado **I-2** de insulina AETM-2 disustituido en A1, B29**,** se usó aproximadamente diez veces la cantidad de armazón de éster activo multivalente y ligando de AETM por molécula de insulina en comparación con la síntesis del conjugado de insulina (**I-6**) AETM-2 monosustituido en B29.

En cada experimento, el conjugado de insulina se dosificó por vía i.v. a 0,1 U/kg en minicerdos no diabéticos con puerto de acceso vascular duplicado, y se extrajo la sangre a intervalos de tiempo frecuentes después de la inyección. Para determinar la tasa de eliminación en suero en presencia de glucosa, se infundió una solución de glucosa estéril al 50 % p/v i.v. en un puerto usando una bomba de jeringa una hora antes de administrar el conjugado de insulina, y se ajustó la tasa a lo largo de todo el experimento para asegurar que los niveles de glucosa en sangre en el animal permanecieron en o próximos a 400 mg/dl (normalmente 80-150 ml/h). Para determinar la tasa de eliminación en suero de a-MM, se sustituyó la solución de glucosa son una solución estéril al 25 % p/v de a-MM y la tasa de infusión de la bomba se mantuvo constante a lo largo del experimento a 80 ml/h. En cada caso, Los datos de la concentración del conjugado de insulina resultante frente al tiempo se ajustaron con la suma de dos exponenciales independientes en descomposición ($C(t) = \alpha \exp(-k_\alpha t) + \beta \exp(-kpt)$) de acuerdo con el modelo de dos compartimentos.

A 400 mg/dl los altos niveles de insulina de porcino inducida por glucosa endógena reaccionaron en cruzado con el inmunoensayo del conjugado de insulina de los inventores. Como tales, los resultados de la PK de los experimentos de infusión de la glucosa requirieron la sustracción de los valores obtenidos a partir de un ensayo solo de insulina de porcino que conducía a un conjunto de datos particularmente ruidosos. Debido a que a-MM no induce la secreción de insulina endógena de porcino, los datos de los estudios de infusión de a-MM se usaron como el indicador primario de los inventores de los cambios sensibles a azúcares en la semivida del conjugado de insulina. De manera interesante, en los cerdos, el conjugado **(I-6)** de insulina AETM-2 mostró solo un modesto 1,7x de aumento en $t_{1/2}$ en presencia de a-MM en comparación con un aumento de 4,0x en las ratas (Figura 56). Sin embargo, en los cerdos, el conjugado de insulina (**II-2**) AETM-2 disustituido en A1, B29 demostró un aumento en $t_{1/2}$ de casi 10 veces en presencia de a-MM (Figuras 50 y 51). Los resultados en forma de tablas de otros conjugados se muestran en la Figura 57.

El área sobre la curva de disminución de la glucosa para la dosis i.v. del conjugado (**II-2**) de insulina AETM-2 disustituido en presencia de a-MM fue aproximadamente 2,6x mayor que en ausencia de azúcar (Figura 52). La Figura 59 compara las diferencias en la bioactividad entra la IHR, **I-6**, y **II-2** (conjugado de insulina AETM-2 disustituido), y **II-3.** Los tres conjugados de insulina contienen los ligandos de azúcar de AETM de alta afinidad. En este conjunto seleccionado de conjugados de insulina, no existe correlación entre la semivida dependiente de azúcar y la bioactividad.

Se inyectó el conjugado **II-2** sub-Q como una solución soluble a dosis de 0,25, 0,50, y 1,00 U/kg en minicerdos no diabéticos hiperglucémicos, normoglicémicos y diabéticos por aloxano, para determinar su capacidad para disminuir la glucosa en animales diabéticos sin producir hipoglucemia en animales no diabéticos. El conjugado de insulina demostró una reducción dependiente de la dosis significativa a niveles de glucosa en sangre en los animales diabéticos sin hipoglucemia absoluta o signos de disminución de la glucosa en animales no diabéticos (Figura 53). En comparación, la IHR inyectada a 0,063 y 0,125 U/kg produjo una disminución significativa de la glucosa en los animales diabéticos con hipoglucemia notable y disminución de la glucosa significativa e hipoglucemia en los animales no diabéticos (Figura 54). Basándose en estos resultados preliminares, una única inyección de aproximadamente 0,5 U/kg del conjugado **II-2** de insulina soluble proporcionó un control de glucosa sin hipoglucemia durante 6-8 horas en minicerdos diabéticos. Se determinaron las tasas de eliminación en suero de II-2 inyectado sub-Q en minicerdos diabéticos y normales (Figura 58). Se observaron perfiles de PK similares entre animales diabéticos y normales para todas las dosis.

Tomados en conjunto, estos resultados iniciales demostraron que en los minicerdos existe un mecanismo endógeno basado el lectinas que se puede explotar mediante la selección de la afinidad y la multivalencia del azúcar. Parece que los conjugados de insulina con afinidades y multivalencias mayores proporcionan un control glucémico mejorado exento de hipoglucemia en minicerdos en comparación con ratas.

Ejemplo 83 - Estudios de optimización en cerdos en miniatura

Basándose en la gran diferencia en el comportamiento de **II-2** frente a otros conjugados en la Figura 49, es deseable separar y cuantificar el efecto del sitio de conjugación de la insulina (A1 frente a B29) de los efectos de la afinidad y la valencia del azúcar. Usando técnicas de conjugación similares como se usaron para producir los conjugados de insulina en la Figura 49, los inventores han sintetizado por tanto la matriz de conjugados de insulina relacionada en la Figura 55 (se muestra en la Figura 45 como **I-12**, **I-13**, **I-14**, **I-15**, **II-1**, **II-3**, y **II-4**), así como los compuestos del control que se muestran en la Figura 60. Todos los conjugados disustituidos usados en este estudio se sintetizaron de acuerdo con los métodos generales descritos en el Ejemplo 20. Para producir los conjugados de insulina disustituidos en A1, B29, se usó aproximadamente diez veces la cantidad de armazón de éster activo multivalente y ligando de afinidad de azúcar por molécula de insulina en comparación con la síntesis de conjugados de insulina monosustituidos en B29. Se prepararon también materiales sustituidos solo en A1 de acuerdo con los métodos generales descritos en el Ejemplo 20. Sin embargo, se usó en este caso, la insulina protegida con BOC mono en B29 aislada de una síntesis de protección de BOC descrita en el Ejemplo 8 usando la mitad del número de equivalentes de dicarbonato de di-*terc*-butilo. Una vez purificados, los grupos BOC se retiraron del conjugado usando el método del TFA/anisol descrito en el Ejemplo 12.

En general, las semividas sensibles a azúcar y los efectos de disminución de la glucosa de cada uno de estos conjugados de insulina se determinaron del siguiente modo. Como se ha descrito anteriormente, cada conjugado de insulina se dosificó i.v. a 0,1 U/kg en minicerdos no diabéticos con puertos de acceso vascular duplicados y se extrajo la sangre a intervalos de tiempo frecuentes después de la inyección. Para determinar la tasa de eliminación en suero de a-MM, se infundió por vía i.v. una solución de a-MM estéril al 25 % p/v en un puerto usando una bomba de jeringa (80 ml/h) una hora antes de administrar el conjugado de insulina, y la tasa se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento. En cada caso, Los datos de la concentración del conjugado de insulina resultante frente al tiempo se ajustaron con la suma de dos exponenciales independientes en descomposición ($C(t) = \alpha \exp(-k_{\alpha}t) + \beta \exp(-kpt)$) de acuerdo con el modelo de dos compartimentos. Se usó la comparación de las tasas de eliminación en la fase β con y sin la infusión de a-MM para identificar los conjugados adecuados.

La Figura 61 muestra una comparación de los niveles de glucosa cuando se inyectaron por vía i.v. varios conjugados de insulina en los minicerdos. El conjugado **I-12** (sustitución en A1 con AETM-2) fue ligeramente más eficaz en disminuir la glucosa que el conjugado **I-6** (sustitución en B29 con AETM-2). La sustitución del conjugado **I-6** en la posición A1 con óxido de polietileno para dar el conjugado C3 redujo la bioactividad global pero no aumenta la bioactividad inducida por a-MM. La sustitución del conjugado **I-6** en la posición A1 con otro bastidor TSAT-C6-AETM-2 para dar el conjugado **II-2** redujo la bioactividad global pero aumentó la bioactividad inducida por a-MM.

La Figura 62 muestra una comparación de los niveles de glucosa cuando se inyectaron por vía i.v. varios conjugados de insulina disustituida en A1, B29 en los minicerdos. la disustitución en A1, B29 de la insulina con grupos acetilo (conjugado C7) o PEO (conjugado C4) no reduce sustancialmente la bioactividad global. Además, los conjugados C7 y C4 no expresan de forma distinguible los efectos de bioactividad inducida por a-MM. El conjugado **II-3** tenía una bioactividad sustancialmente reducida frente a los conjugados C7 y C4, pero su bioactividad se restauró virtualmente

en presencia de a-MM.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Lancaster, Thomas M.
Zion, Todd C.

<120> Conjugados de insulina

<130> 2005700-0040

<160> 2

<170> PatentIn versión 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
```

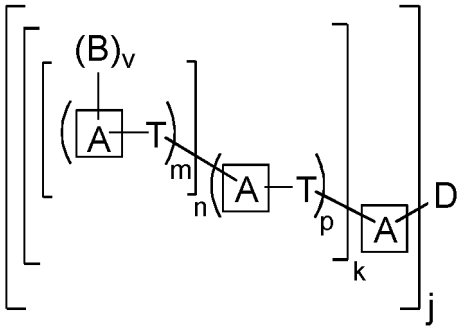
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende una molécula de insulina conjugada a dos o más ligandos de sacáridos, en el que los dos o más ligandos son cada uno aminoetiltrimanosa (AETM) y en el que los dos o más ligandos de sacáridos separados están unidos a la molécula de insulina mediante un armazón de conjugación.

2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que la molécula de insulina está conjugada a través del residuo aminoacídico de A1, a través del residuo aminoacídico de B1 o a través del grupo epsilon-amino de LysB29 o a través del grupo epsilon-amino de LysB3.

3. El conjugado de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la molécula de insulina está truncada.

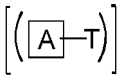
4. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado tiene la fórmula general (II):



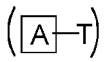
II

en la que:

cada vez que aparece



representa una rama potencial dentro del conjugado; cada vez que aparece

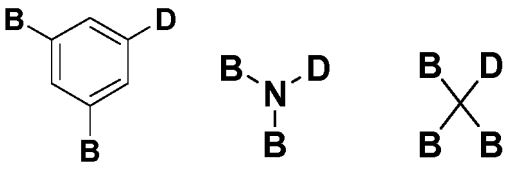


representa una repetición potencial dentro de una rama del conjugado;

cada vez que aparece es independientemente un enlace covalente, un átomo de carbono, un heteroátomo o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico;
cada vez que aparece T es independientemente un enlace covalente o una cadena de hidrocarburo C_{1-30} bivalente, lineal o ramificado, saturado o insaturado, opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno de T están opcional e independientemente reemplazadas por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, un grupo heterocíclico, un grupo arilo o un grupo heteroarilo;
cada vez que aparece R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado o un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo o resto heteroalifático;
-B es -T-LB-X;
cada vez que aparece X es independientemente un ligando que comprende aminoetiltrimanosa (AETM); cada vez que aparece LB es independientemente un enlace covalente o un grupo obtenido a partir de la conjugación covalente de un T con un X;
-D es -T-LD-W;
cada vez que aparece W es independientemente una molécula de insulina;
cada vez que aparece LD es independientemente un enlace covalente o un grupo obtenido a partir de la conjugación covalente de un T con un W;
k es un número entero de 1 a 12, ambos incluidos;
j es un número entero de 1 a 4, ambos incluidos;
cada vez que aparece p es independientemente un número entero de 1 a 5, ambos incluidos; y
cada vez que aparece n es independientemente un número entero de 0 a 5, ambos incluidos; y
cada vez que aparece m es independientemente un número entero de 1 a 5, ambos incluidos; y

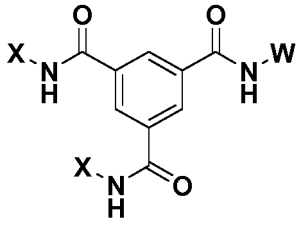
cada vez que aparece v es independientemente un número entero de 0 a 5, ambos incluidos, con la condición de que
dentro de cada rama de k, al menos una aparición de n es ≥ 1 y al menos una aparición de v es ≥ 1.

5. El conjugado de la reivindicación 4, en donde el conjugado es de la fórmula:

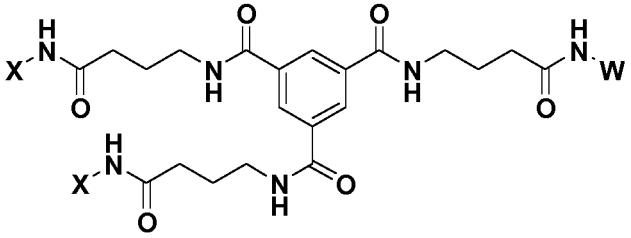


VIa ; VIb ; o VIc .

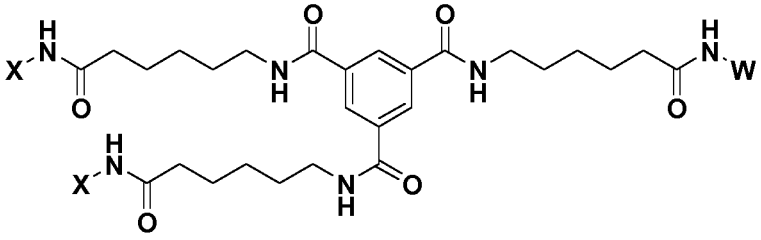
6. El conjugado de la reivindicación 5, en donde el conjugado es:



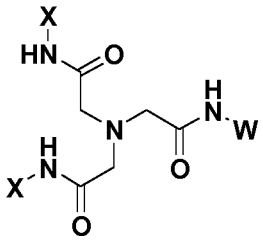
VIa-1,



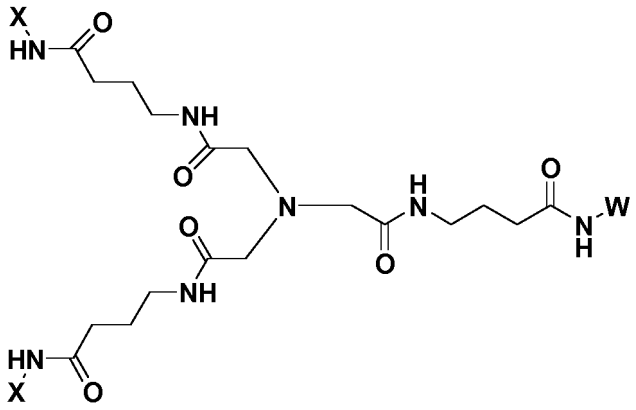
VIa-2,



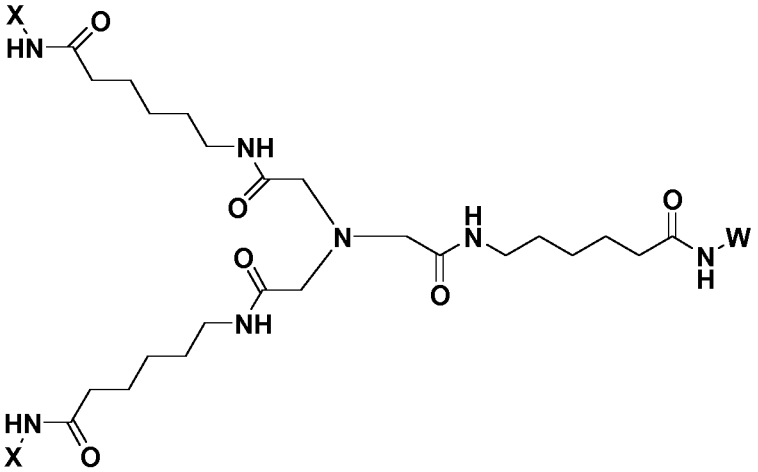
VIa-3,



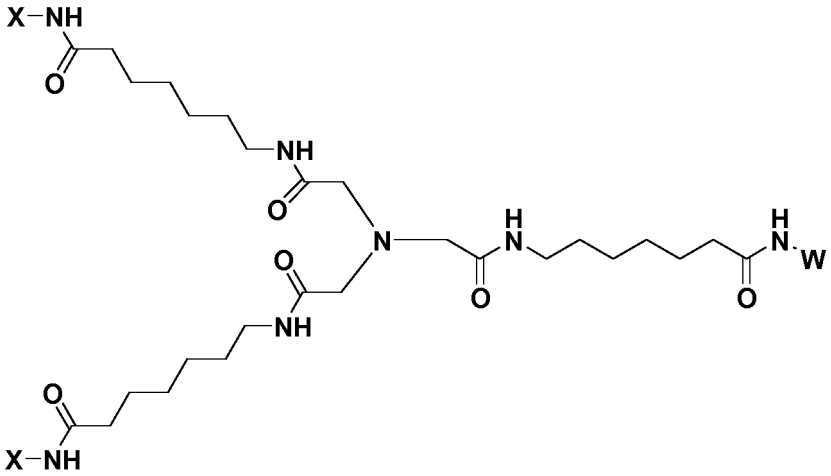
VIb-1,



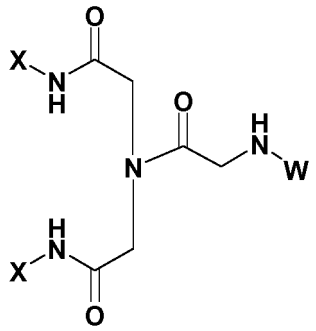
VIb-2,



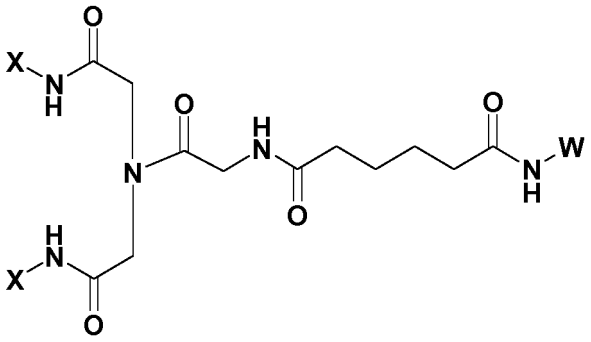
VIb-3,



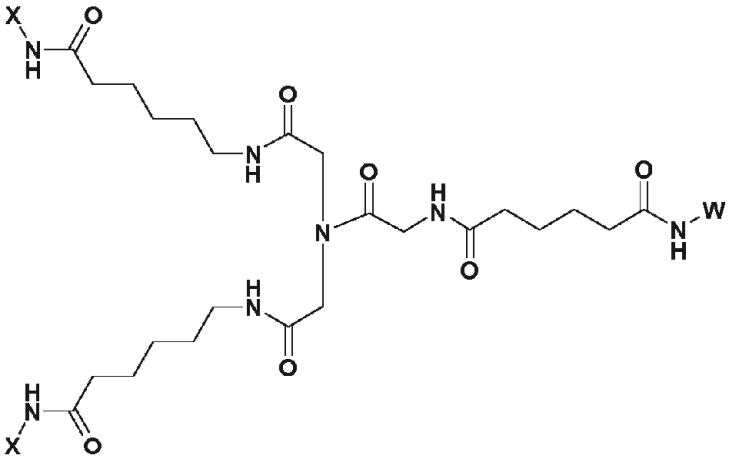
VIb-4,



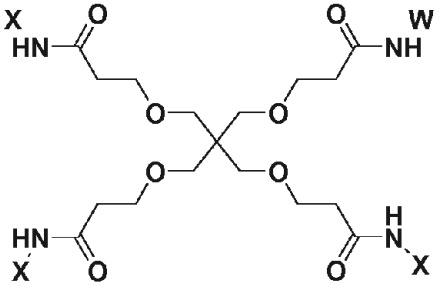
VIb-5,



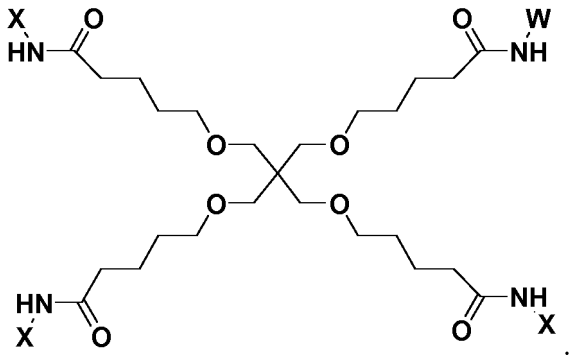
VIb-6,



VIb-7,

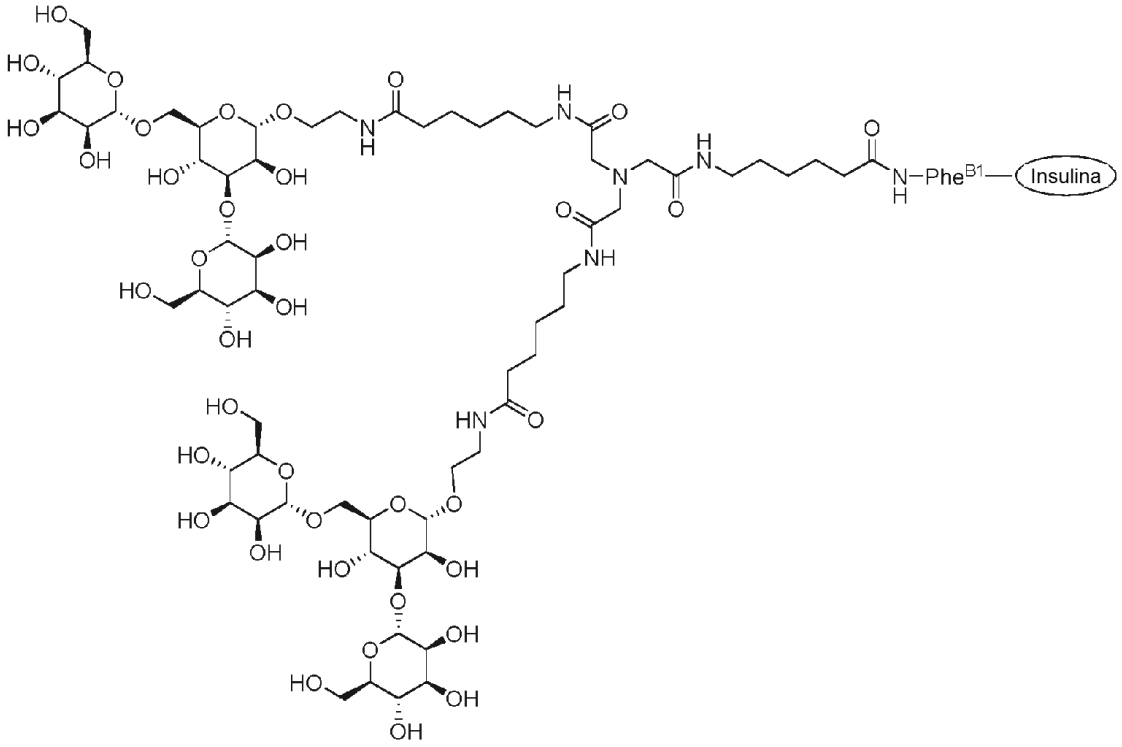


VIc-1 o

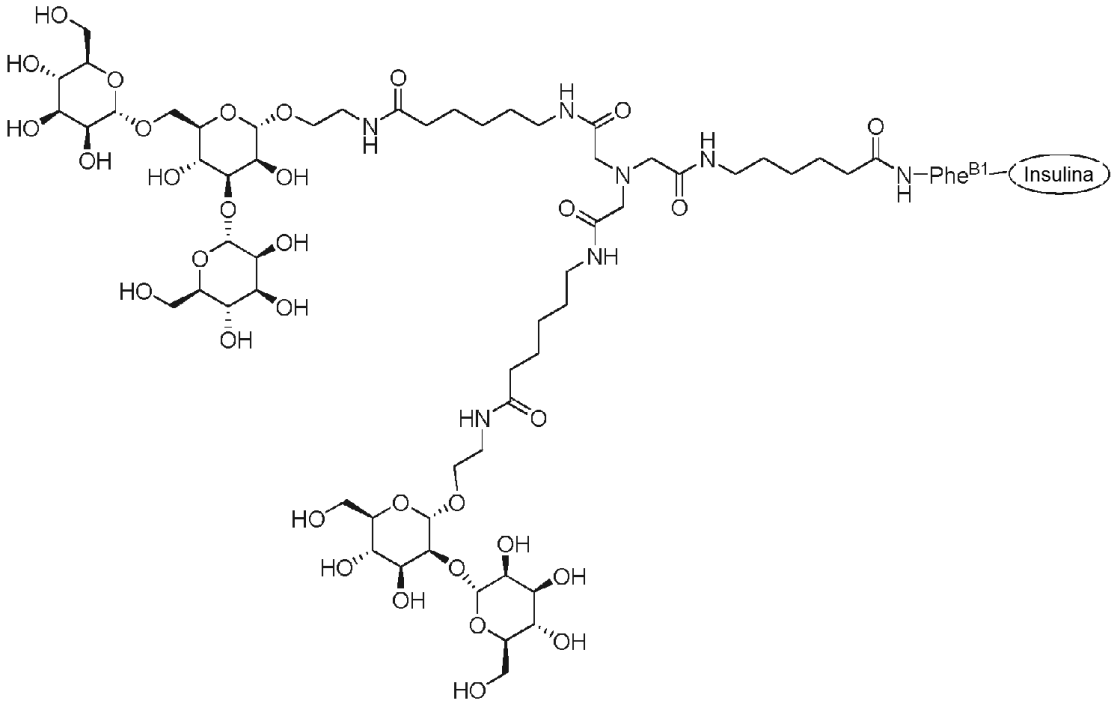


VIc-2.

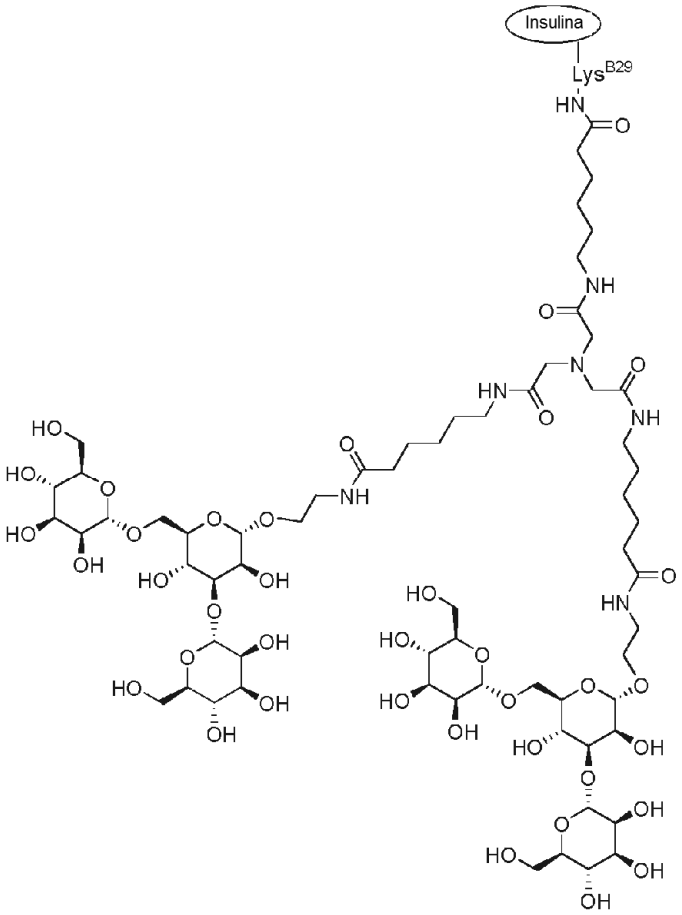
7. Un conjugado de la reivindicación 1 seleccionado entre:



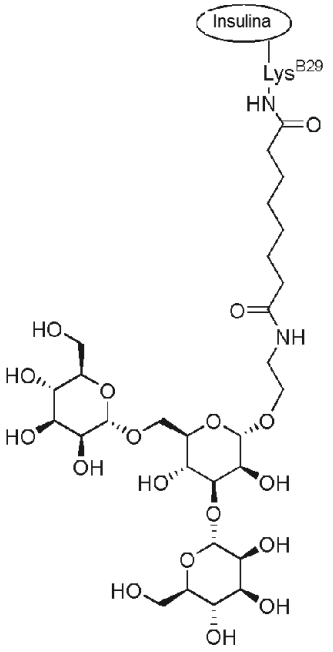
I-2,



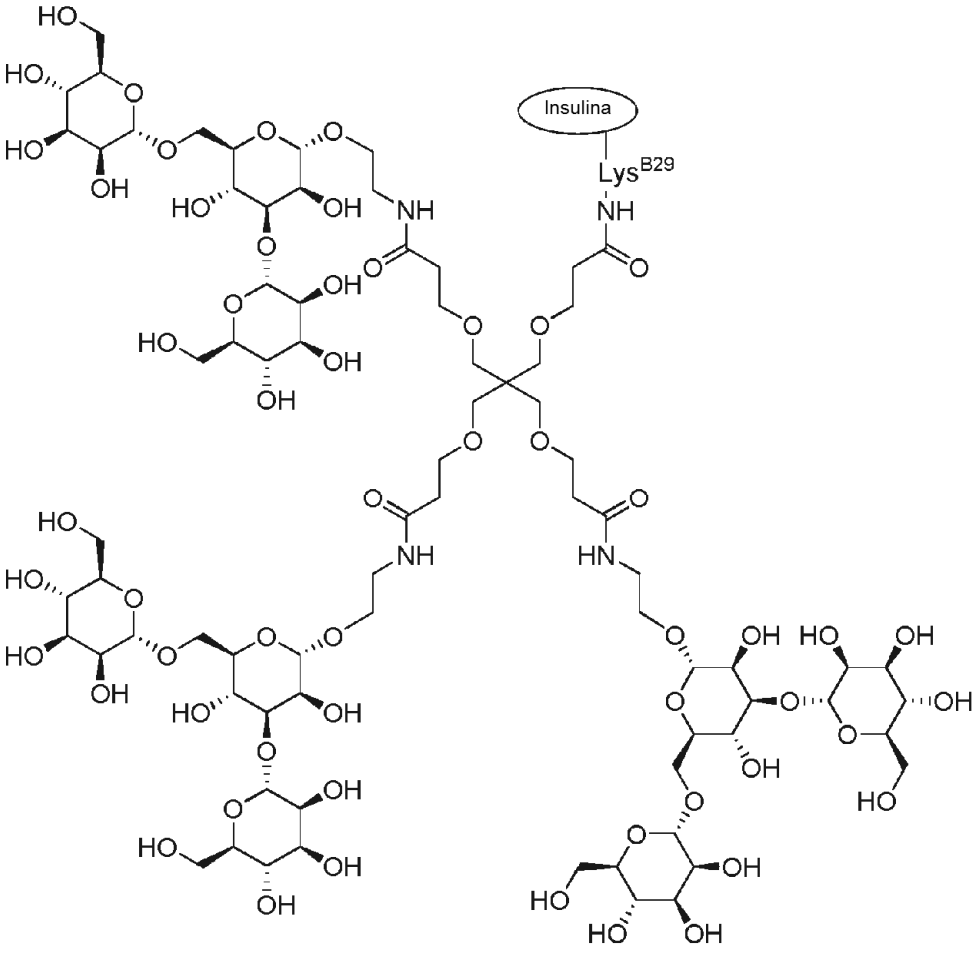
I-4,



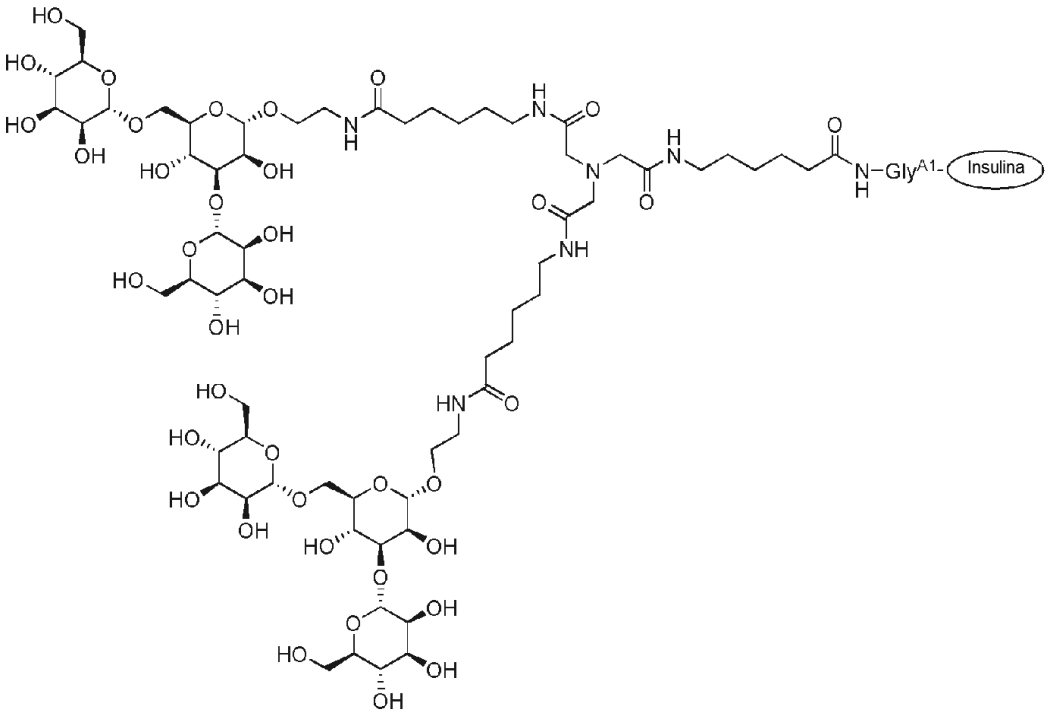
I-6,


Insulina
Lys B29
HN
O
O
NH
HO
HO
O
HO
OH
O
O
HO
OH
O
O
OH
HO
OH
OH

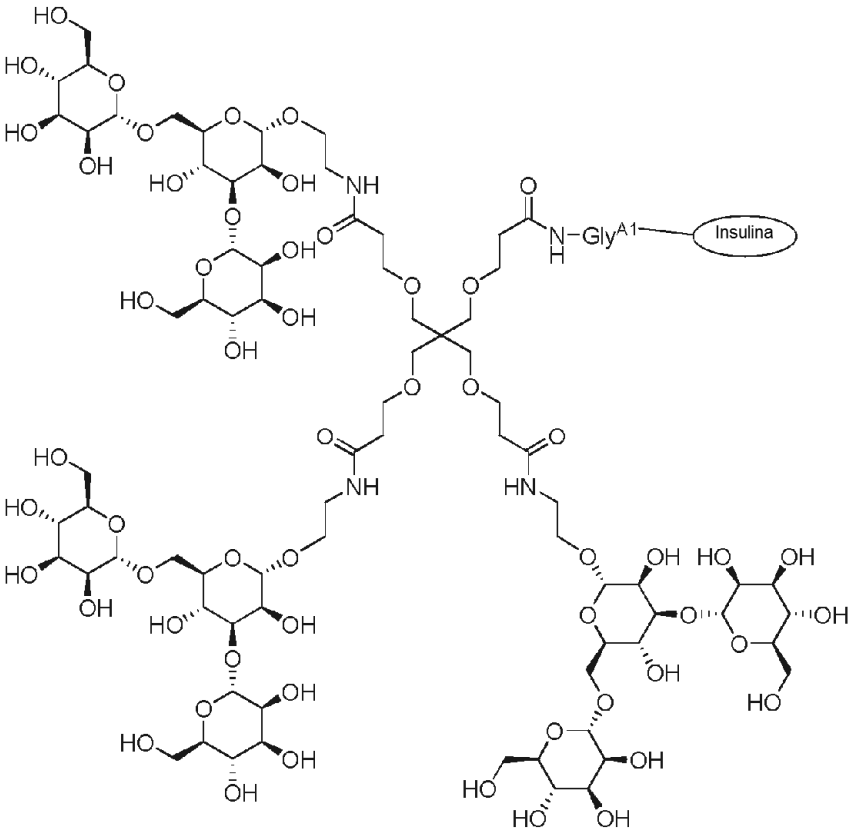
I-10,


HO
HO
O
HO
OH
O
O
O
HO
OH
NH
Insulina
Lys B29
NH
O
O
O
OH
O
HO
OH
OH
O
O
O
O
O
O
NH
HN
HO
HO
O
HO
OH
O
O
O
HO
OH
O
O
OH
HO
OH
OH
O
O
OH
HO
OH
O
O
OH
HO
OH
OH
O
O
OH
HO
OH
HO
OH
O
O
OH
HO
HO
OH

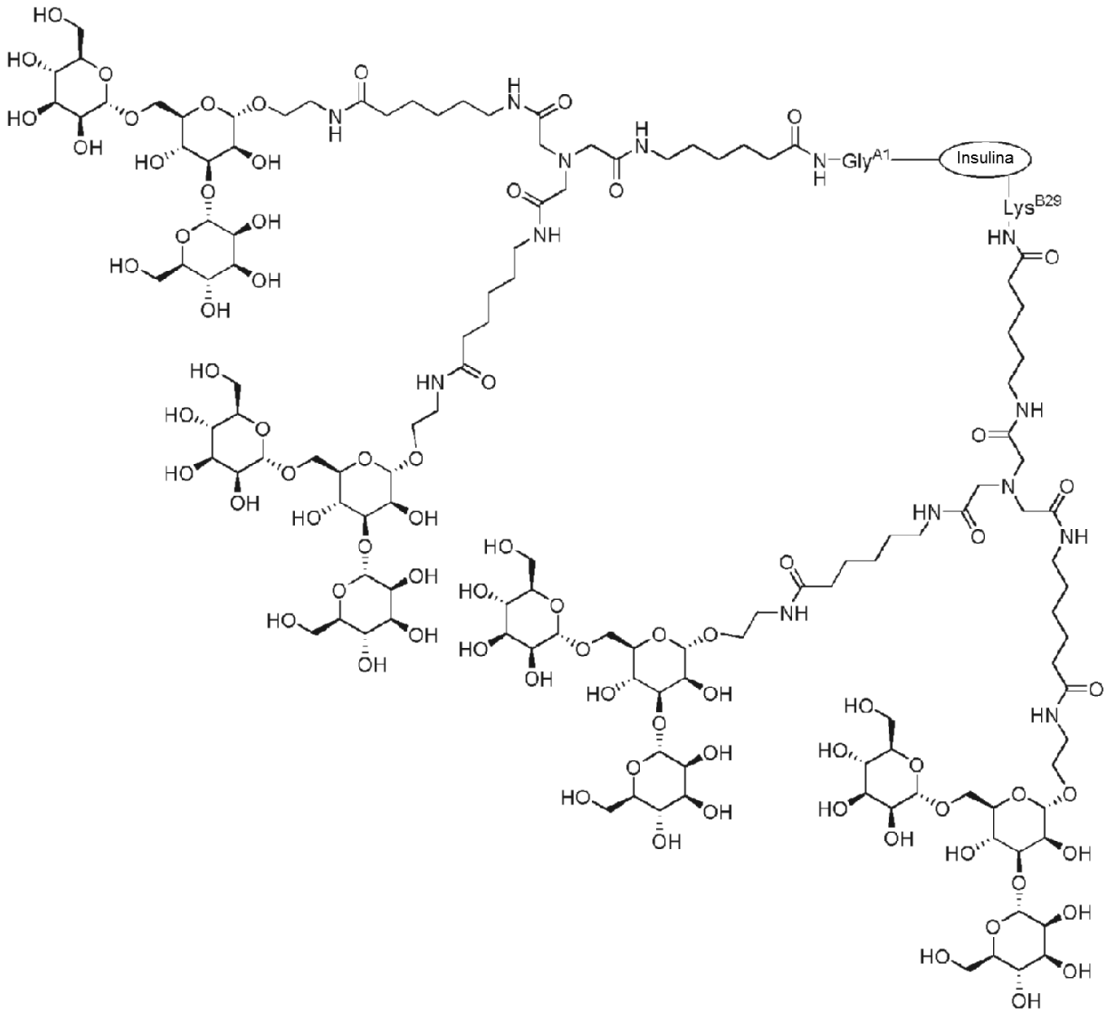
I-11,



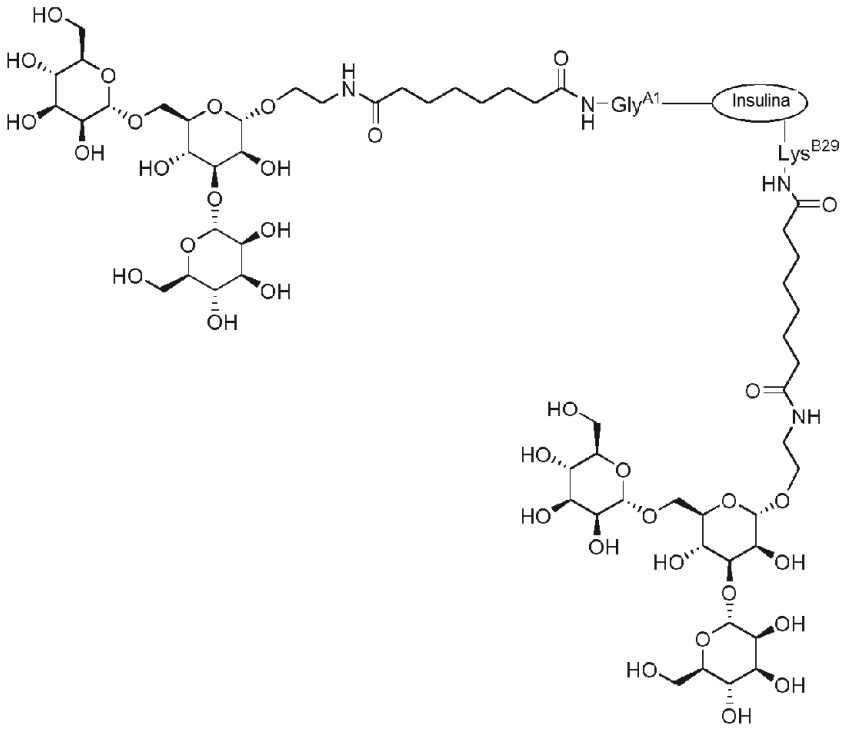
I-12,



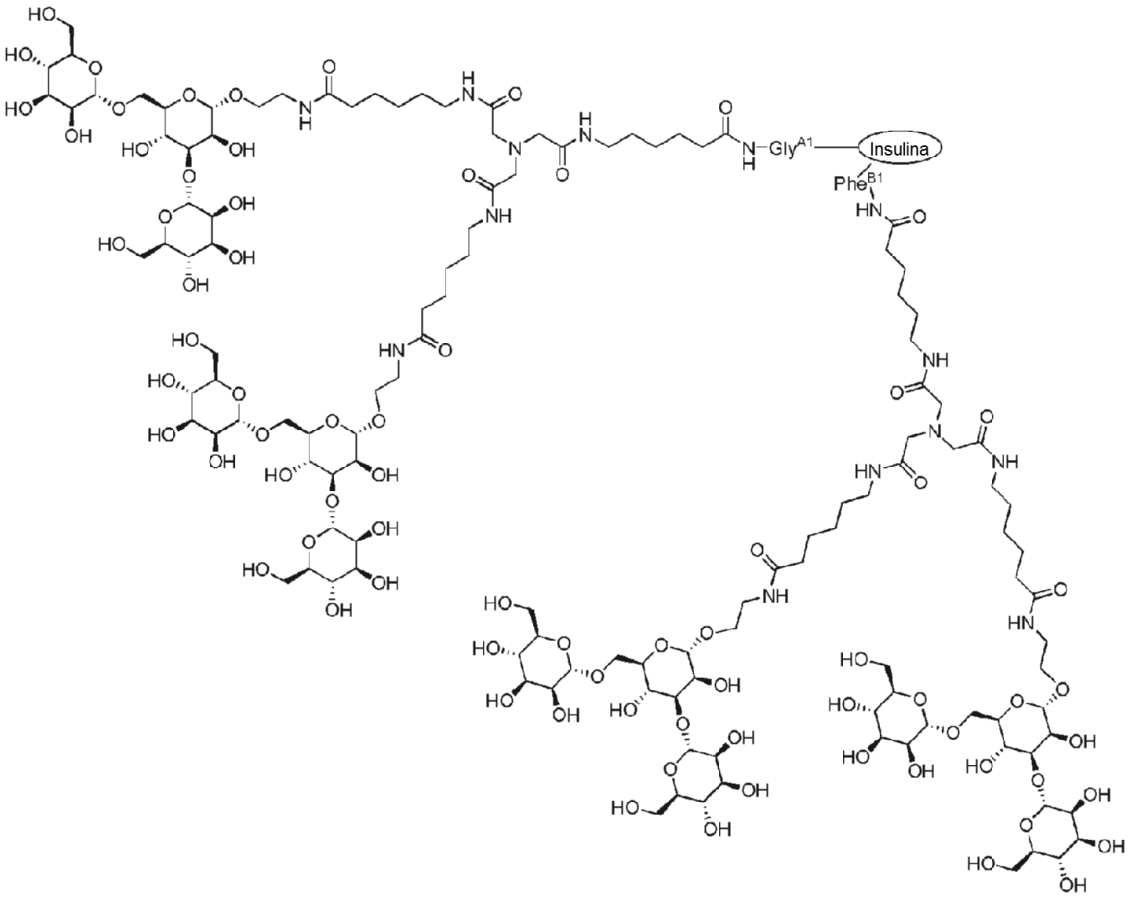
I-14,



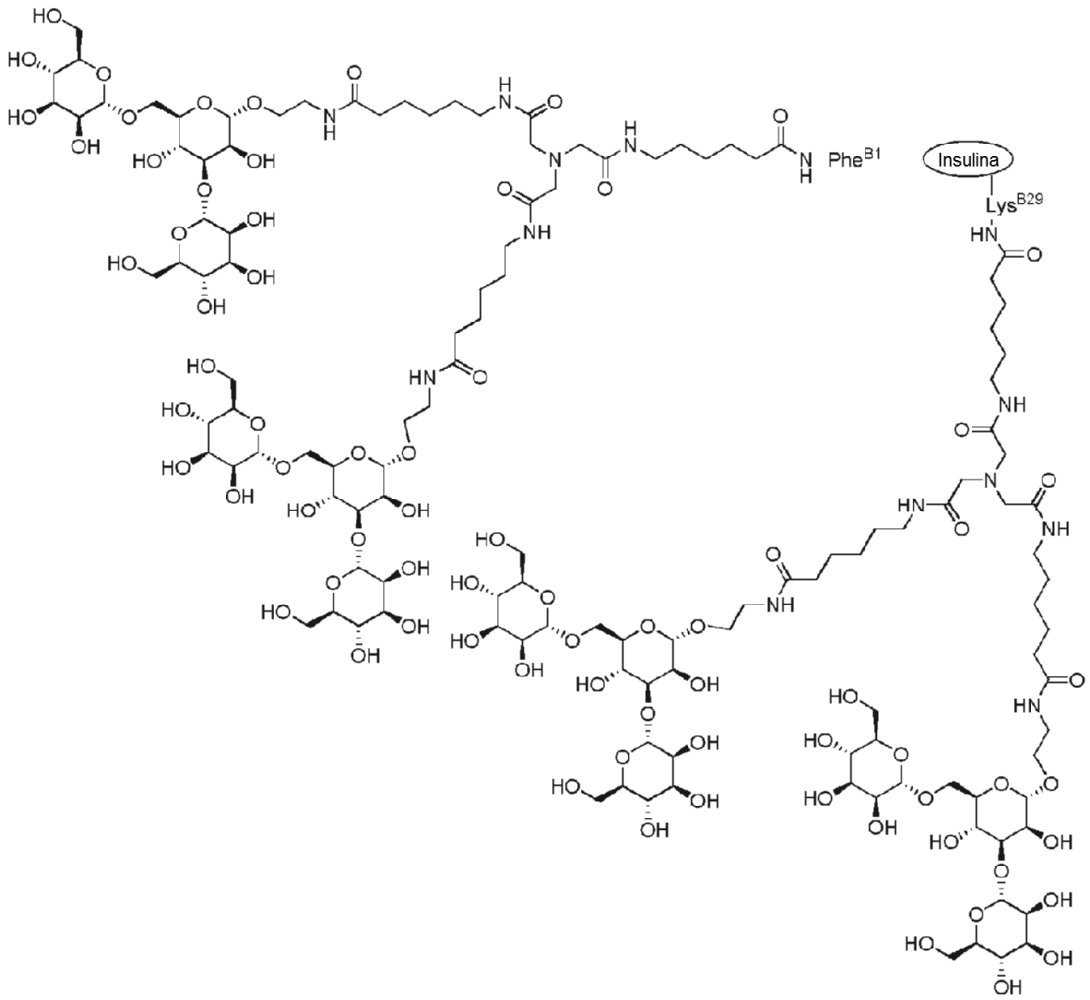
II-2,



II-3,



II-5,



II-6.

8. Una formulación de administración de insulina exenta de lectina, sensible a la concentración en suero de un sacárido, que comprende un conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.

9. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 8 en la que el sacárido es glucosa o alfa-metil manosa.

10. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 8 que es una formulación de liberación sostenida y que comprende adicionalmente protamina y cinc.

11. Un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en un método de tratamiento mediante terapia.

12. Un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10 para su uso en el tratamiento de la diabetes o la hiperglucemia.

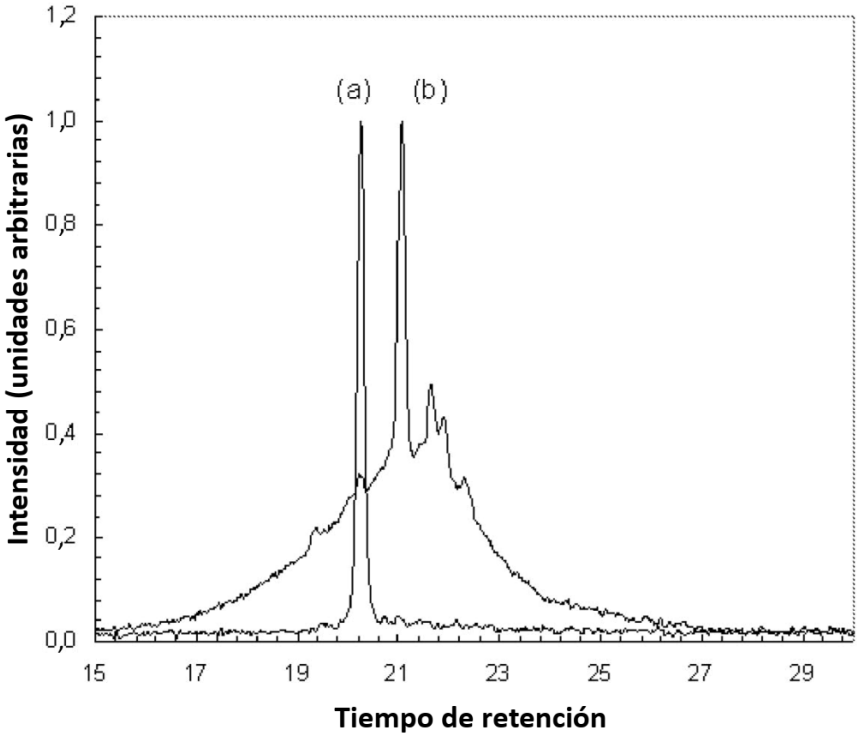

1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Intensidad (unidades arbitrarias)
(a)
(b)
15
17
19
21
23
25
27
29
Tiempo de retención

Figura 1

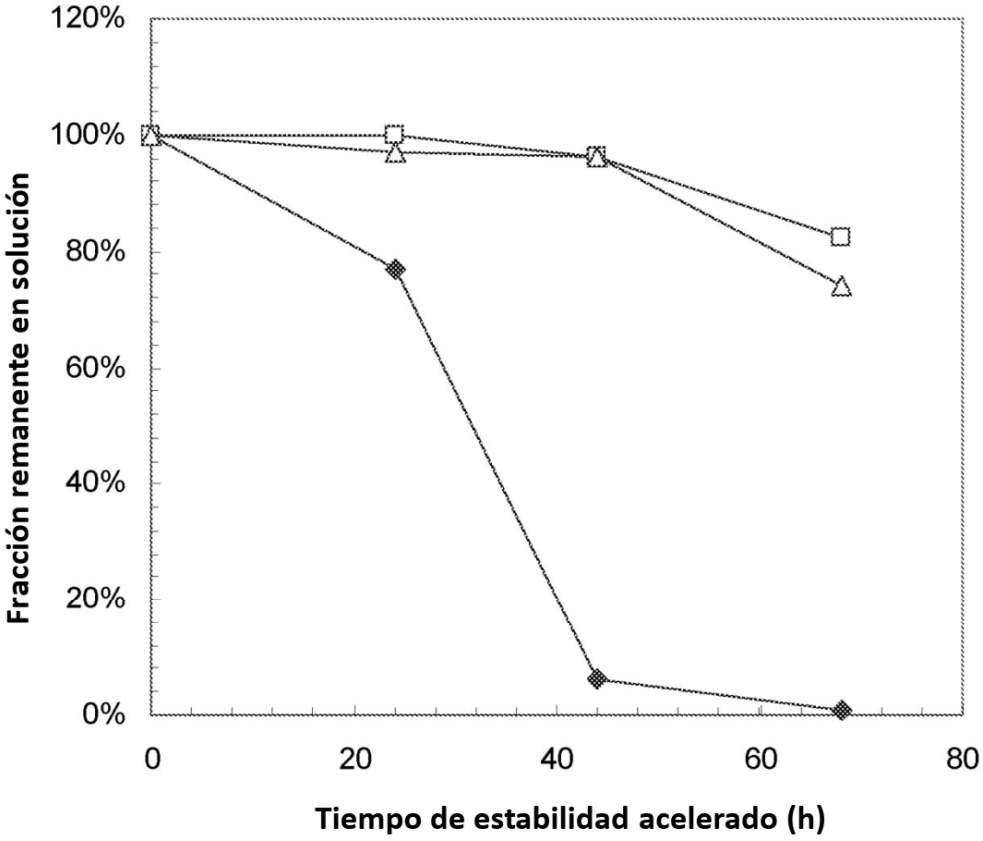

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Fracción remanente en solución
0
20
40
60
80
Tiempo de estabilidad acelerado (h)

Figura 2

(a) Tiempos de retención pico IPC, %insulina libre, y % desamidoinsulina

Muestra	Pico 1 TR[1] (min)	Pico 2 TR (min)	Pico 3 TR (min)	% Pureza IPC	% Insulina libre	% Desamido insulina
HS-1-60-1 (reciente)	20,62	-	-	>99	<0,1	<0,1
HS-1-60-1 (AST, PBS)	20,61	19,19	-	85	<0,1	<0,1
HS-1-60-1 (AST, HEPES)	20,65	-	-	>99	<0,1	<0,1
TL-13-85 (reciente)	20,46	-	-	>99	<0,1	<0,1
TL-13-85 (AST, PBS)	20,40	19,84	18,91	30	<0,1	<0,1
TL-13-85 (AST, HEPES)	20,46	-	-	>99	<0,1	<0,1

[1]Columna C8 en fase invertida, agua:acetonitrilo (TFA 0,1%) gradiente de elución, TR = Tiempo de retención

(b) Datos de espectroscopía de masas en IPC y productos de descomposición de IPC

Muestra	Pico 1 MW (Da)	Pico 1 MW (Da)	Pico 1 MW (Da)
HS-1-60-1 (reciente)	6730 [2]	-	-
HS-1-60-1 (AST, PBS)	6730	5947	-
HS-1-60-1 (AST, HEPES)	6730	-	-
TL-13-85 (reciente)	6829 [2]	-	-
TL-13-85 (AST, PBS)	6829	5944	7928
TL-13-85 (AST, HEPES)	6829	-	-

[2]Columna Los dos IPC mostrados aquí tienen estructuras diferentes y, por tanto, diferentes MW

Figura 3

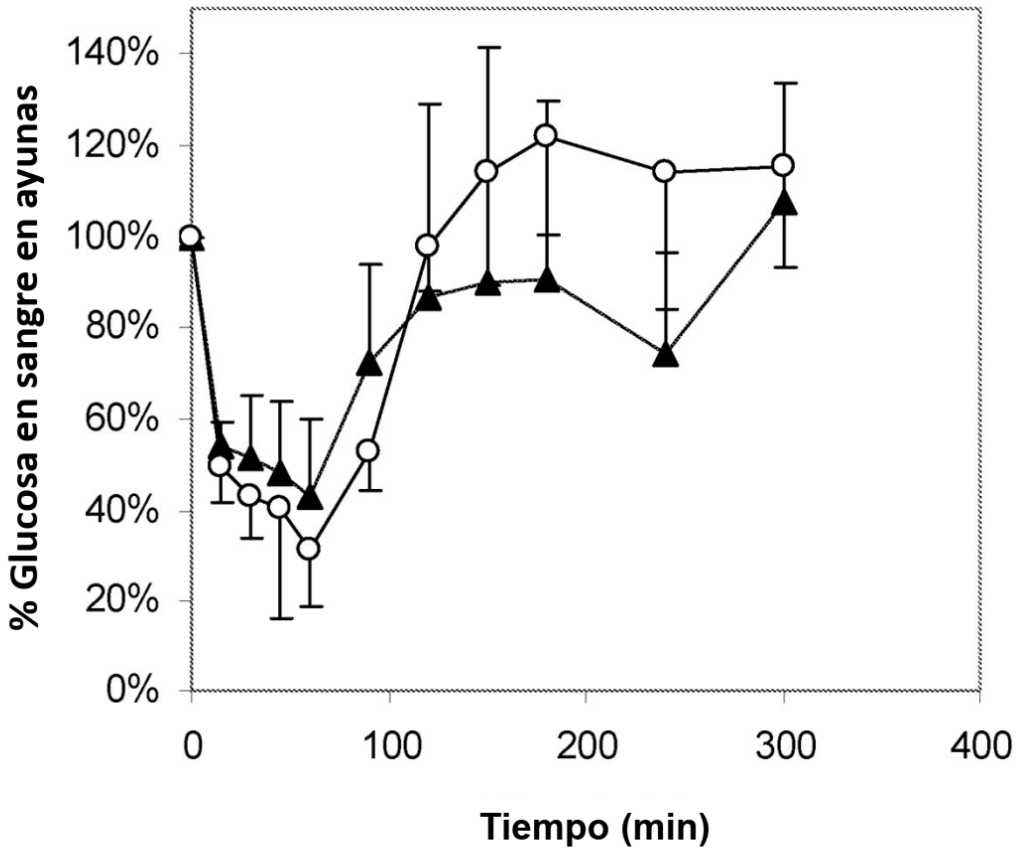

% Glucosa en sangre en ayunas
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
100
200
300
400
Tiempo (min)

Figura 4

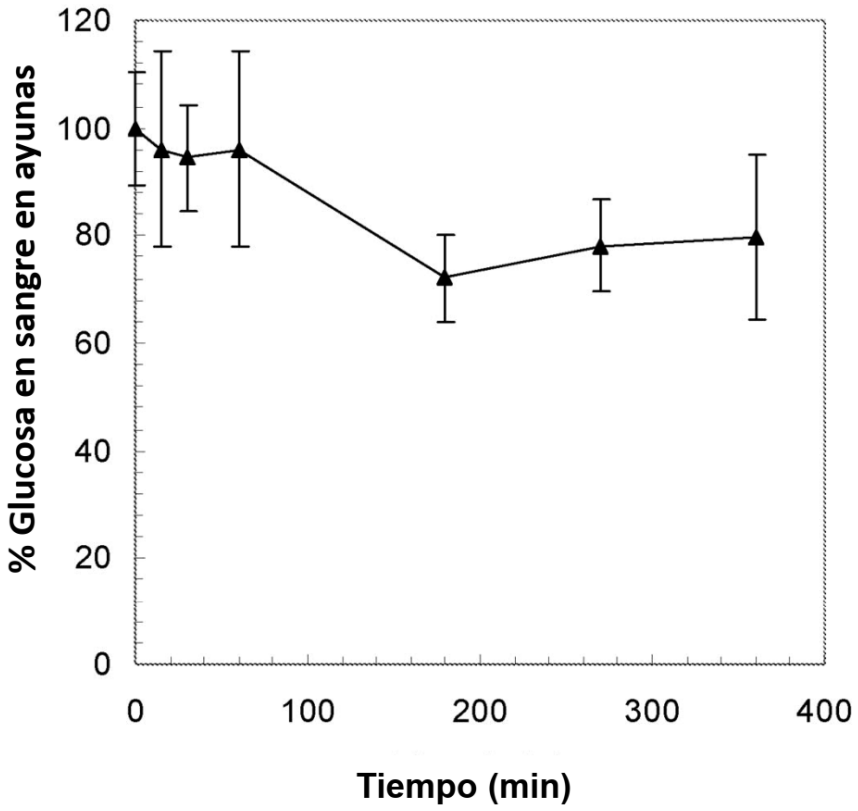

% Glucosa en sangre en ayunas
120
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
Tiempo (min)

Figura 5

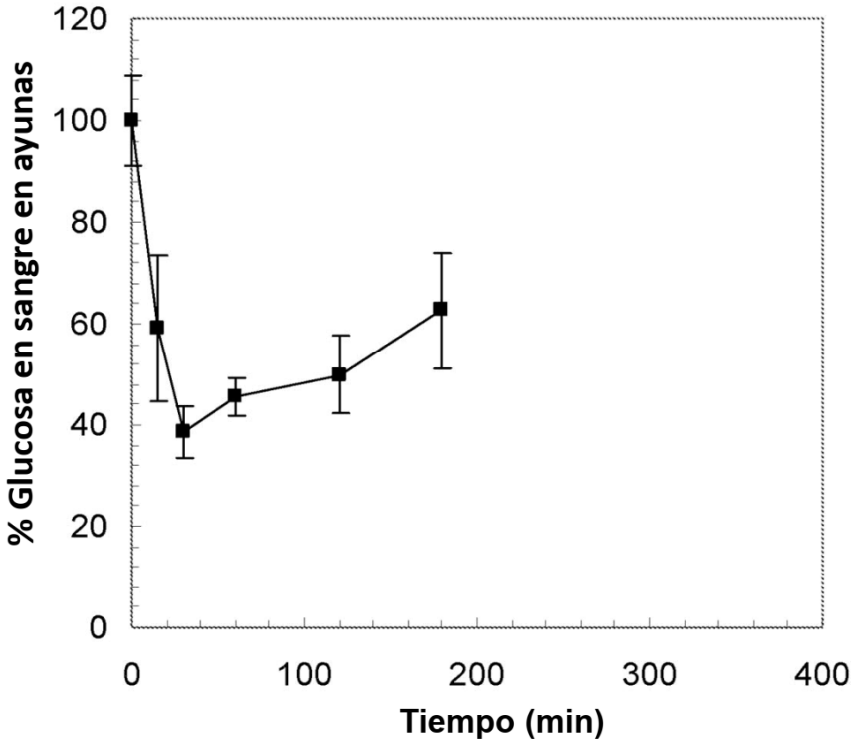

% Glucosa en sangre en ayunas
120
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
Tiempo (min)

Figura 6

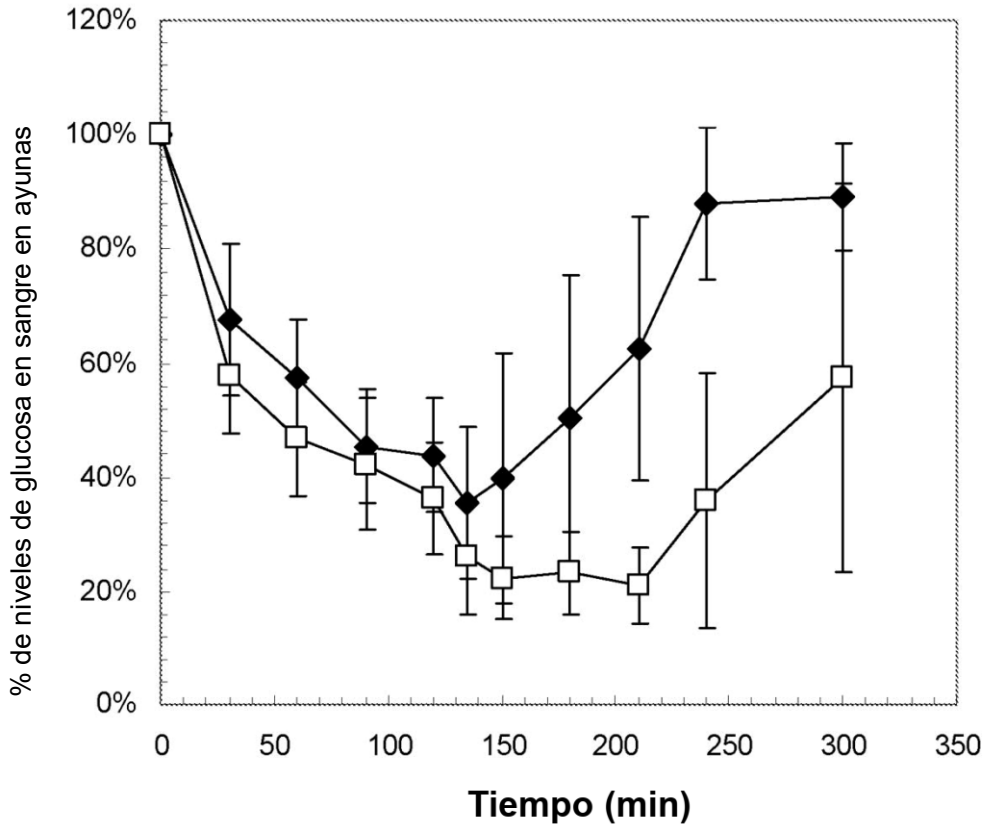

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
% de niveles de glucosa en sangre en ayunas
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)

Figura 7

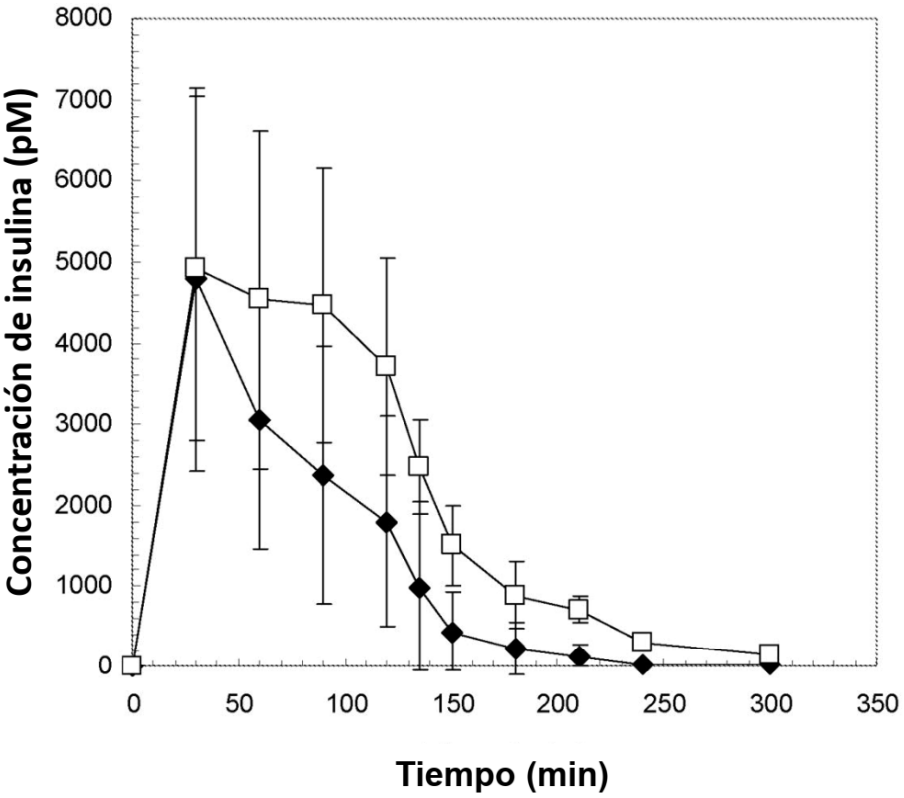

Concentración de insulina (pM)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)

Figura 8

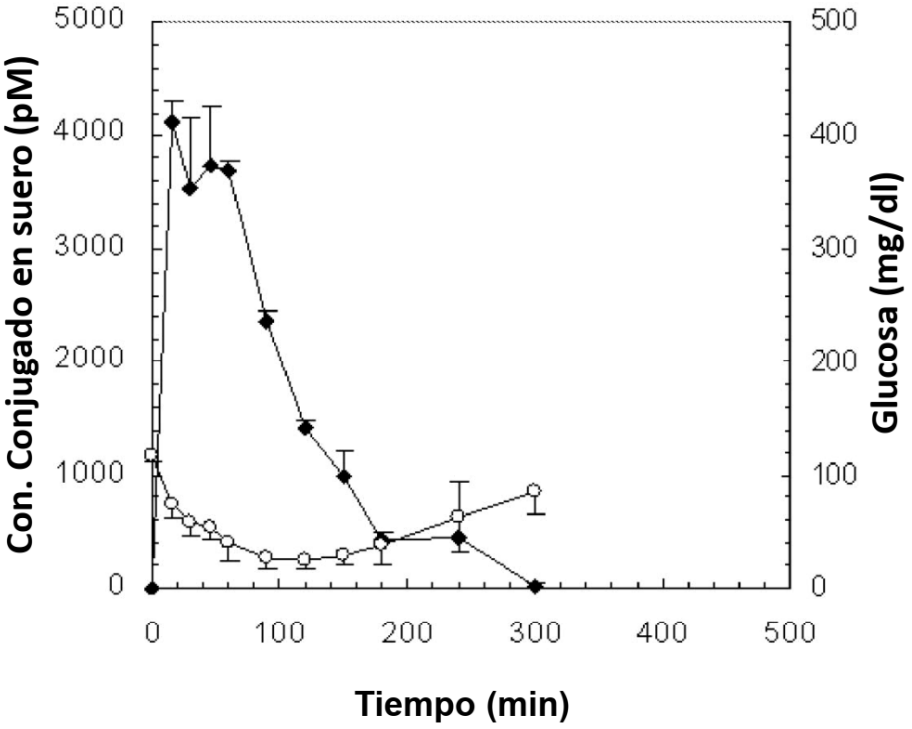

5000
4000
3000
2000
1000
0
Con. Conjugado en suero (pM)
500
400
300
200
100
0
Glucosa (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
Tiempo (min)

Figura 9

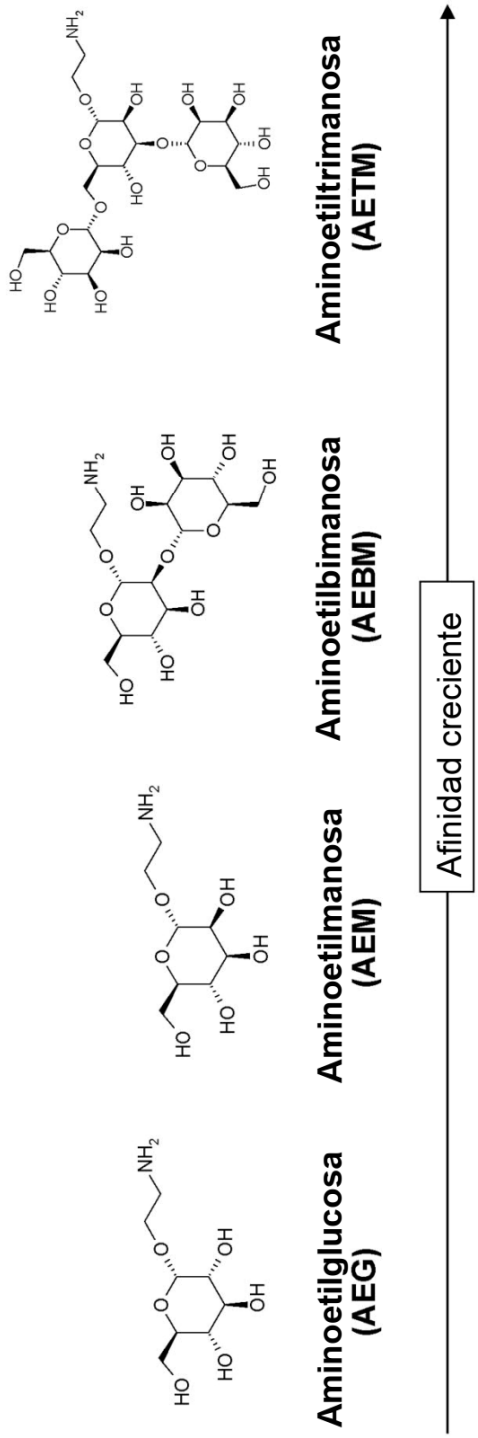

Aminoetilglucosa (AEG)
Aminoetilmanosa (AEM)
Aminoetilbimanosa (AEBM)
Aminoetiltrimanosa (AETM)
Afinidad creciente

Figura 10

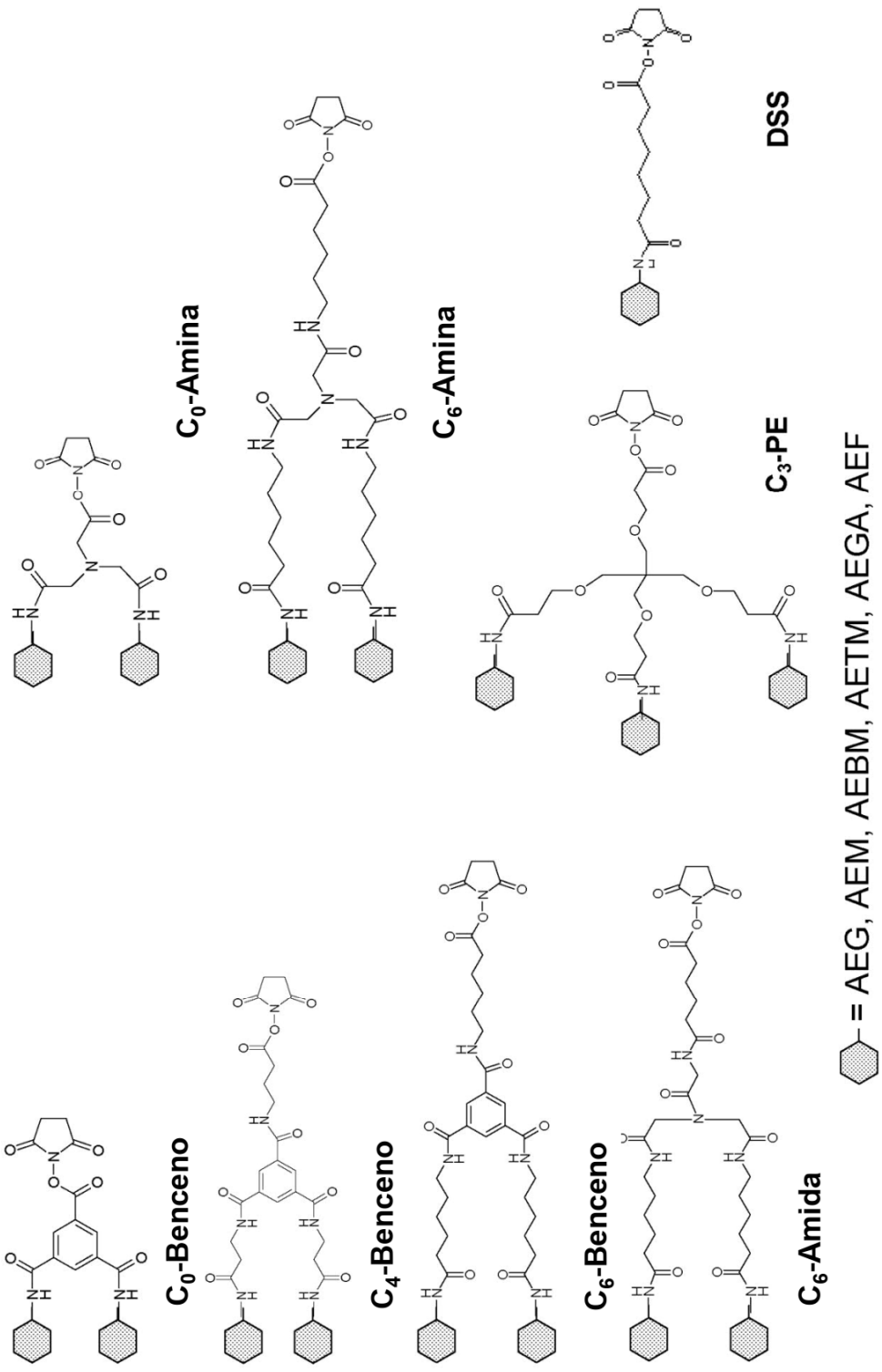

C0-Amina
C6-Amina
DSS
C3-PE
C0-Benceno
C4-Benceno
C6-Benceno
C6-Amida
= AEG, AEM, AEBM, AETM, AEGA, AEF

Figura 11

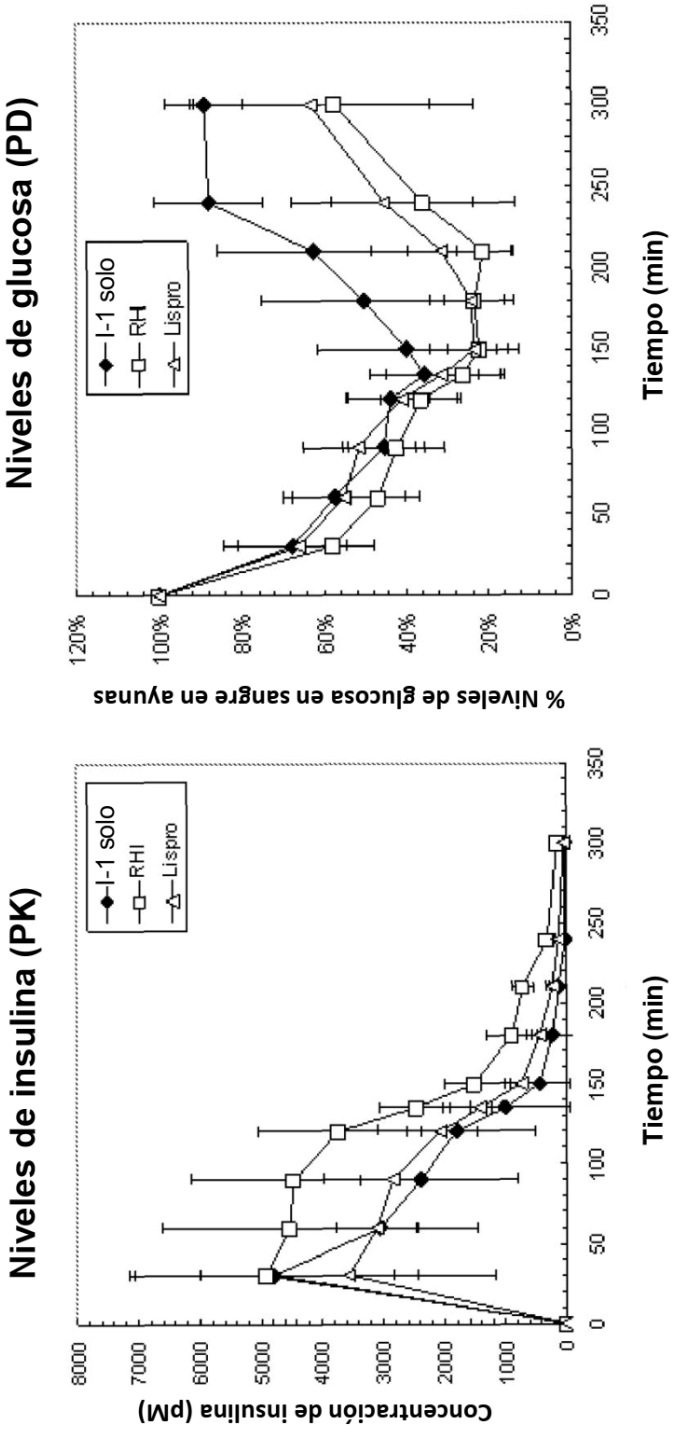

Niveles de glucosa (PD)
% Niveles de glucosa en sangre en ayunas
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
I-1 solo
RHI
Lispro
Niveles de insulina (PK)
Concentración de insulina (pM)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Tiempo (min)
I-1 solo
RHI
Lispro

Figura 12

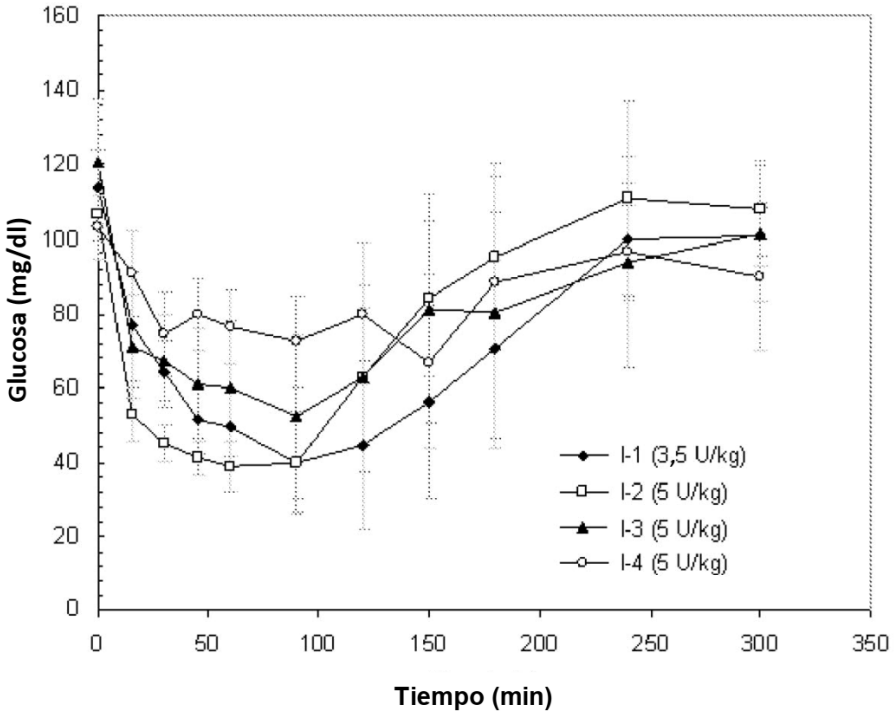

160
140
120
100
80
60
40
20
0
Glucosa (mg/dl)
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
I-1 (3,5 U/kg)
I-2 (5 U/kg)
I-3 (5 U/kg)
I-4 (5 U/kg)

Figura 13

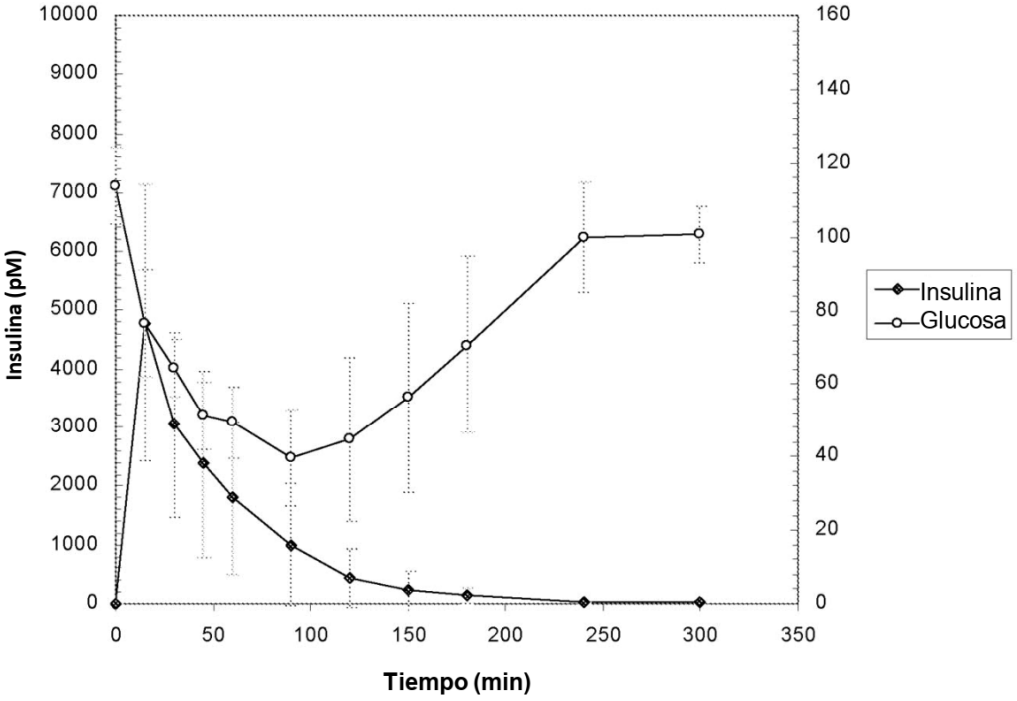

10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Insulina (pM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

Figura 14

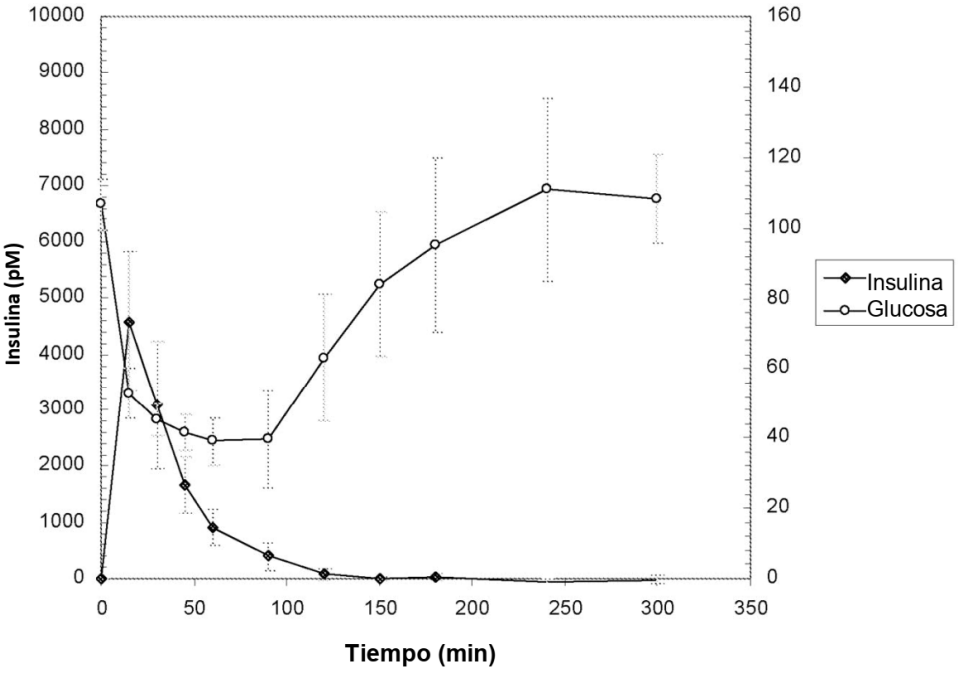

Insulina (pM)
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350

Figura 15

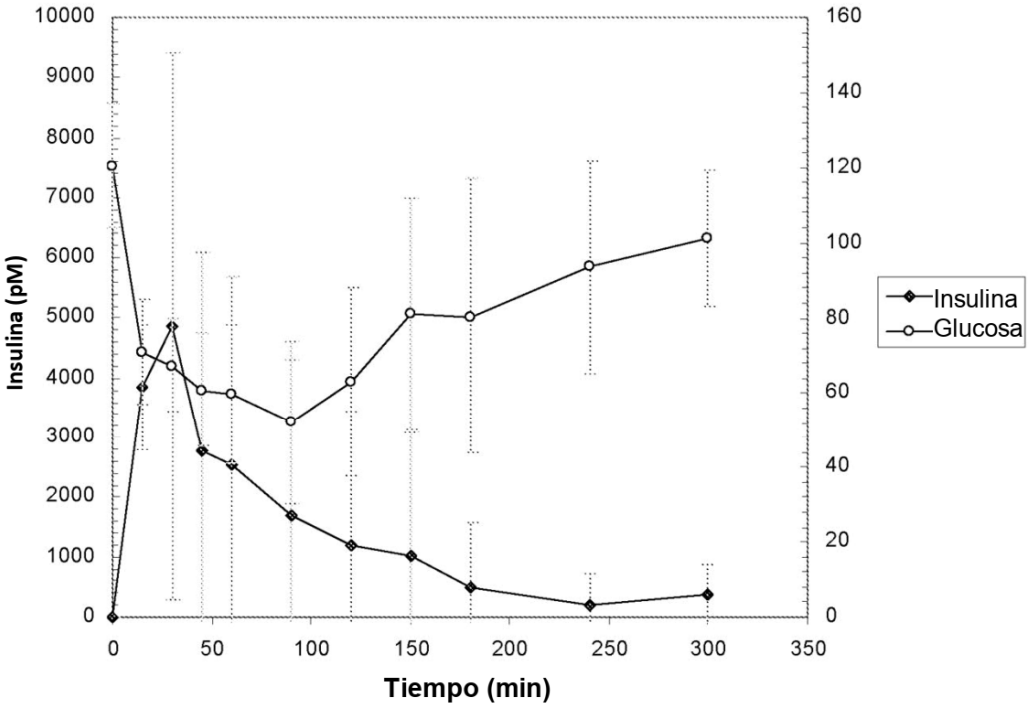

10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Insulina (pM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

Figura 16

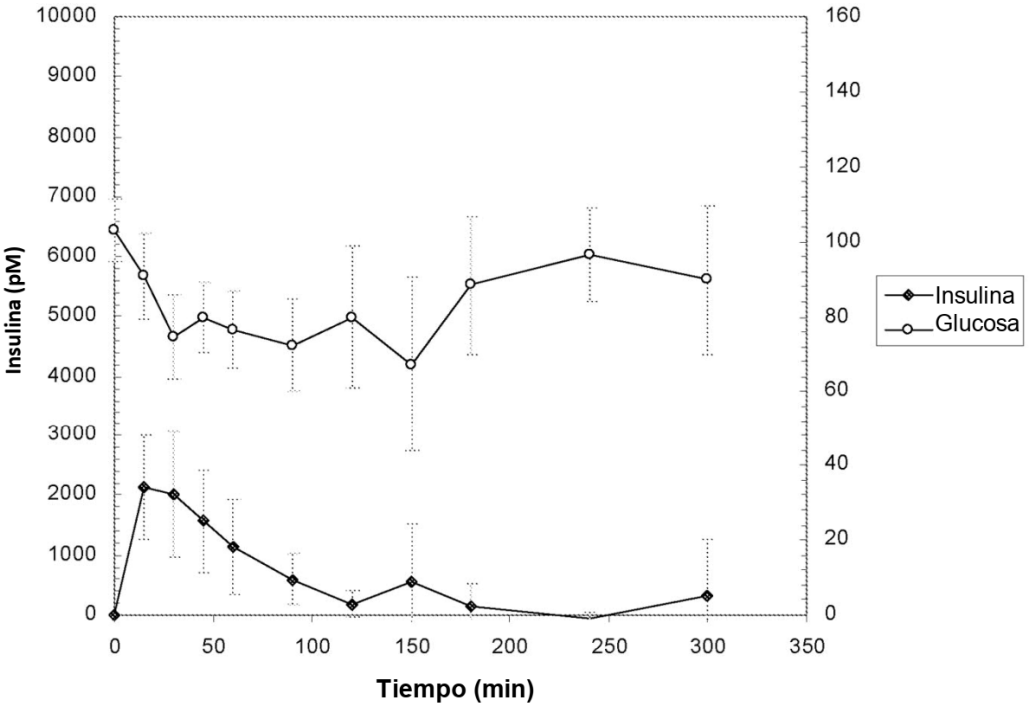

10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Insulina (pM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

Figura 17

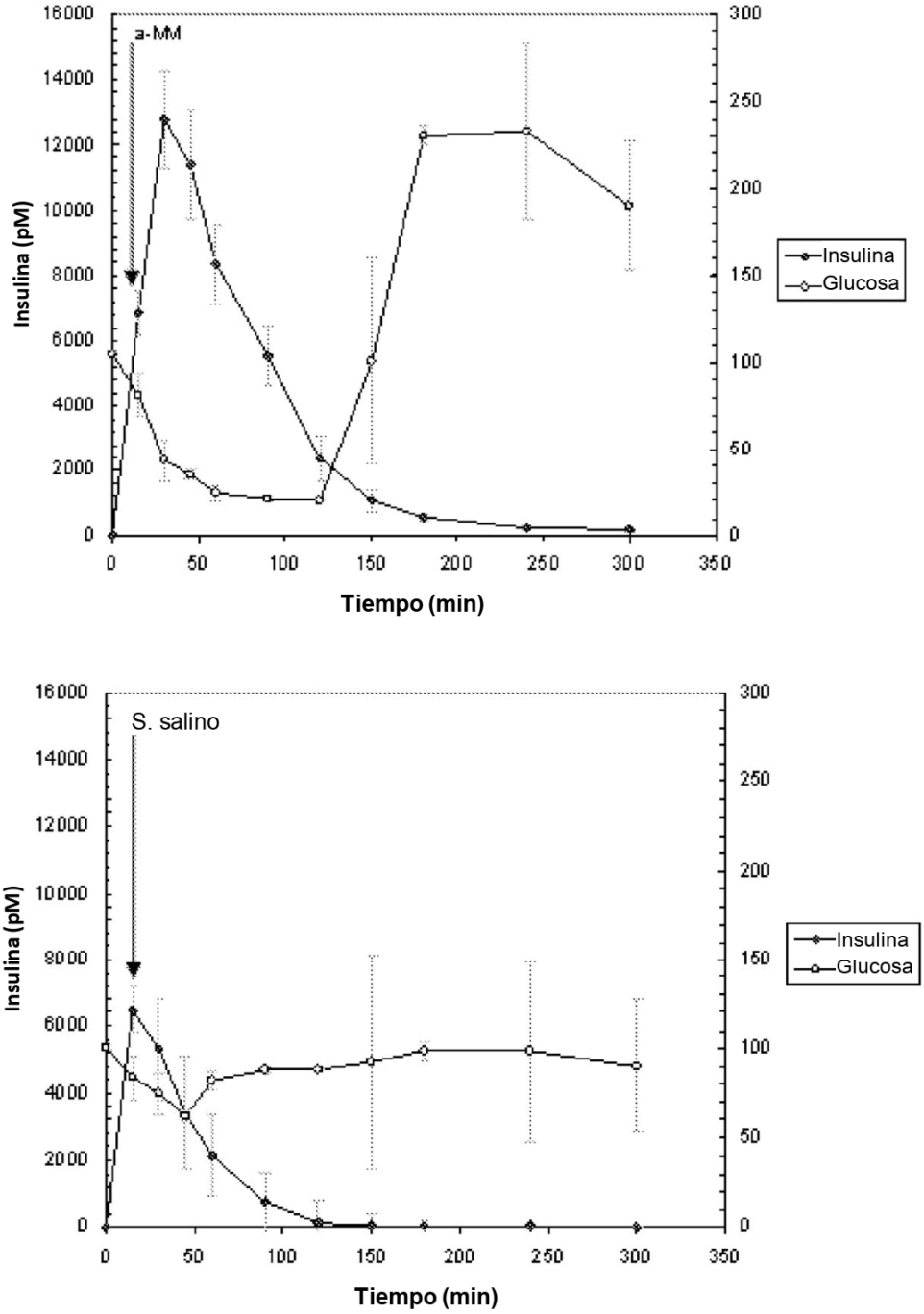

a-MM
Insulina (pM)
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa
S. salino
Insulina (pM)
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

Figura 18

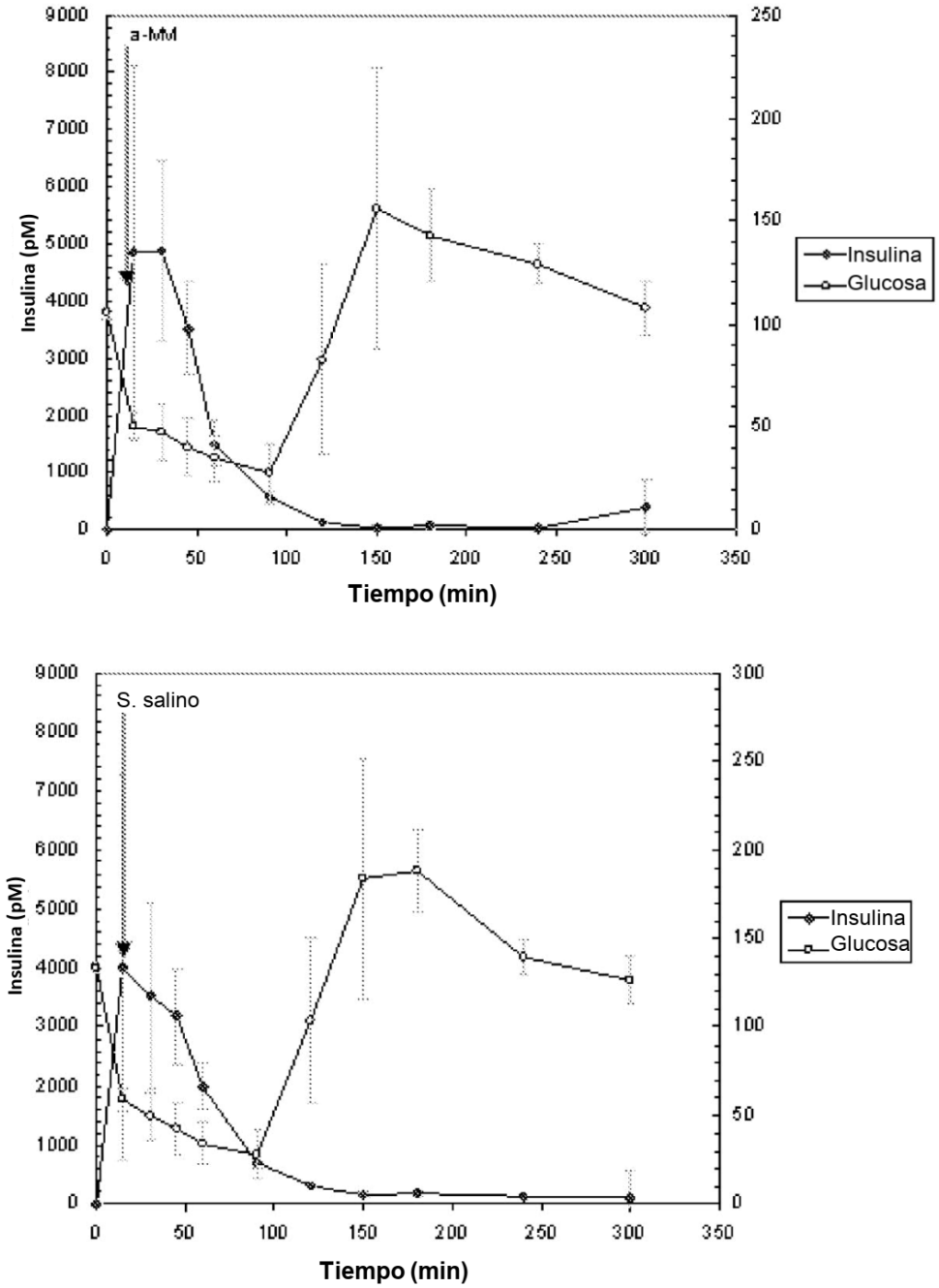

a-MM
Insulina (pM)
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa
S. salino
Insulina (pM)
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

Figura 19

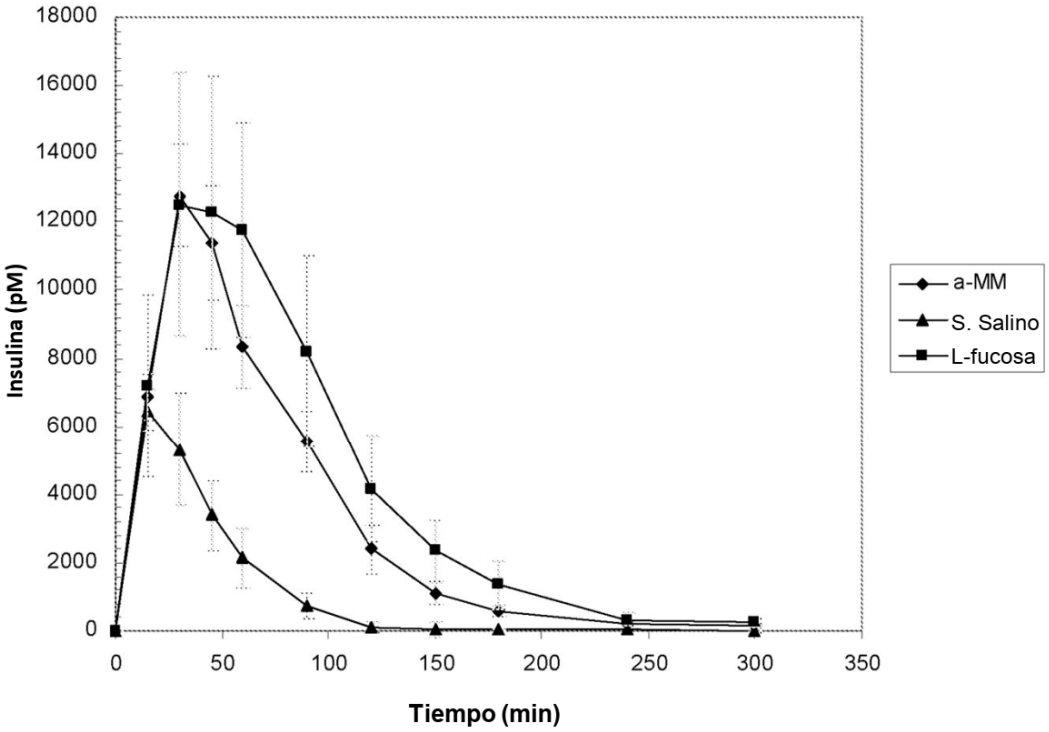

18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Insulina (pM)
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
a-MM
S. Salino
L-fucosa

Figura 20

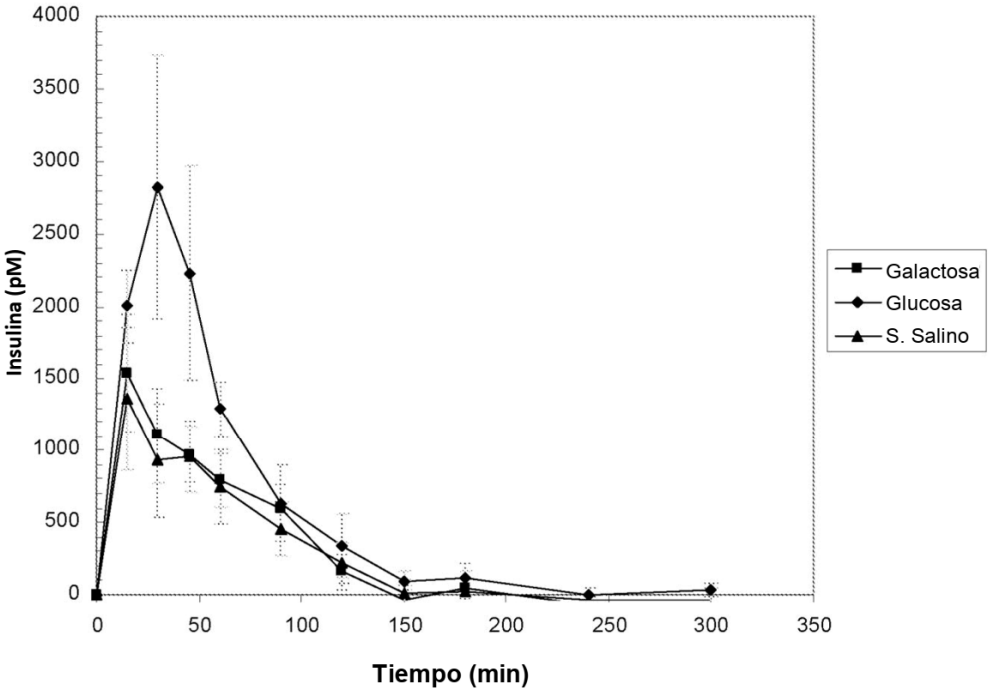

4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Insulina (pM)
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
Galactosa
Glucosa
S. Salino

Figura 21

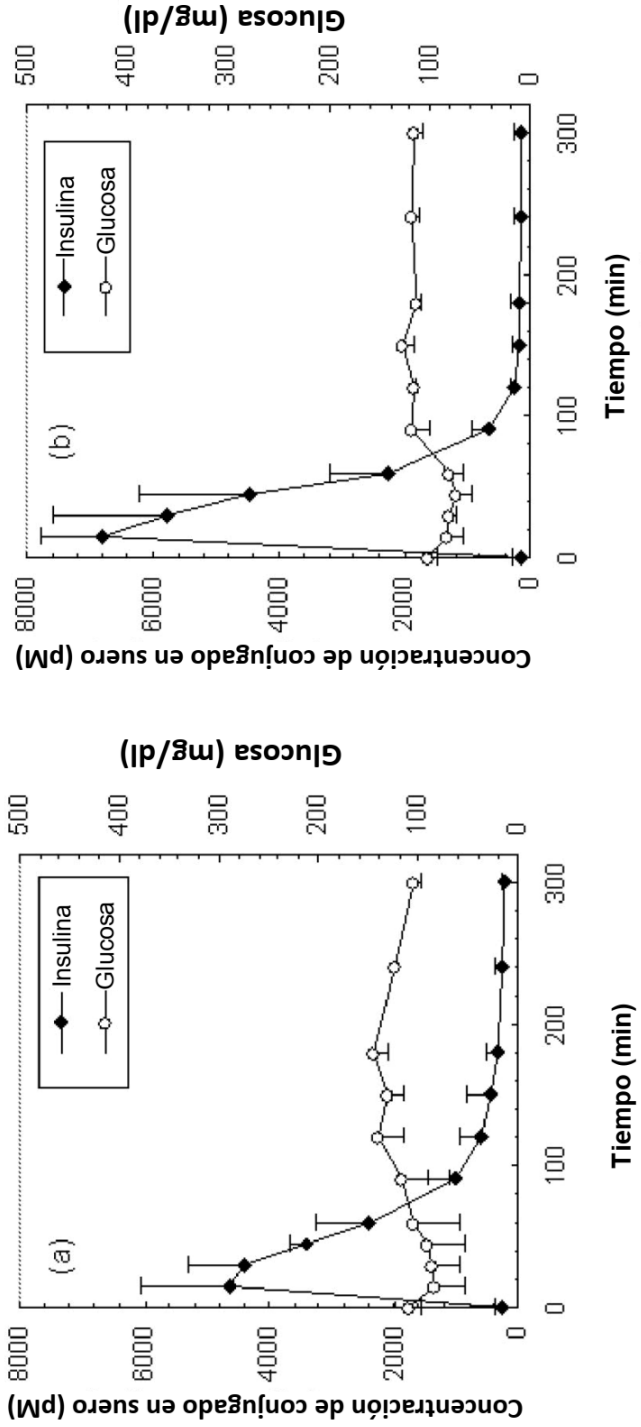

Concentración de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
(a)
(b)
Insulina
Glucosa
0
2000
4000
6000
8000
100
200
300
400
500

Figura 22

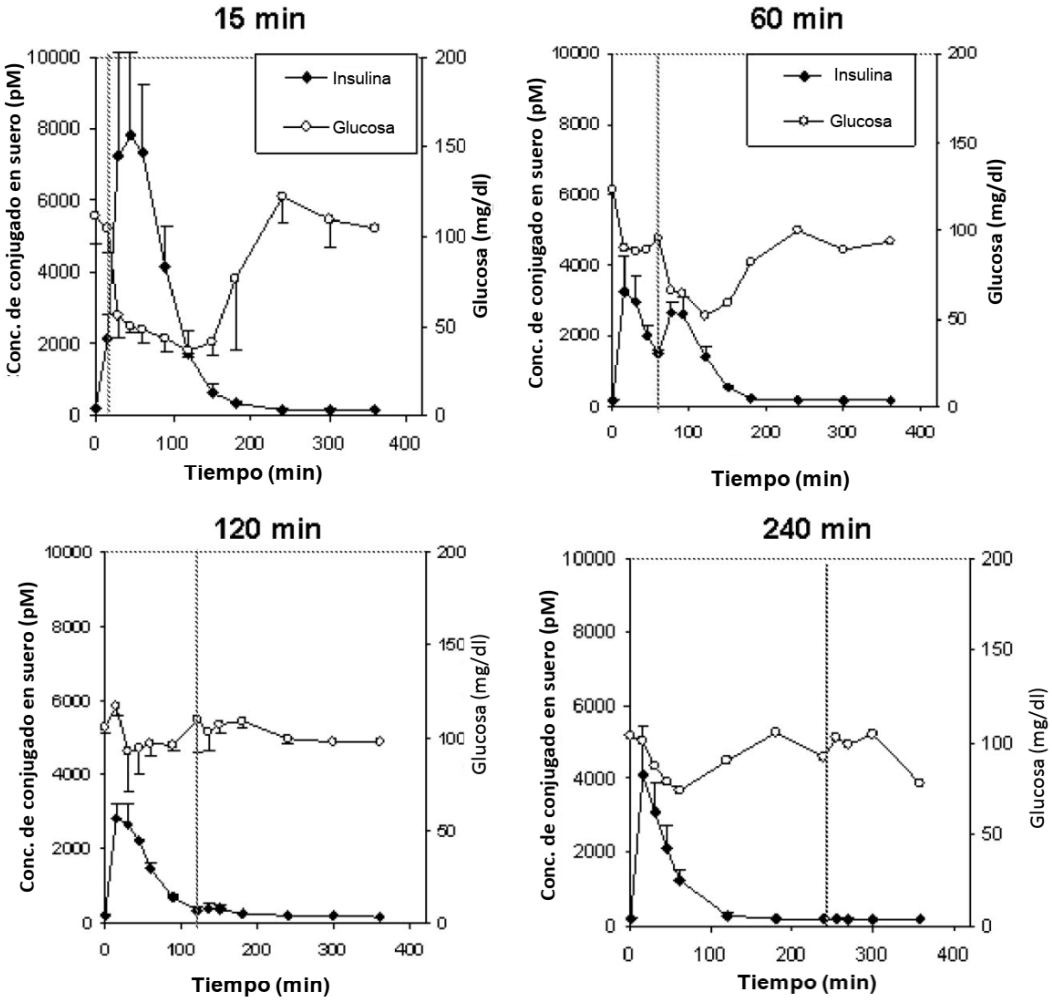

15 min
60 min
120 min
240 min
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
2000
4000
6000
8000
10000
50
100
150
200
300
400

Figura 23

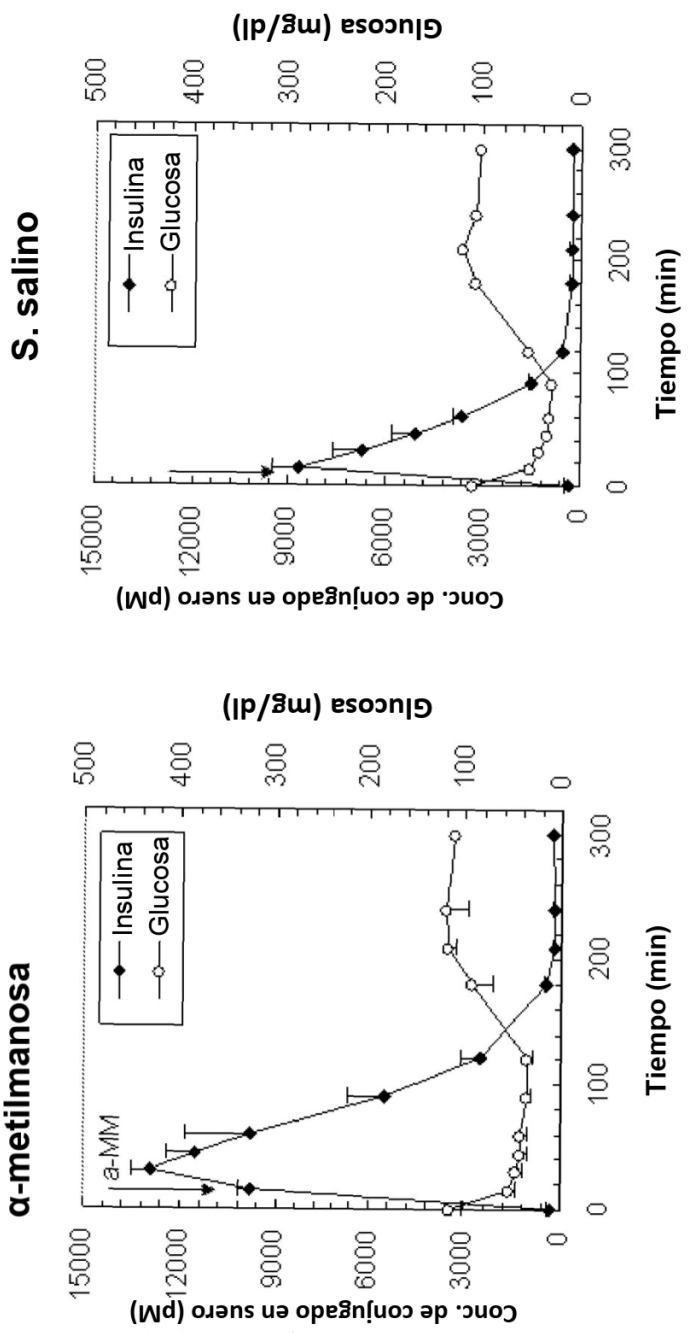

S. salino
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metilmanosa
a-MM
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 24

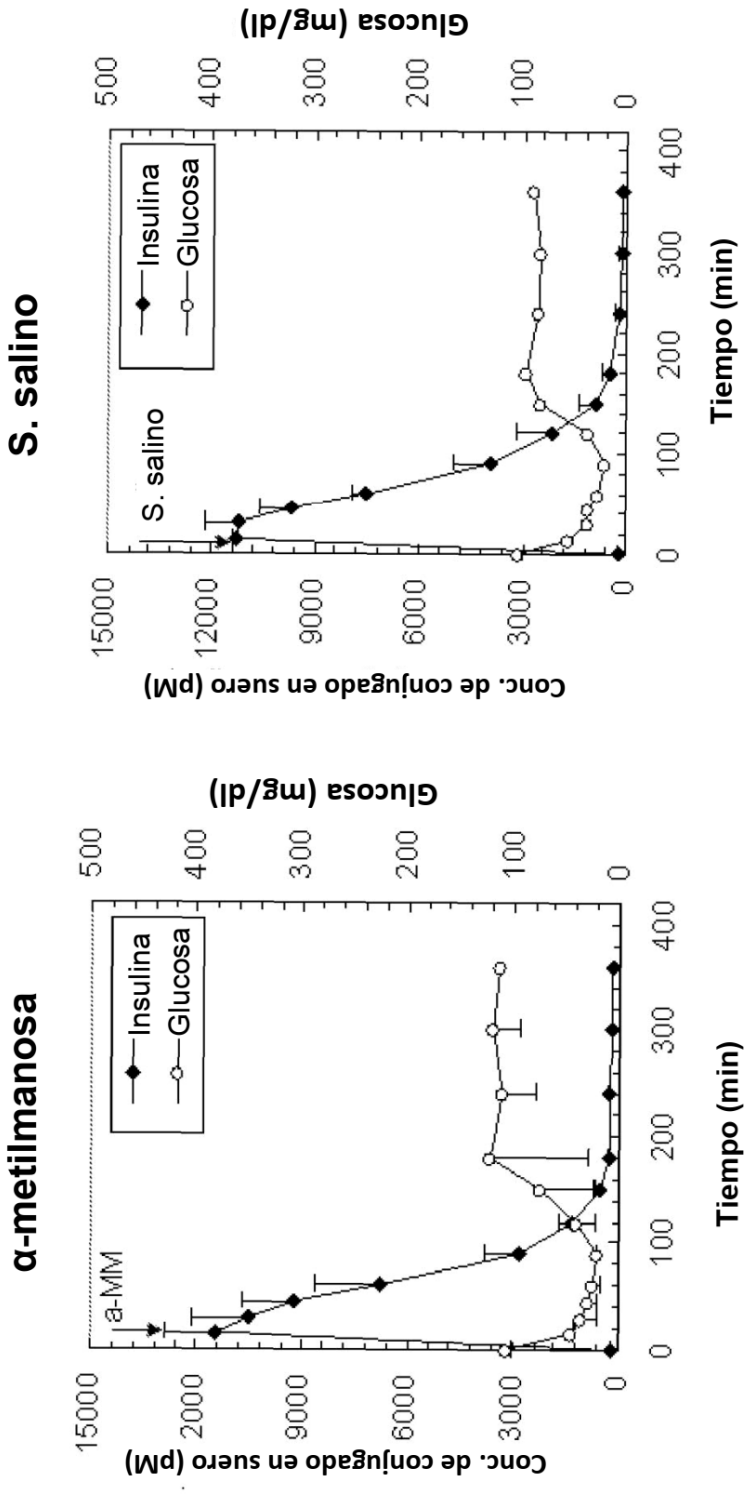

S. salino
Insulina
Glucosa
S. salino
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metilmanosa
Insulina
Glucosa
a-MM
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 25

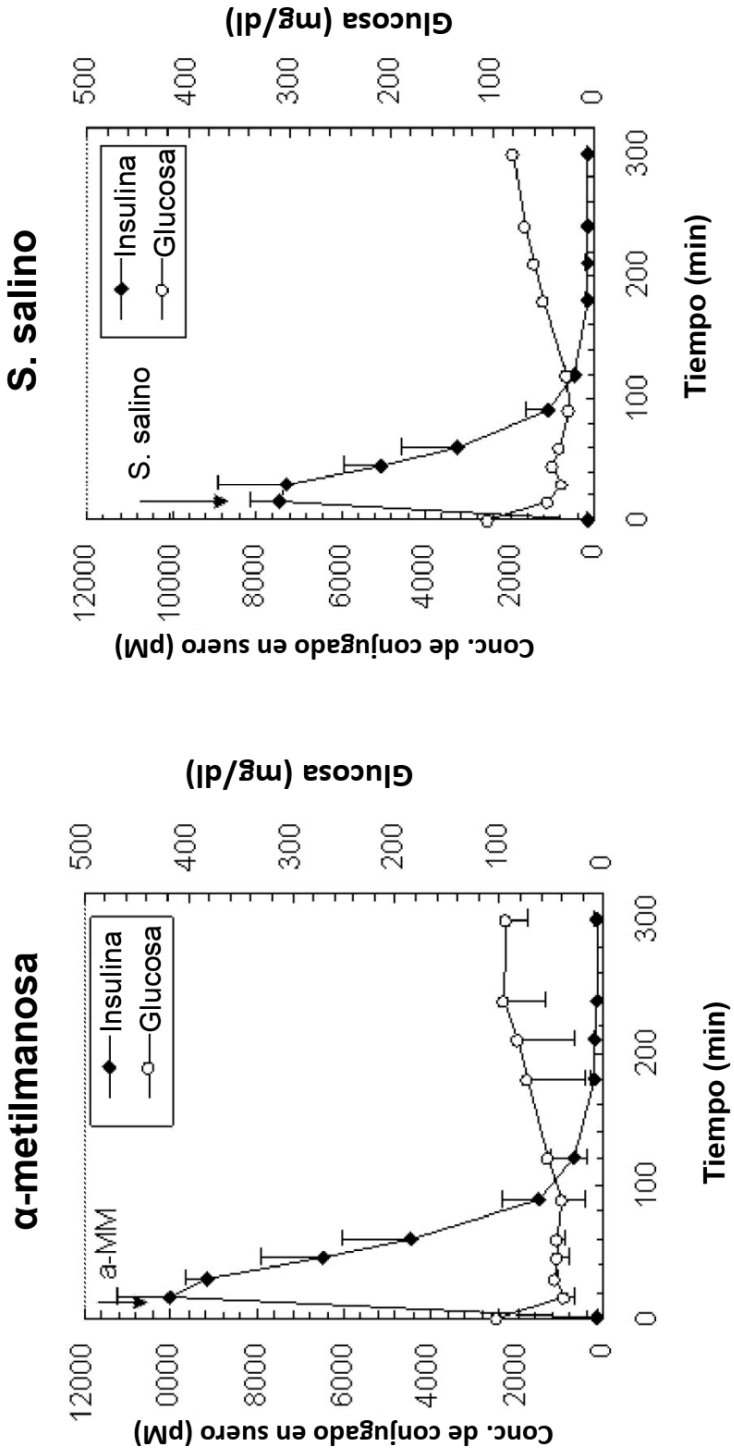

S. salino
Insulina
Glucosa
S. salino
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metilmanosa
Insulina
Glucosa
a-MM
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 26

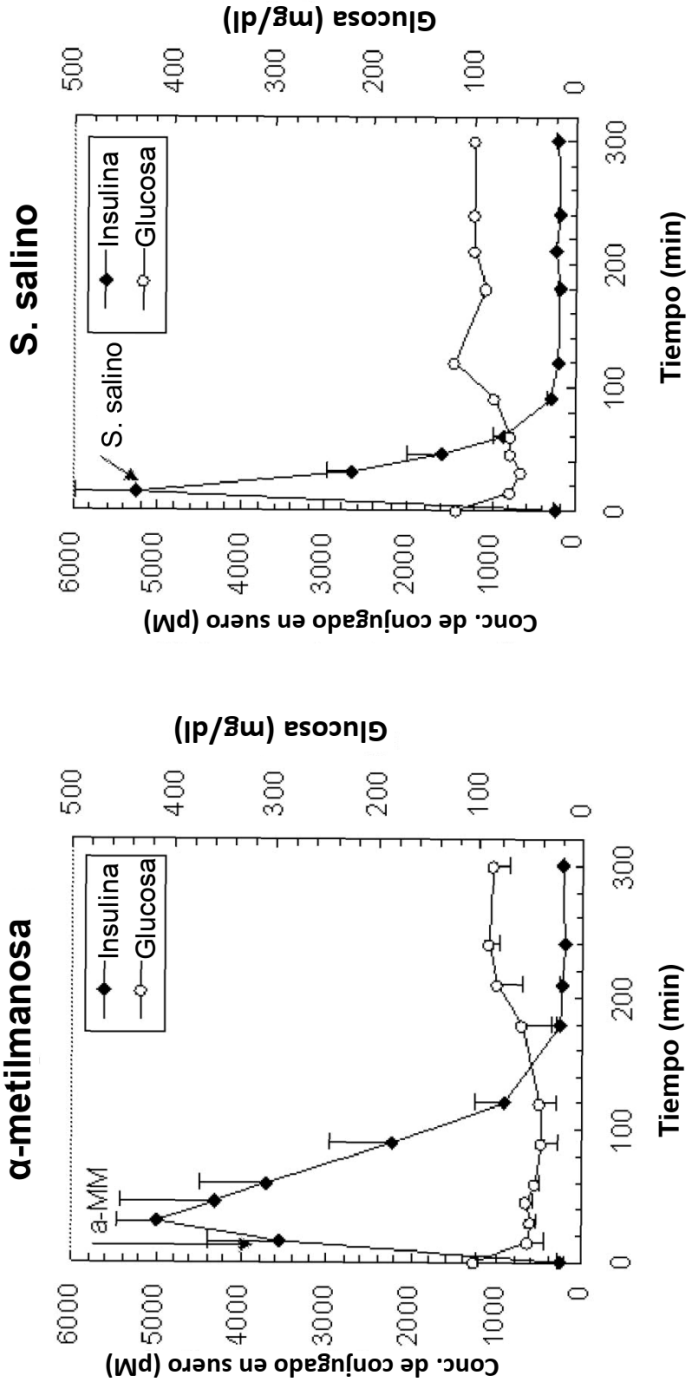

α-metilmanosa
a-MM
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
S. salino
S. salino
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 27

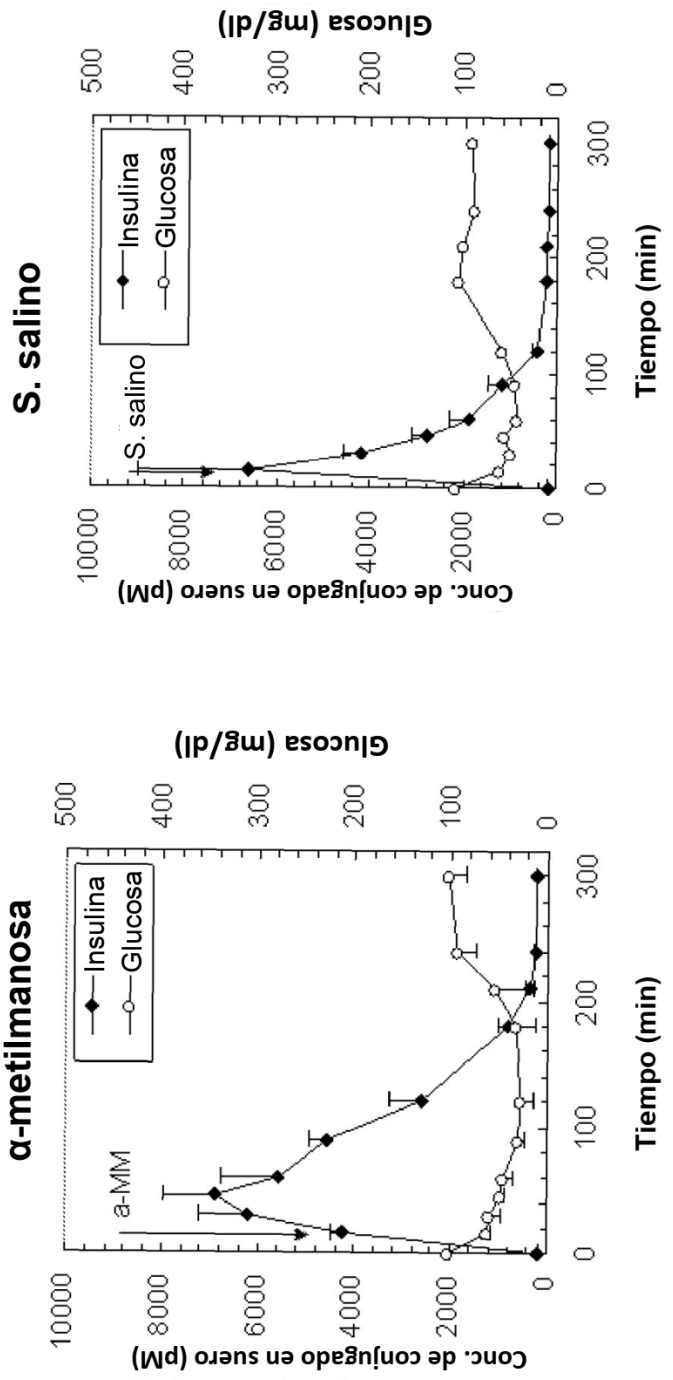

S. salino
Insulina
Glucosa
S. salino
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metilmanosa
Insulina
Glucosa
a-MM
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 28

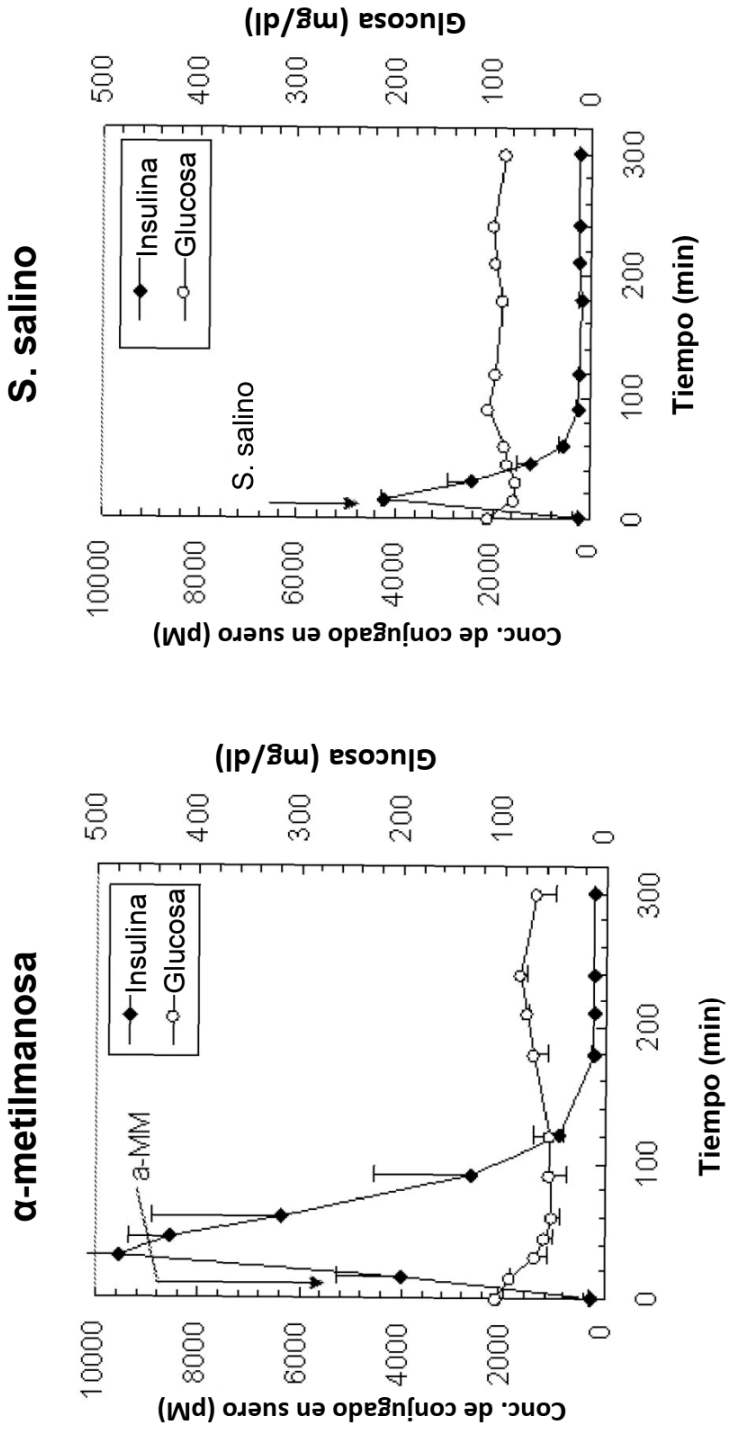

S. salino
Insulina
Glucosa
S. salino
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metilmanosa
Insulina
Glucosa
a-MM
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 29

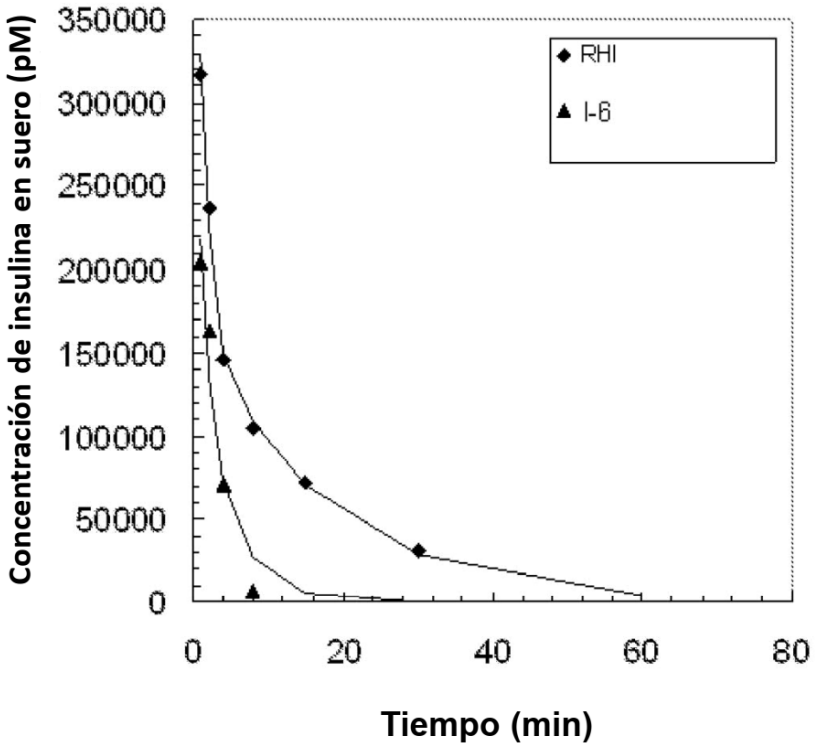

Concentración de insulina en suero (pM)
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0
20
40
60
80
Tiempo (min)
RHI
I-6

Figura 30

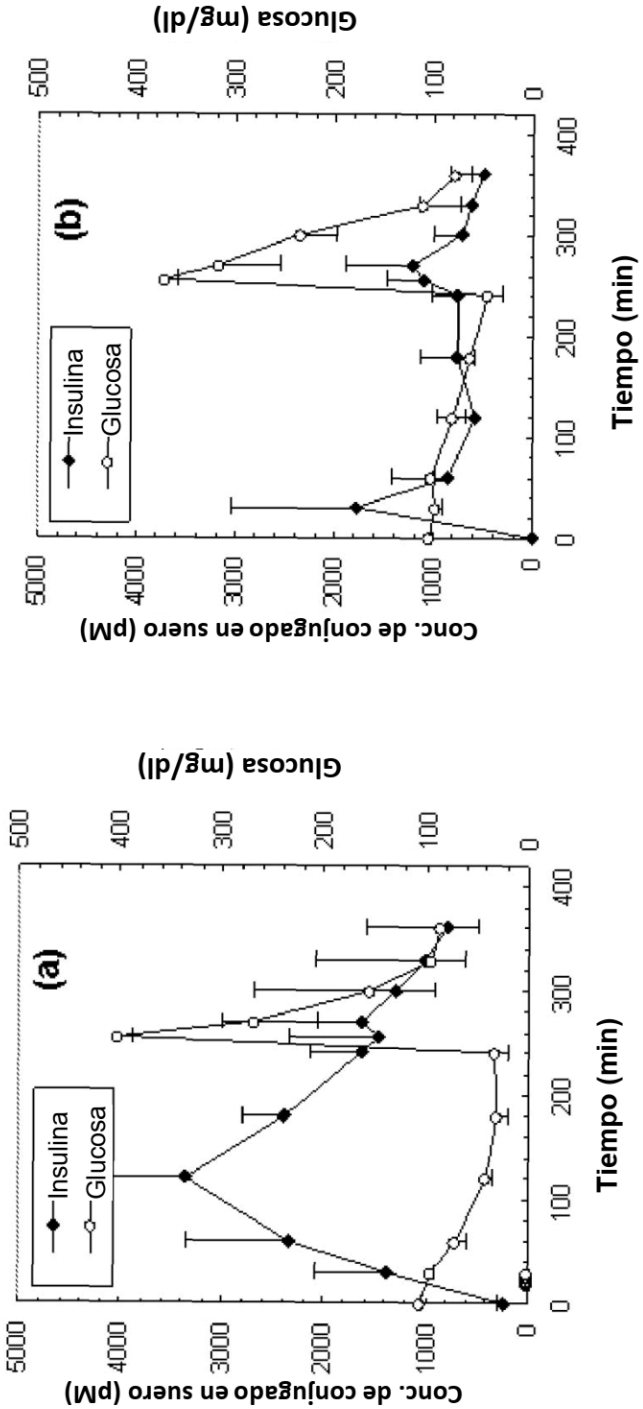

(a)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 31

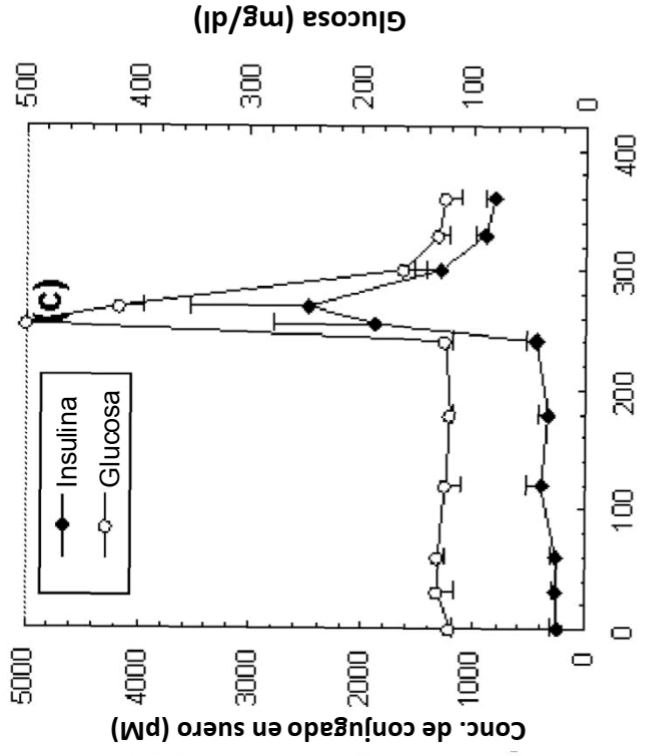


Figura 31 (continuación)

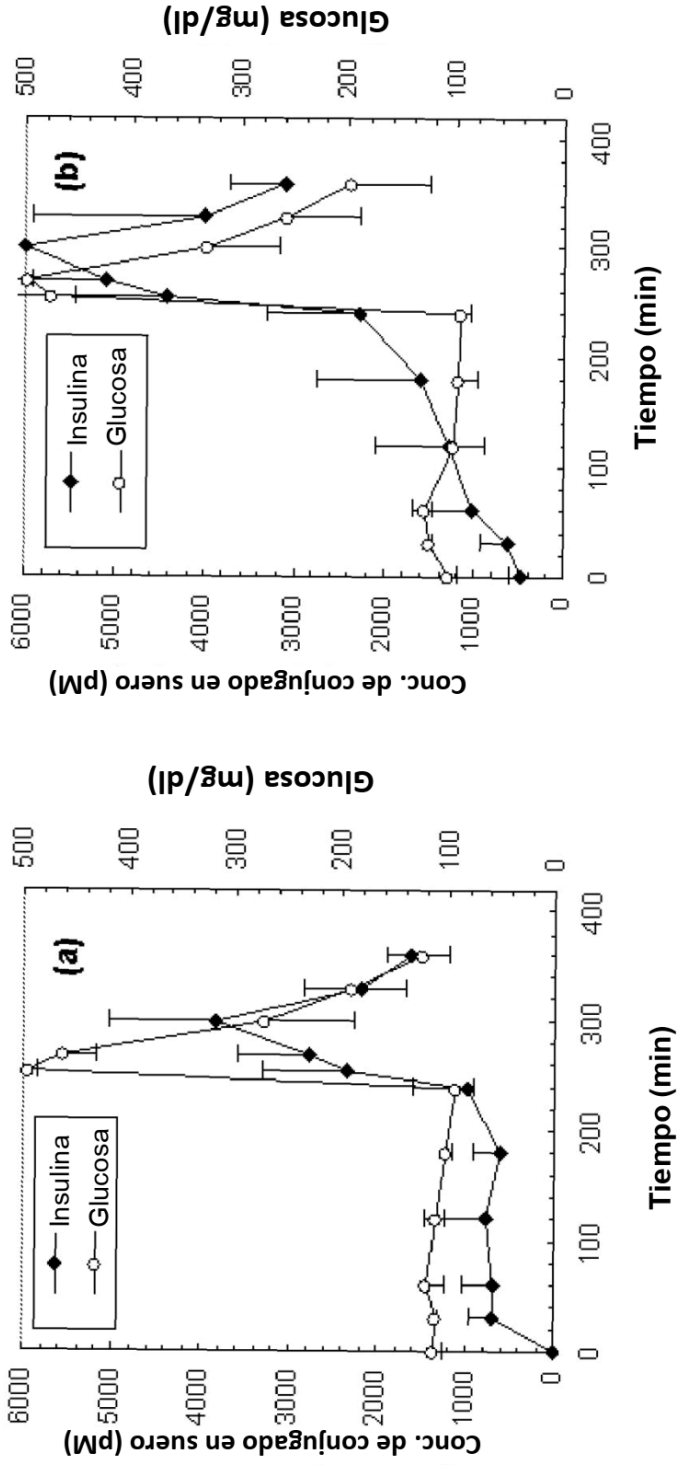

(a)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 32

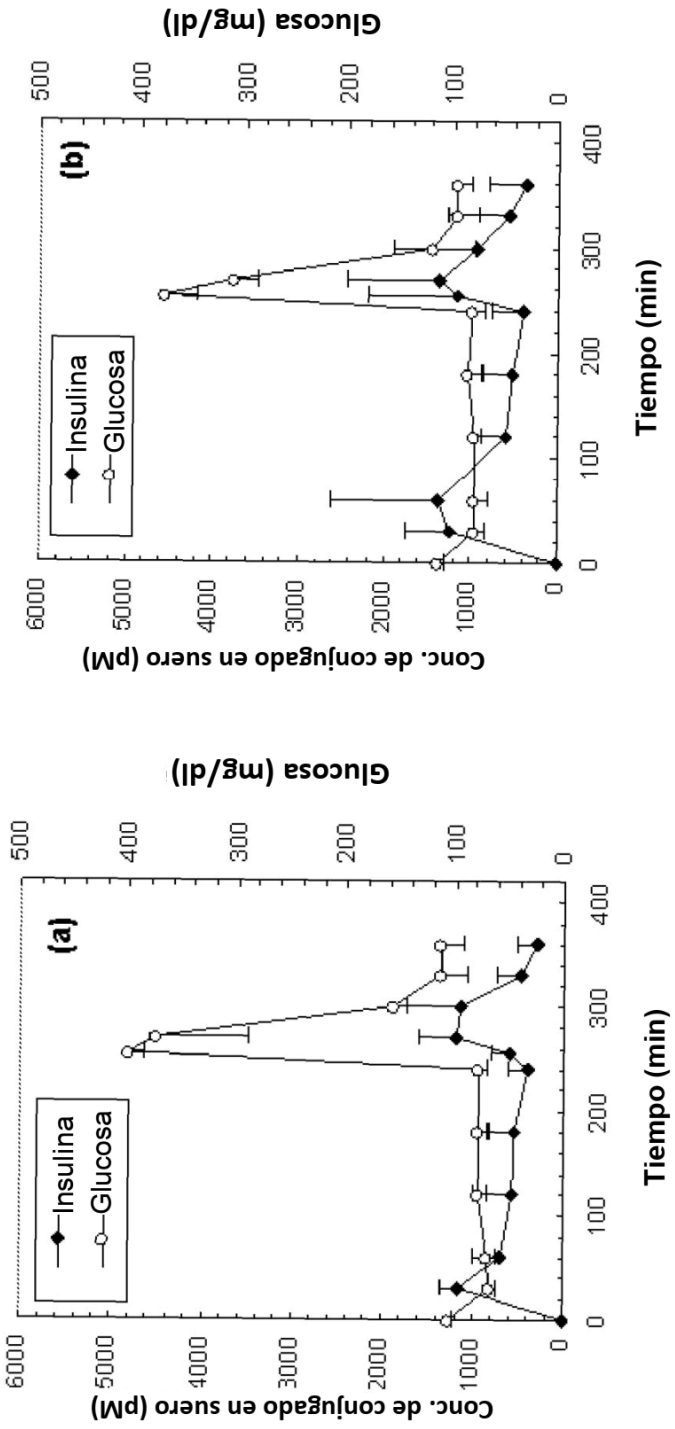

(a)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 33

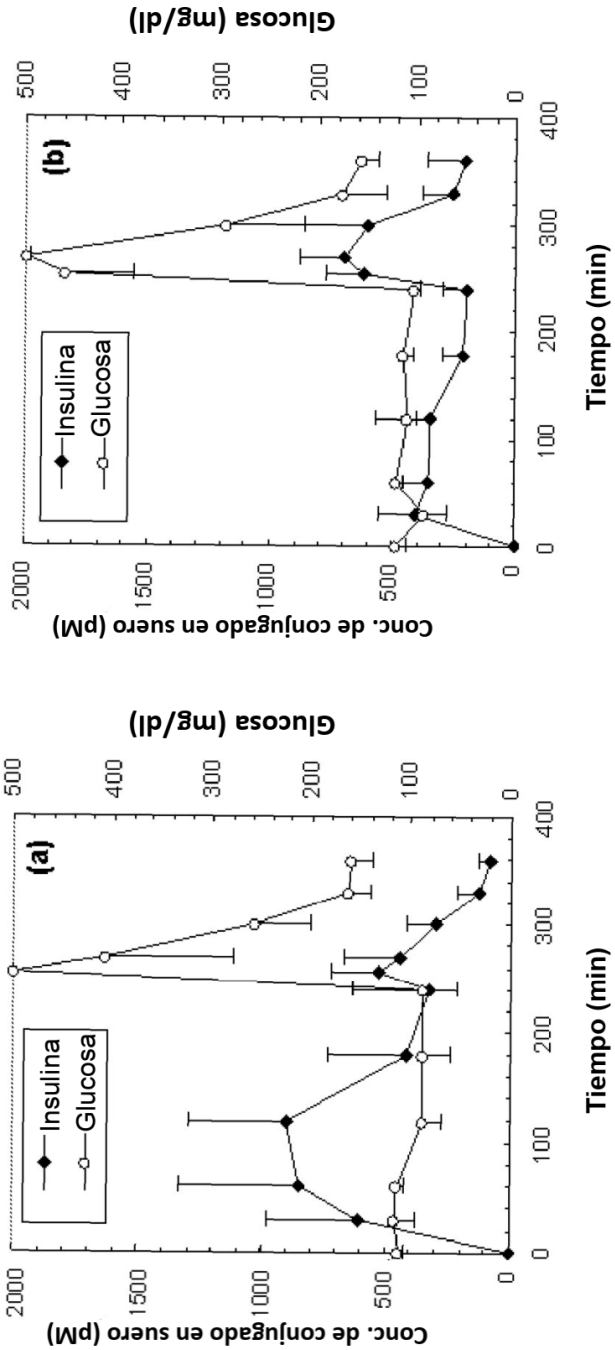

(a)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
500
1000
1500
2000
100
200
300
400

Figura 34

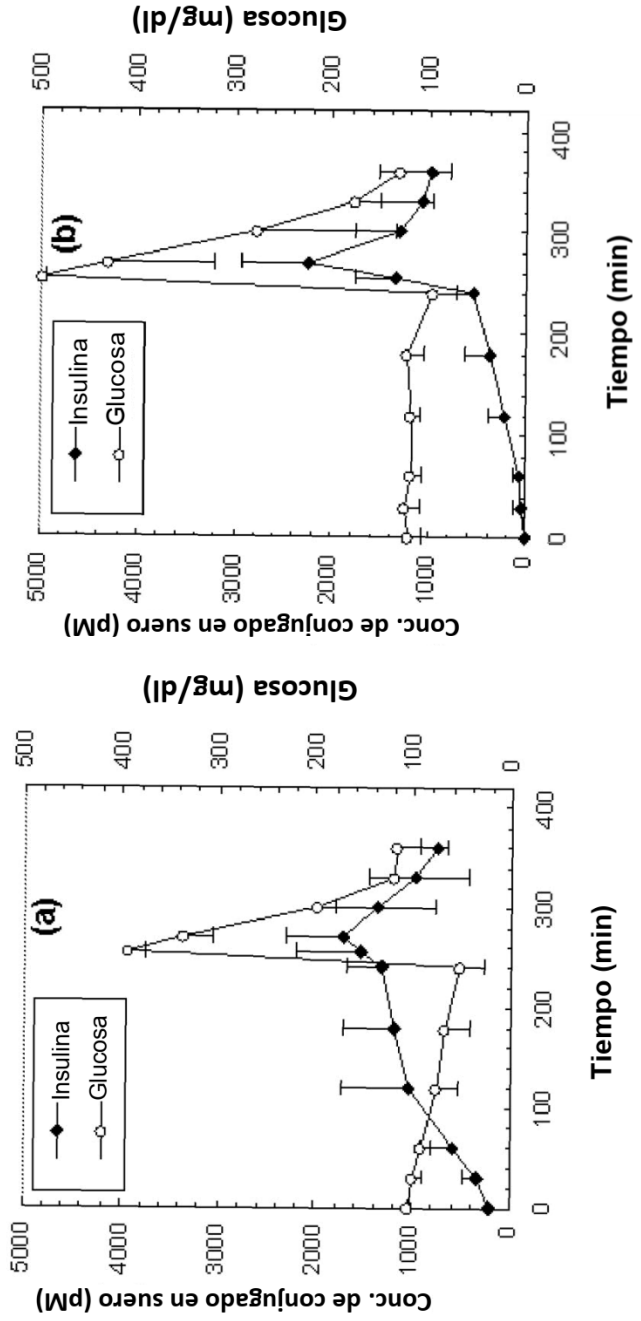

(a)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

Figura 35

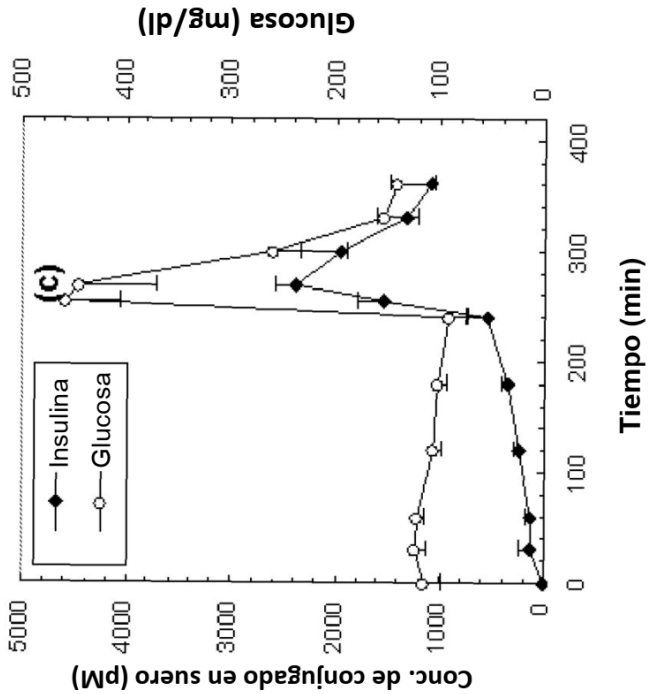


Figura 35 (continuación)

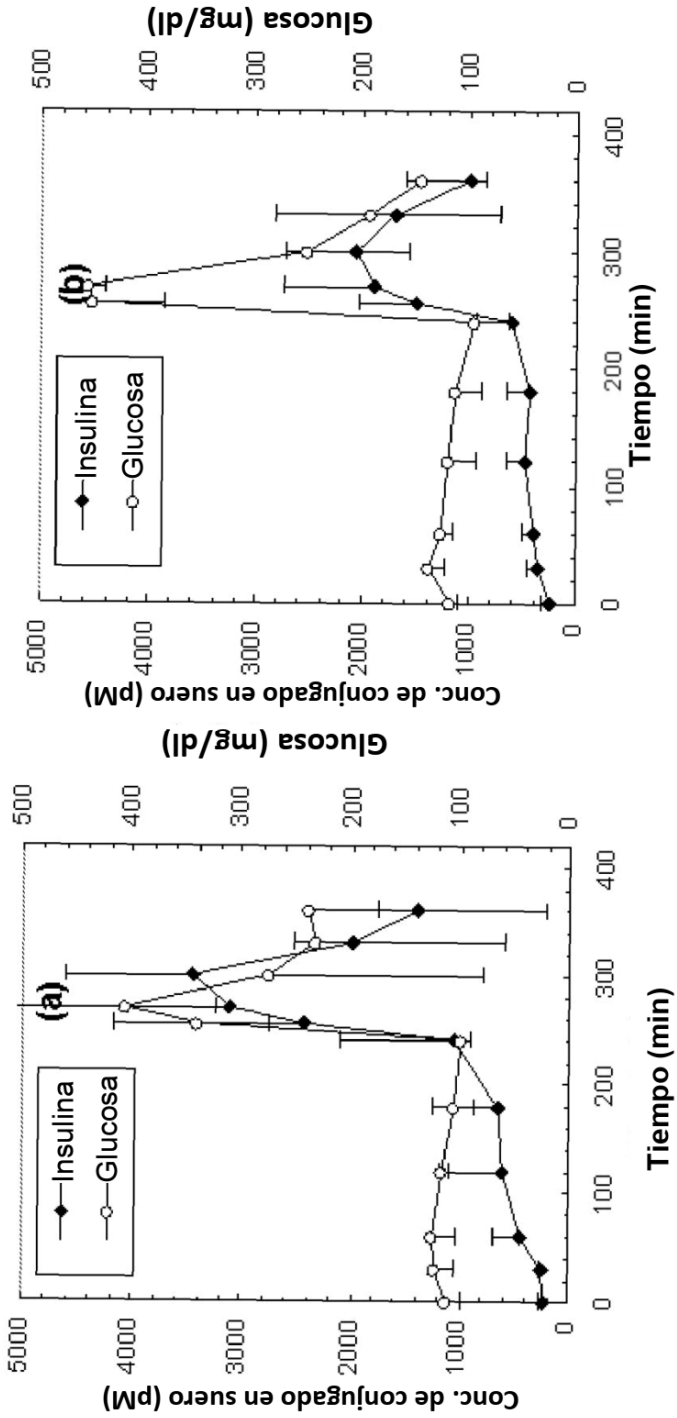

(a)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

Figura 36

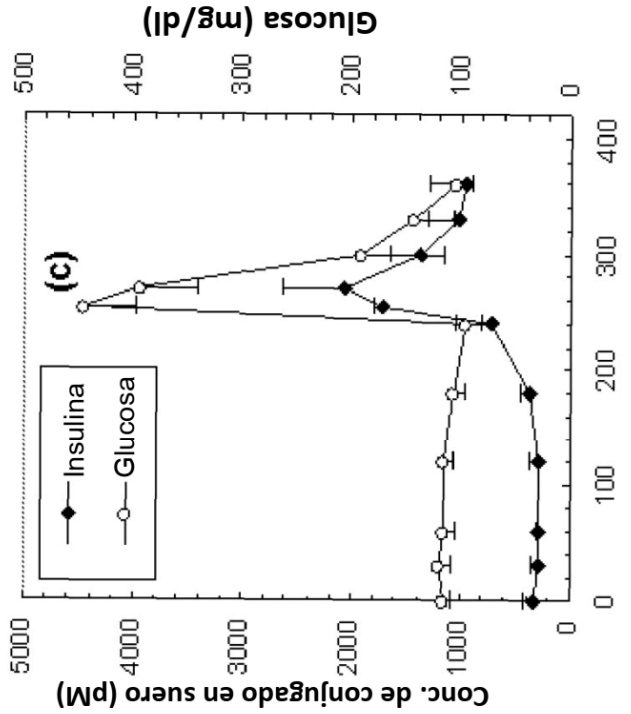


Figura 36 (continuación)

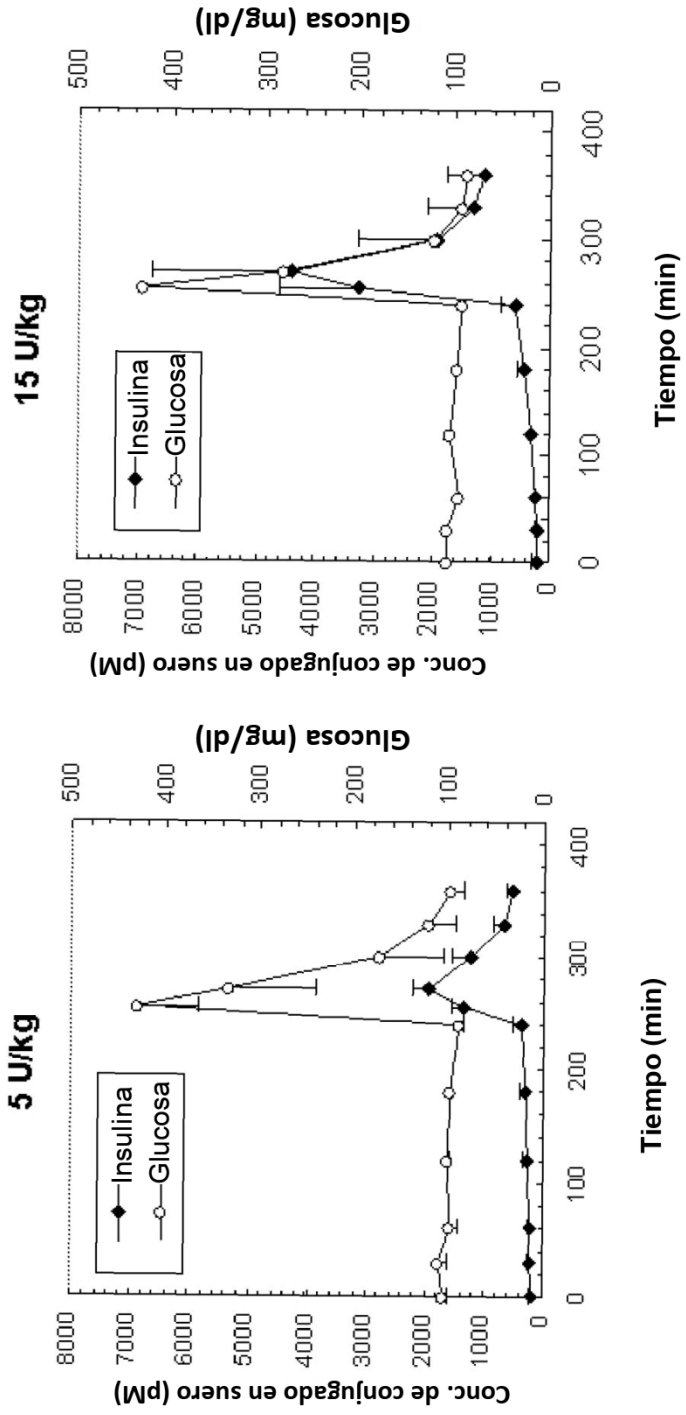

5 U/kg
15 U/kg
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
100
200
300
400
500

Figura 37

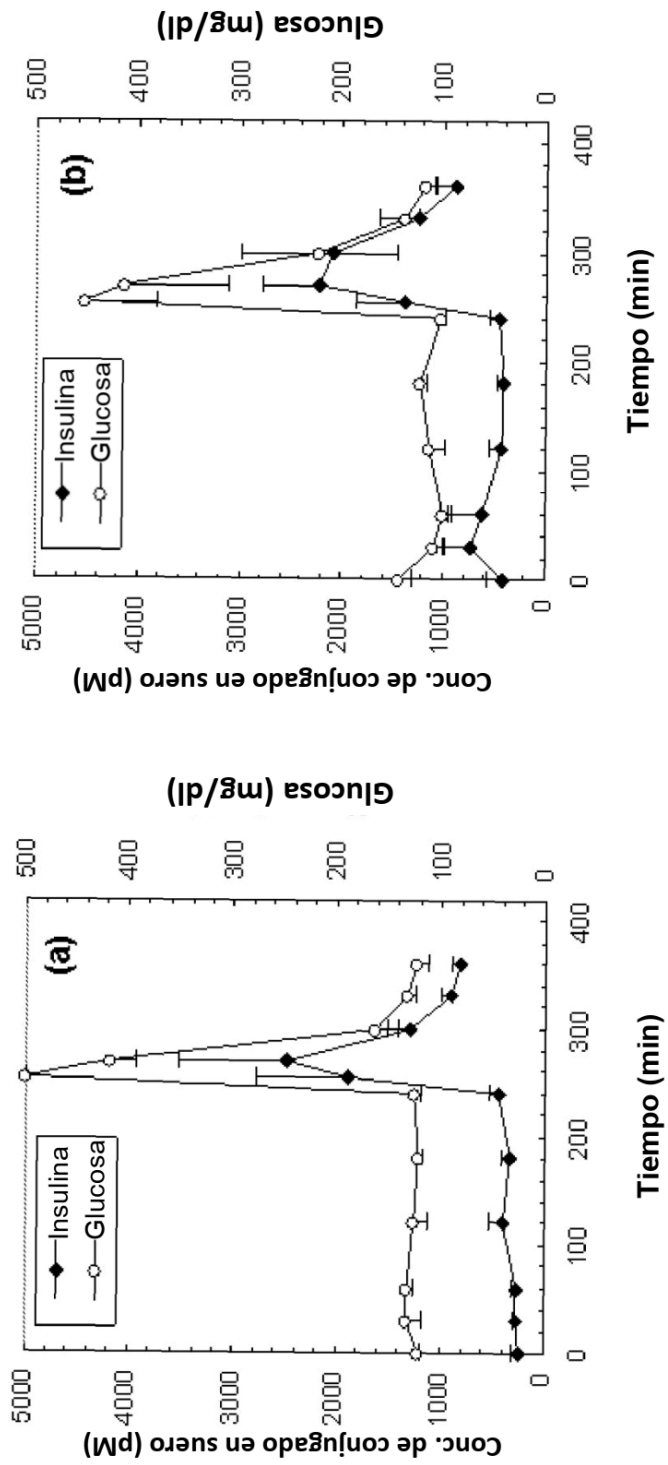

(a)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

Figura 38

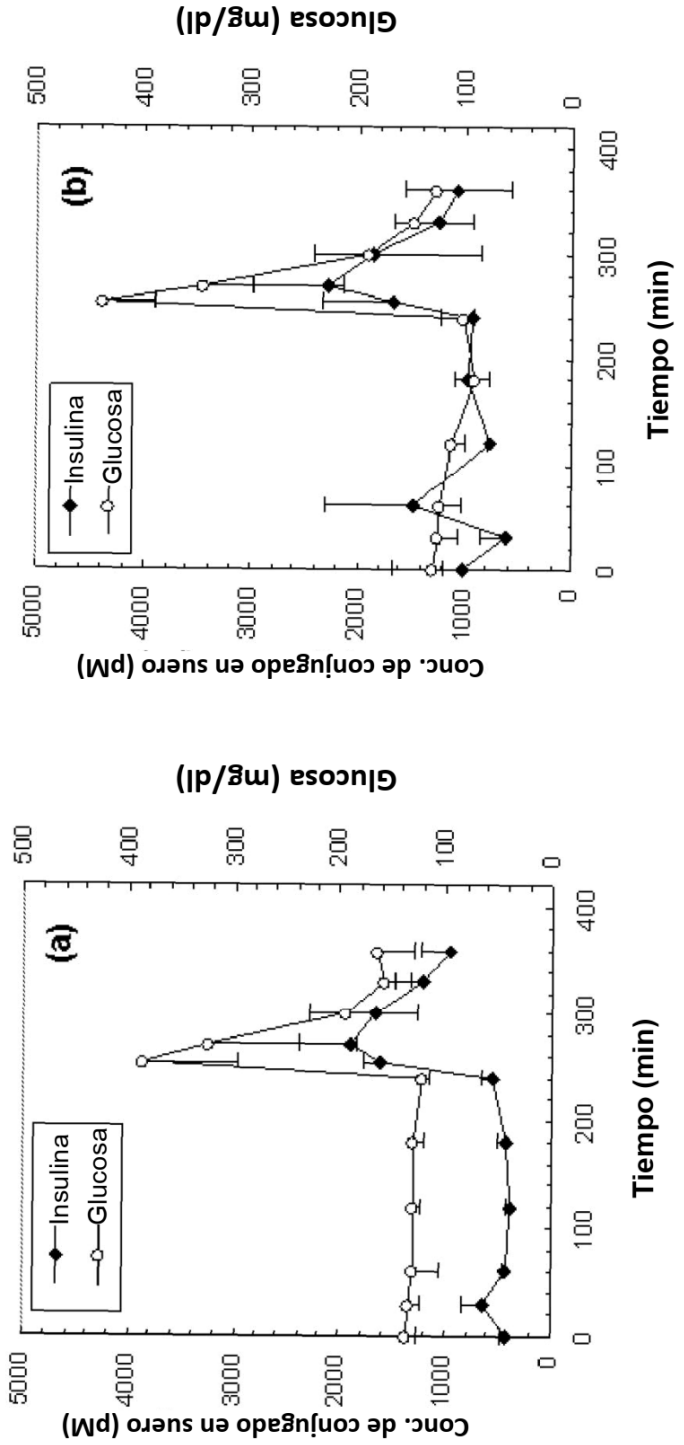
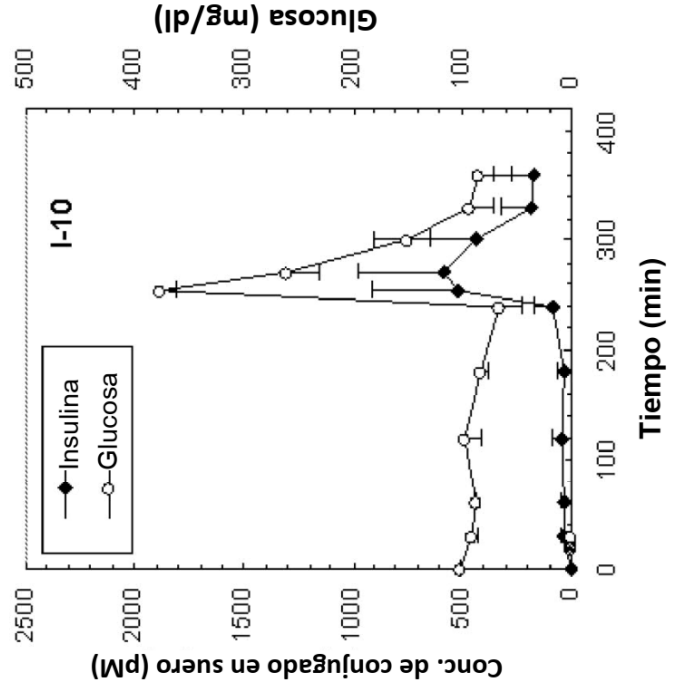

(a)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 39


I-10
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
500
1000
1500
2000
2500
100
200
300
400

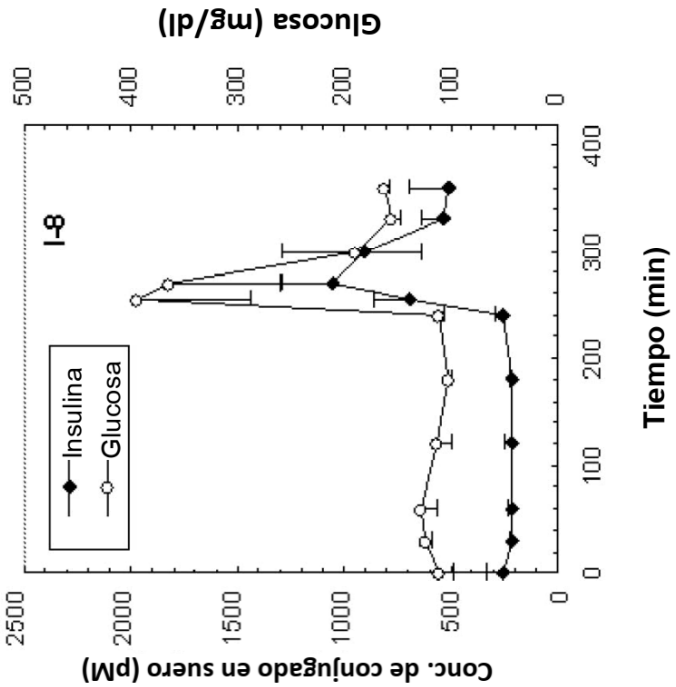

I-8
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
500
1000
1500
2000
2500
100
200
300
400

Figura 40

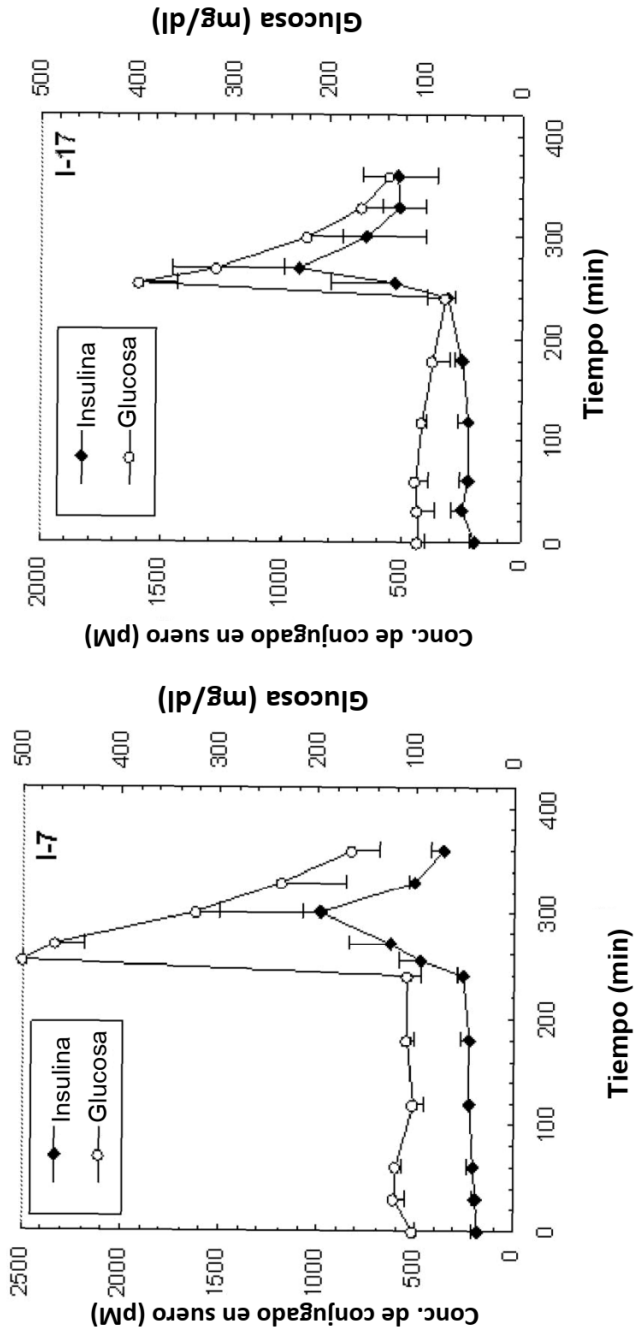


Figura 40 (continuación)

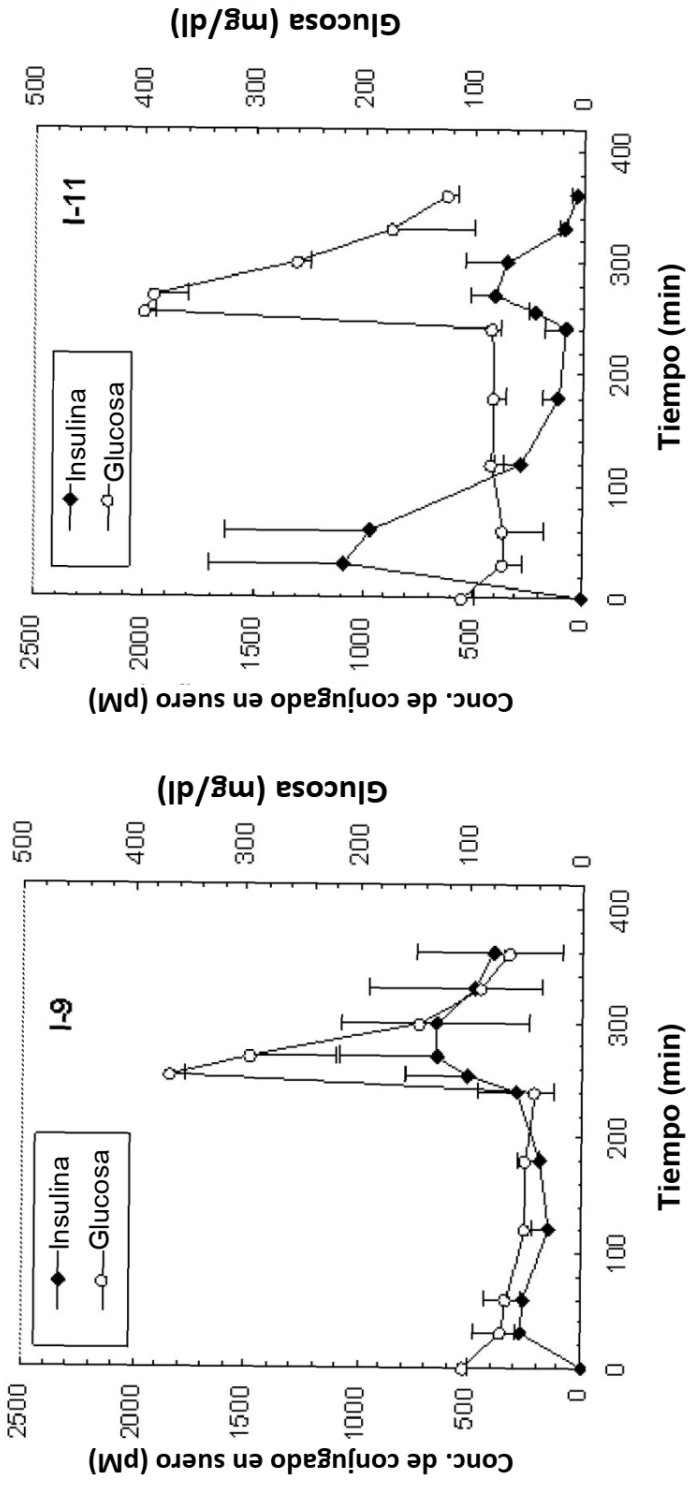


Figura 40 (continuación)

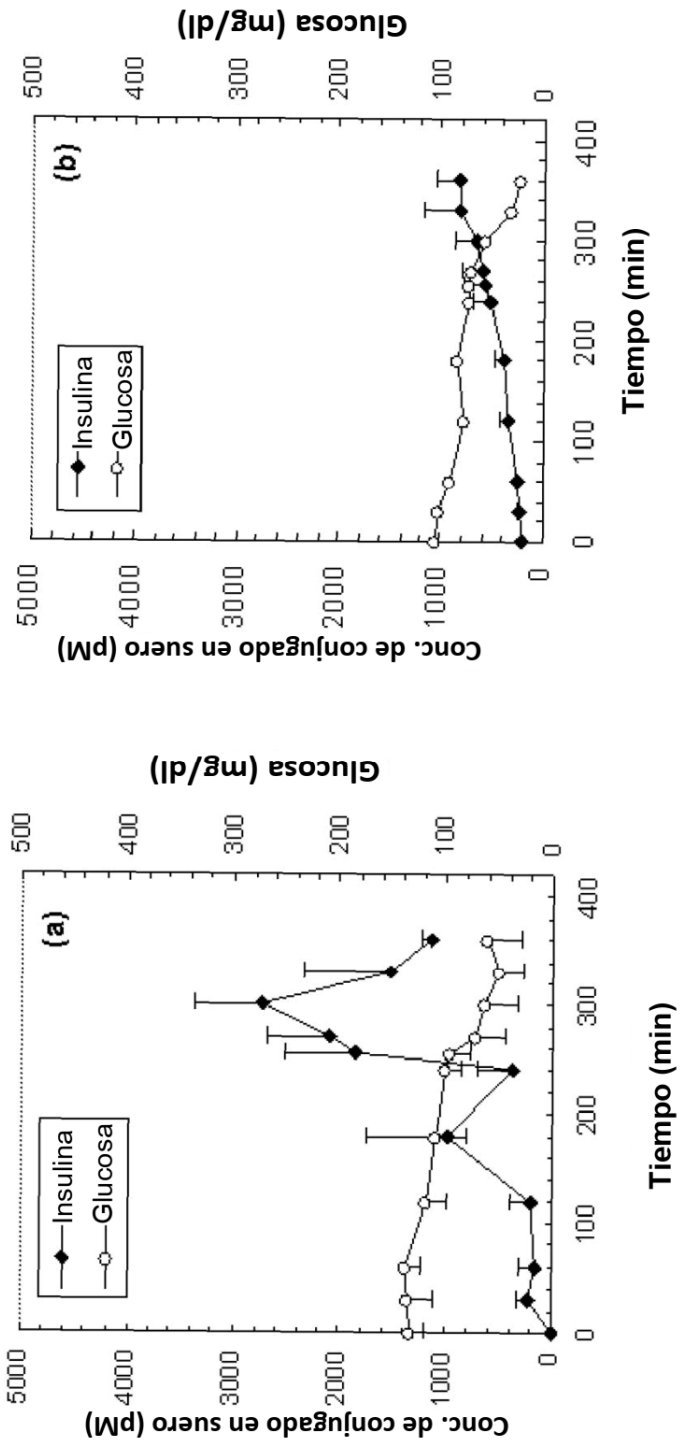

(a)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 41

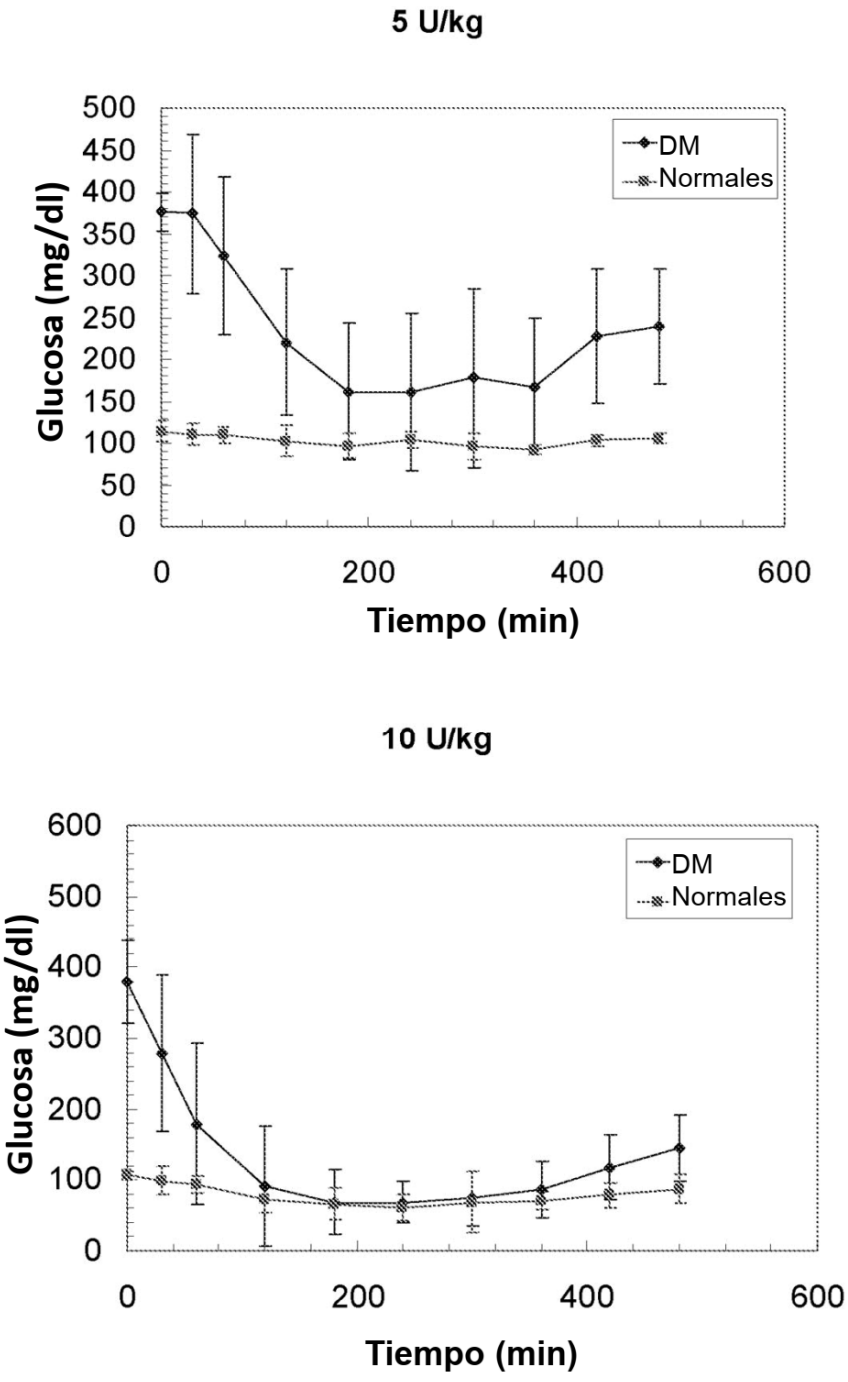

5 U/kg
Glucosa (mg/dl)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
200
400
600
Tiempo (min)
DM
Normales
10 U/kg
Glucosa (mg/dl)
600
500
400
300
200
100
0
0
200
400
600
Tiempo (min)
DM
Normales

Figura 42

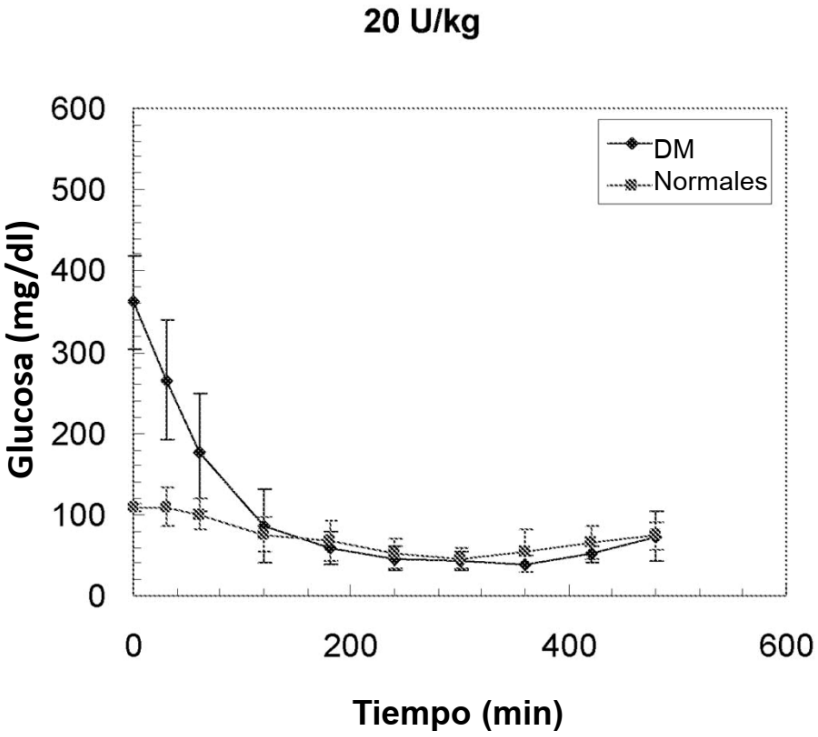


Figura 42 (continuación)

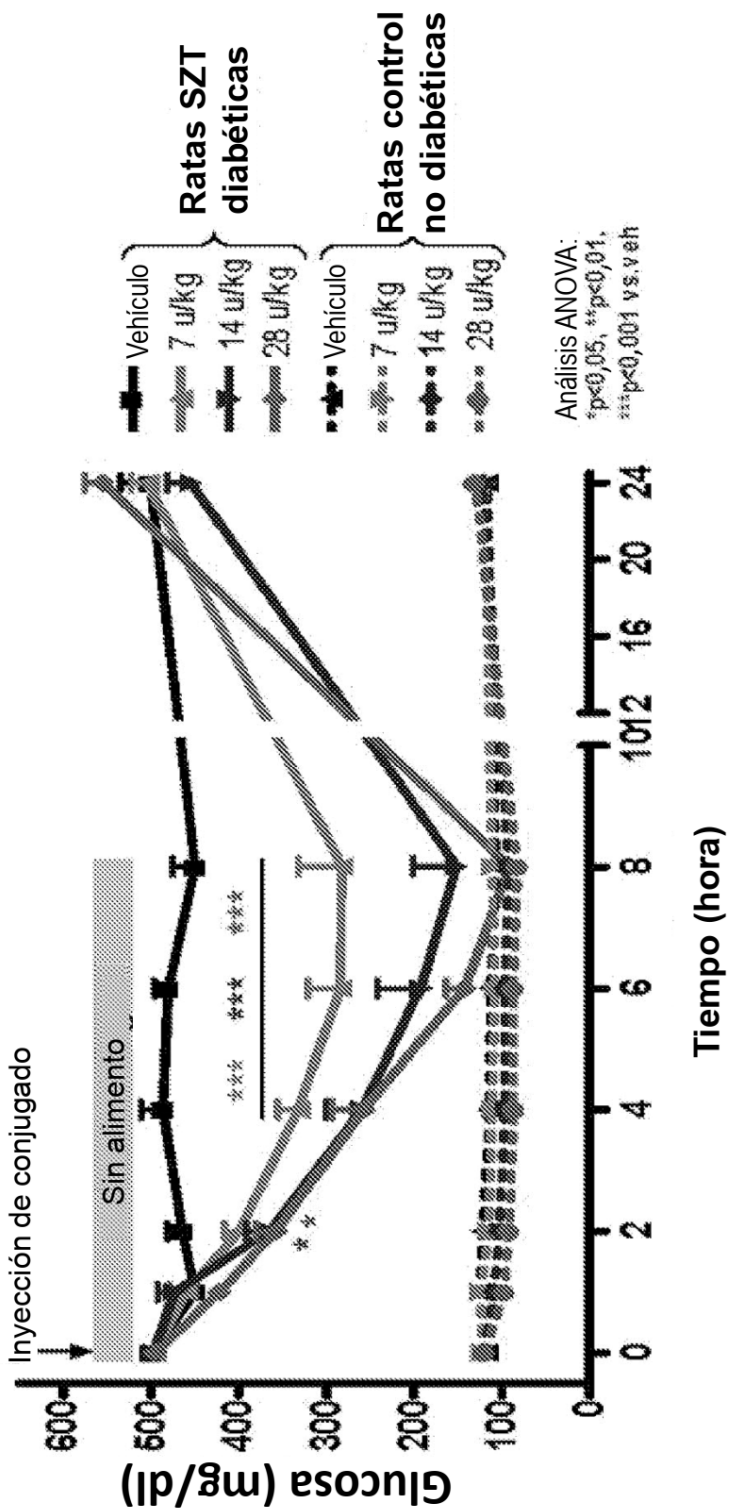

Inyección de conjugado
Sin alimento
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (hora)
Vehiculo
7 u/kg
14 u/kg
28 u/kg
Ratas SZT diabéticas
Vehiculo
7 u/kg
14 u/kg
28 u/kg
Ratas control no diabéticas
Análisis ANOVA:
*p<0,05, **p<0,01,
***p<0,001 vs.veh

Figura 43

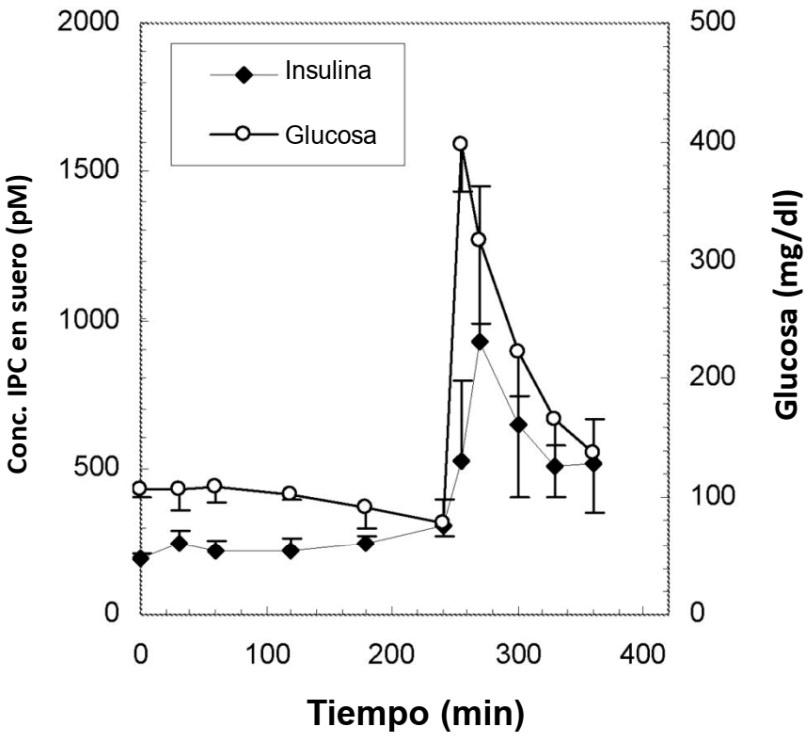
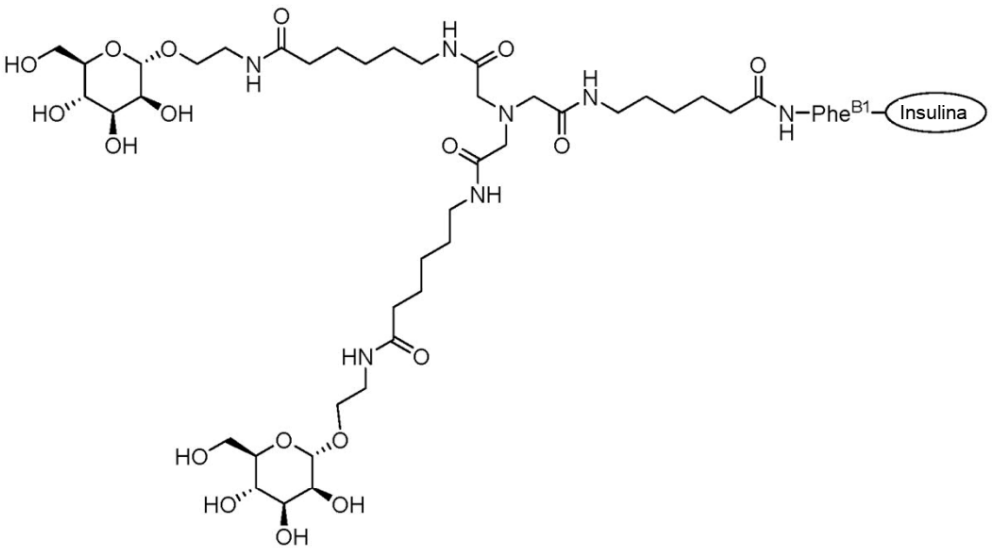
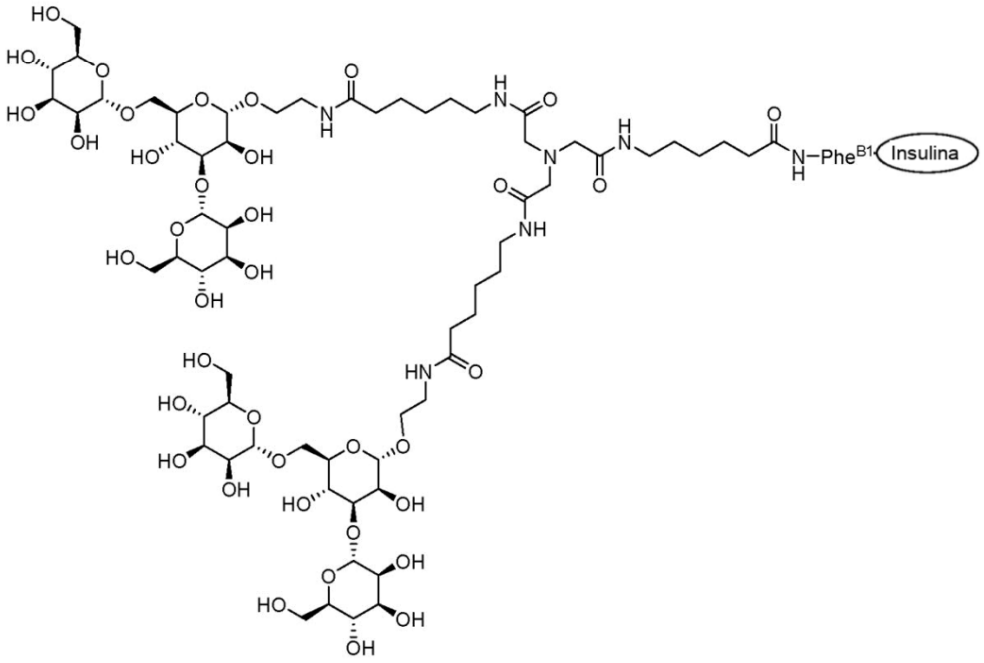

Insulina
Glucosa
Conc. IPC en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
2000
1500
1000
500
0
500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400

Figura 44

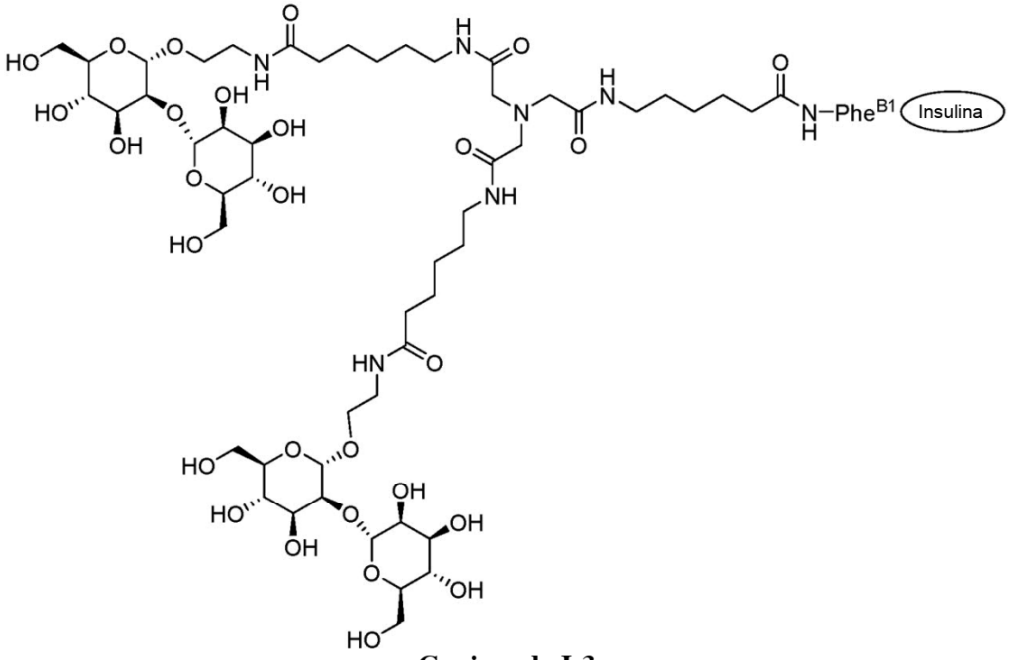


Conjugado I-1
TSAT-C6-AEM-2 (B1)

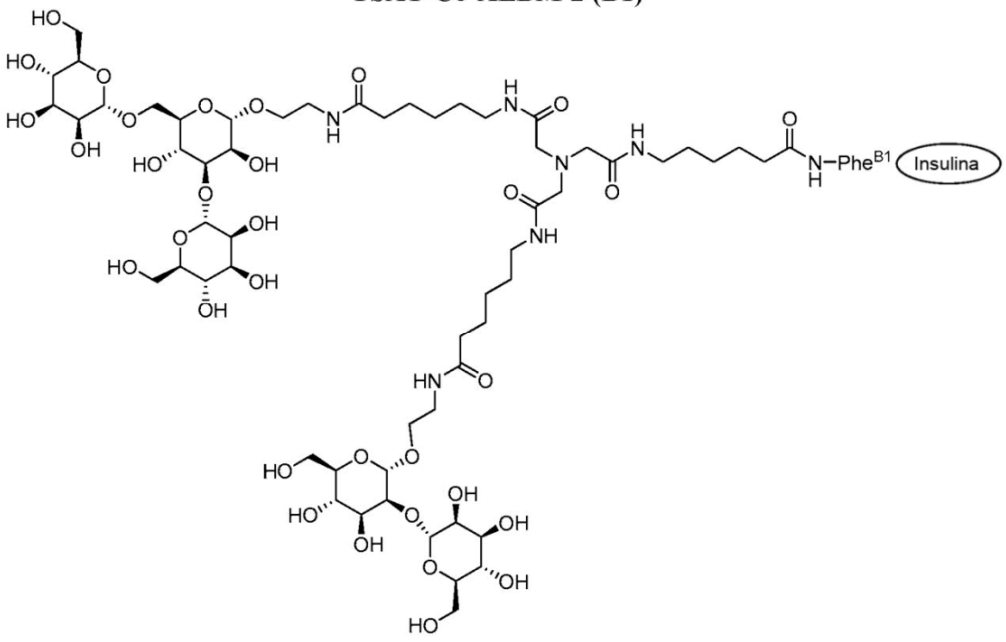


Conjugado I-2
TSAT-C6-AETM-2 (B1)

Figura 45

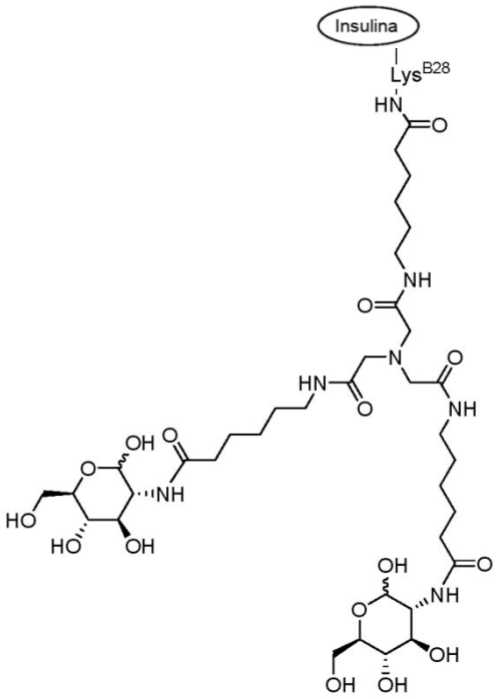


Conjugado I-3
TSAT-C6-AEBM-2 (B1)



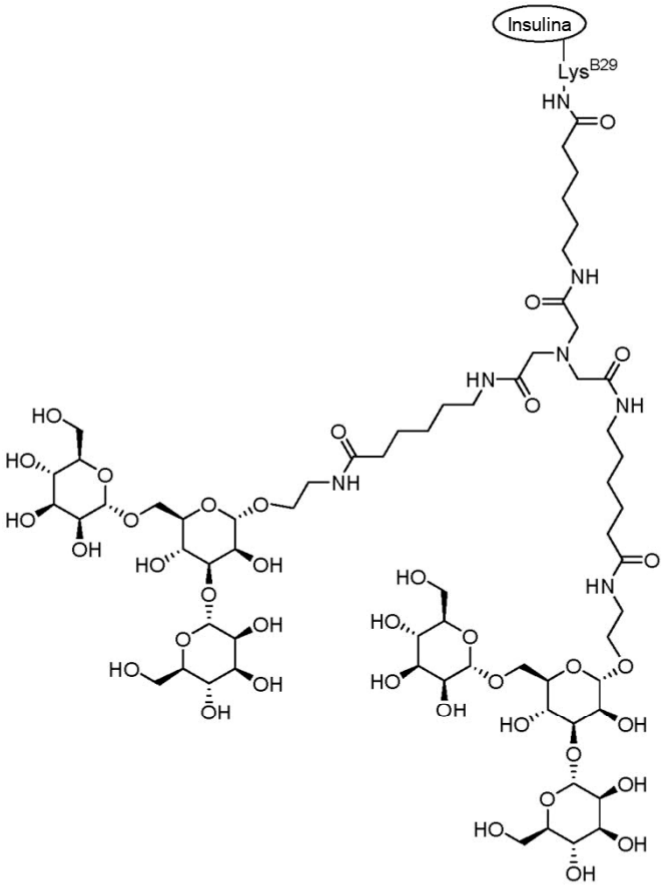
Conjugado I-4
TSAT-C6-AEBM-1-AETM-1 (B1)

Figura 45 (continuación)



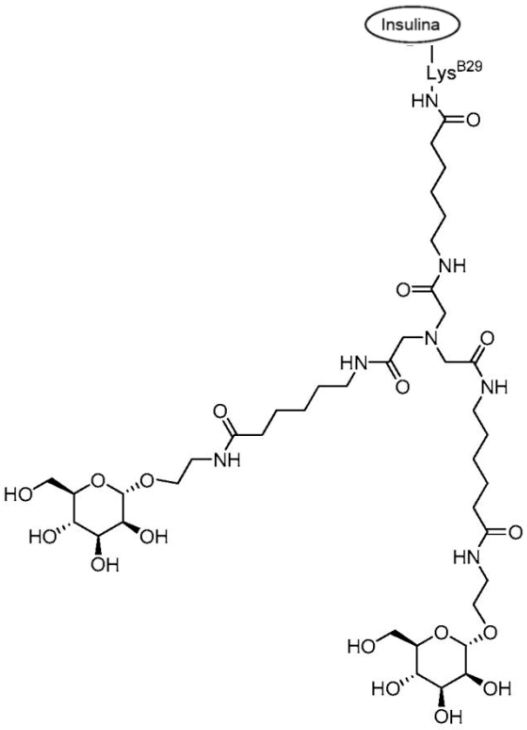
Conjugado I-5
TSAT-C6-GA-2 (B29)

Figura 45 (continuación)

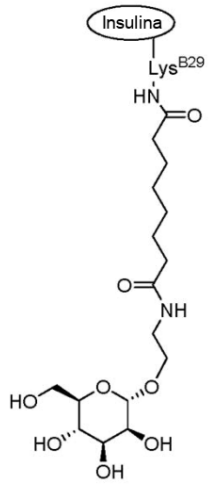


Conjugado I-6
TSAT-C6-AETM-2 (B29)

Figura 45 (continuación)

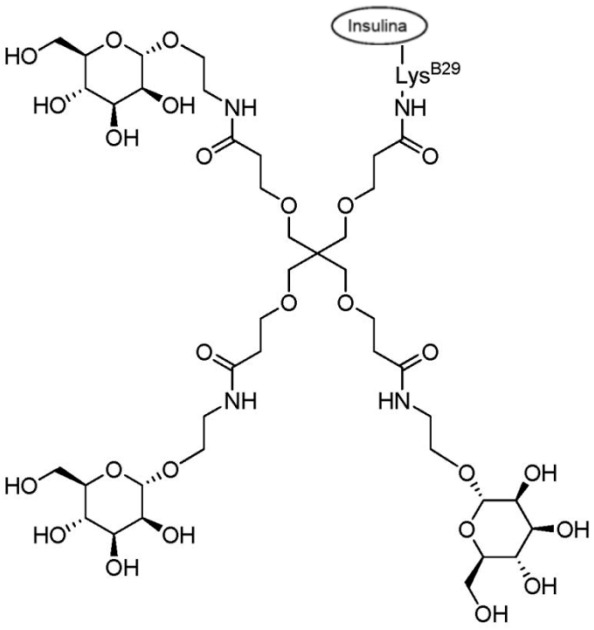


Conjugado I-7
TSAT-C6-AEM-2 (B29)

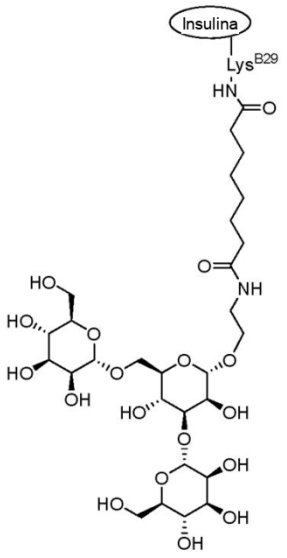


Conjugado I-8
DSS-AEM-1 (B29)

Figura 45 (continuación)

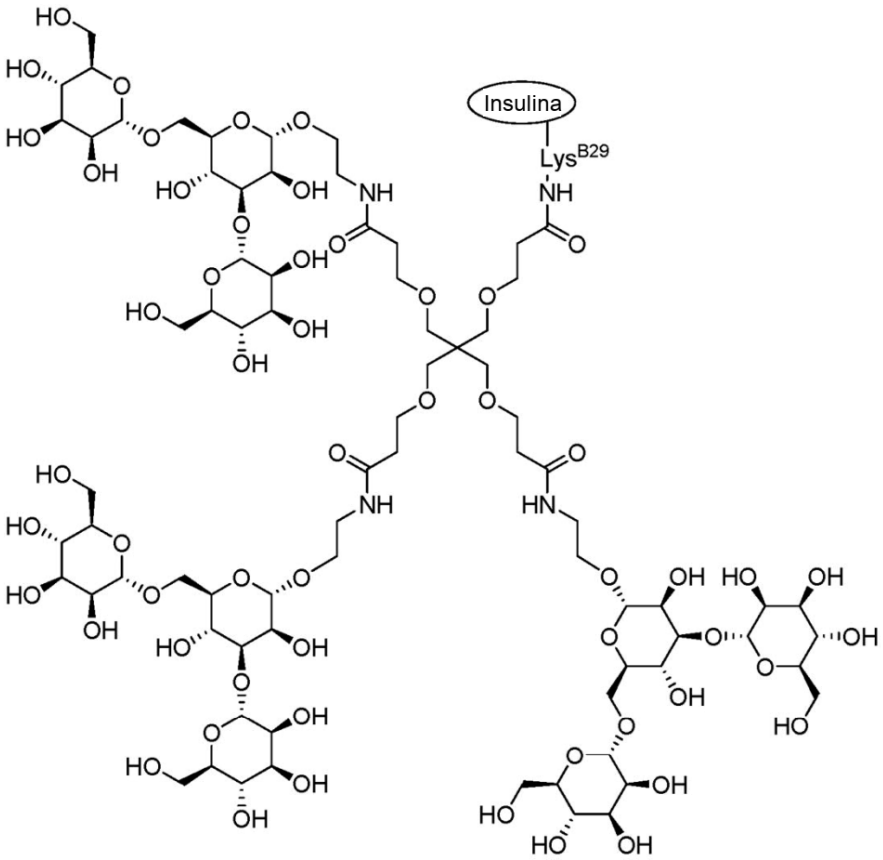


Conjugado I-9
TSPE-AEM-3 (B29)



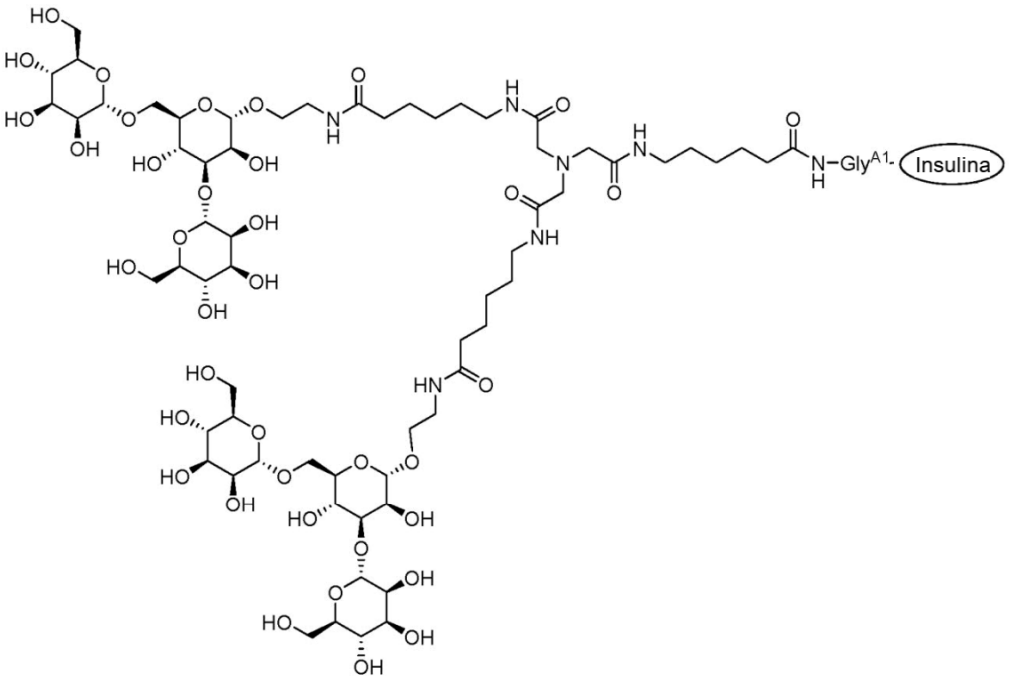
Conjugado I-10
DSS-AETM-1 (B29)

Figura 45 (continuación)

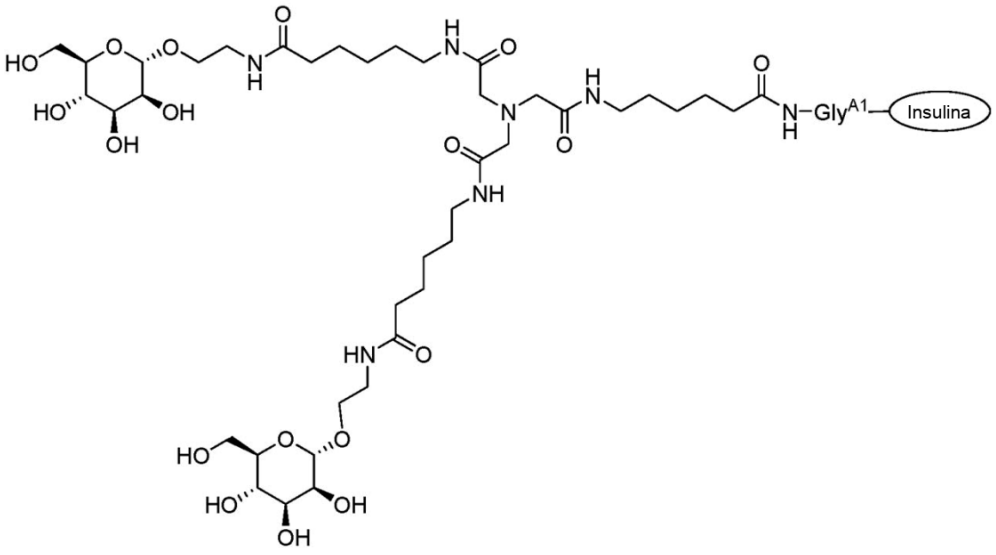


Conjugado I-11
TSPE-AETM-3 (B29)

Figura 45 (continuación)

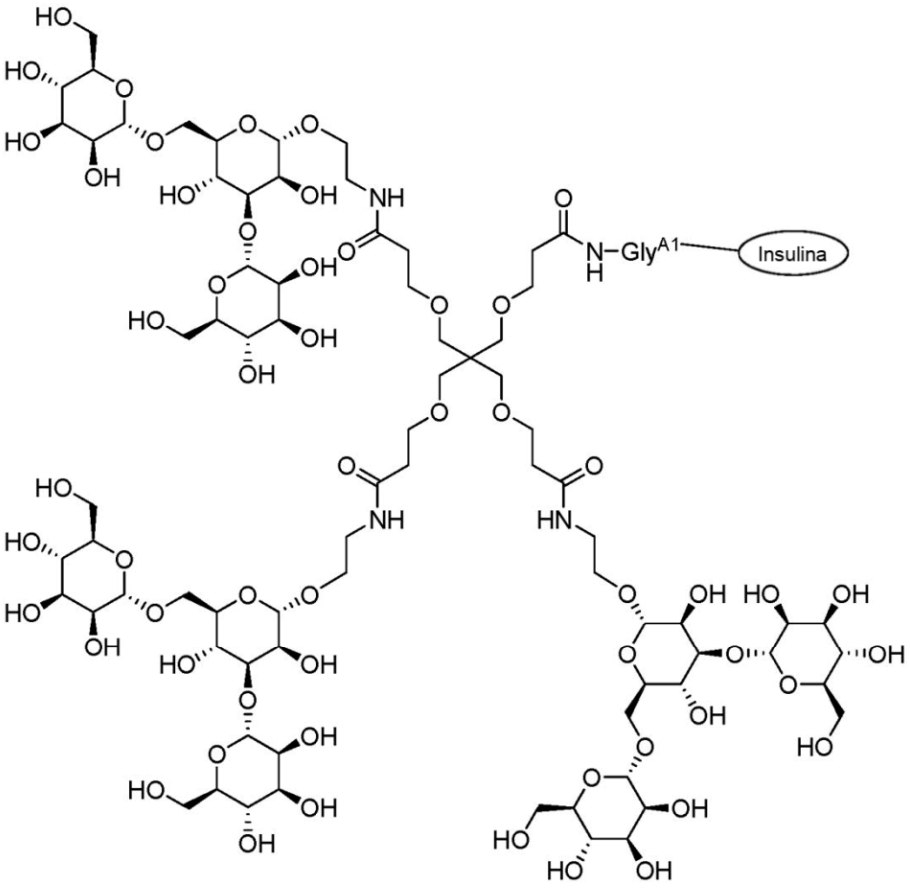


Conjugado I-12
TSAT-C6-AETM-2 (A1)



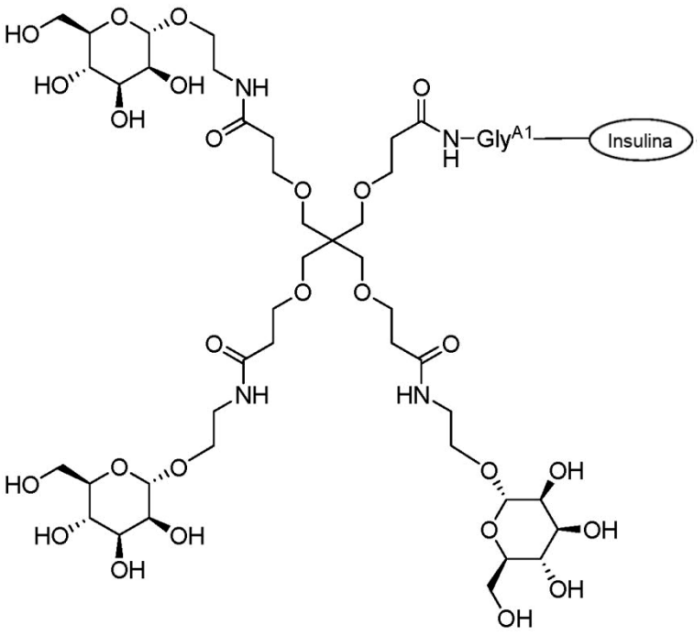
Conjugado I-13
TSAT-C6-AEM-2 (A1)

Figura 45 (continuación)

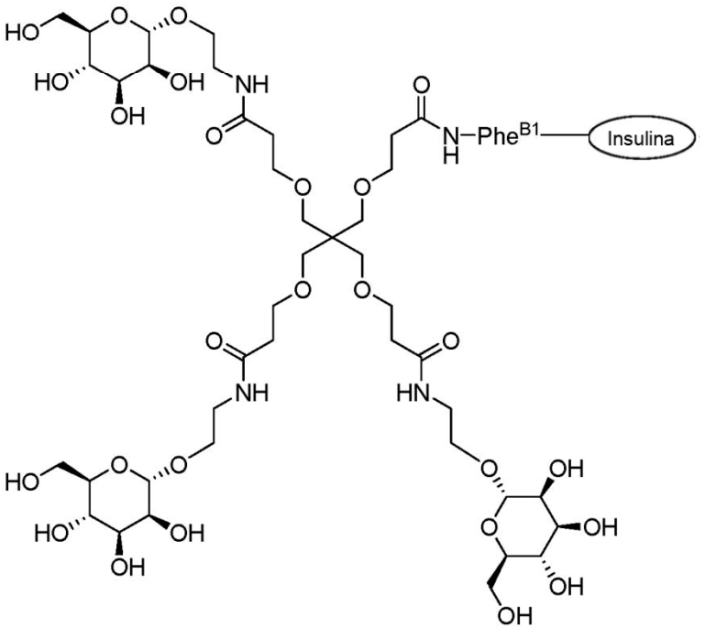


Conjugado I-14
TSPE-AETM-3 (A1)

Figura 45 (continuación)



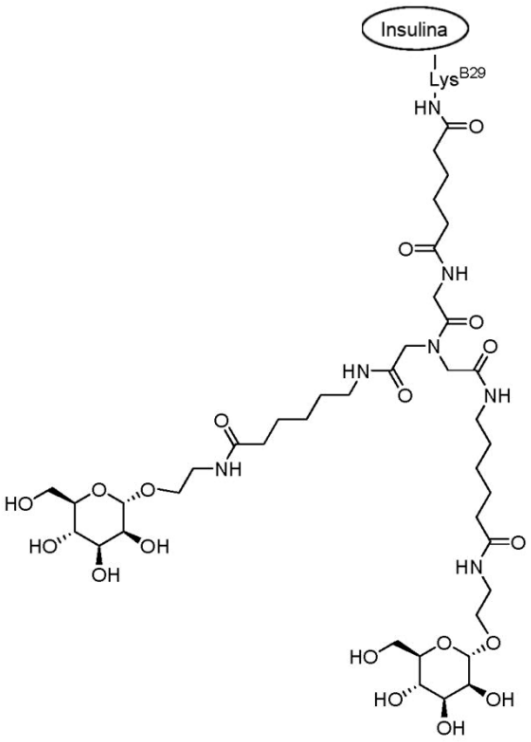
Conjugado I-15
TSPE-AEM-3 (A1)



Conjugado I-16

TSPE-AEM-3 (B1)

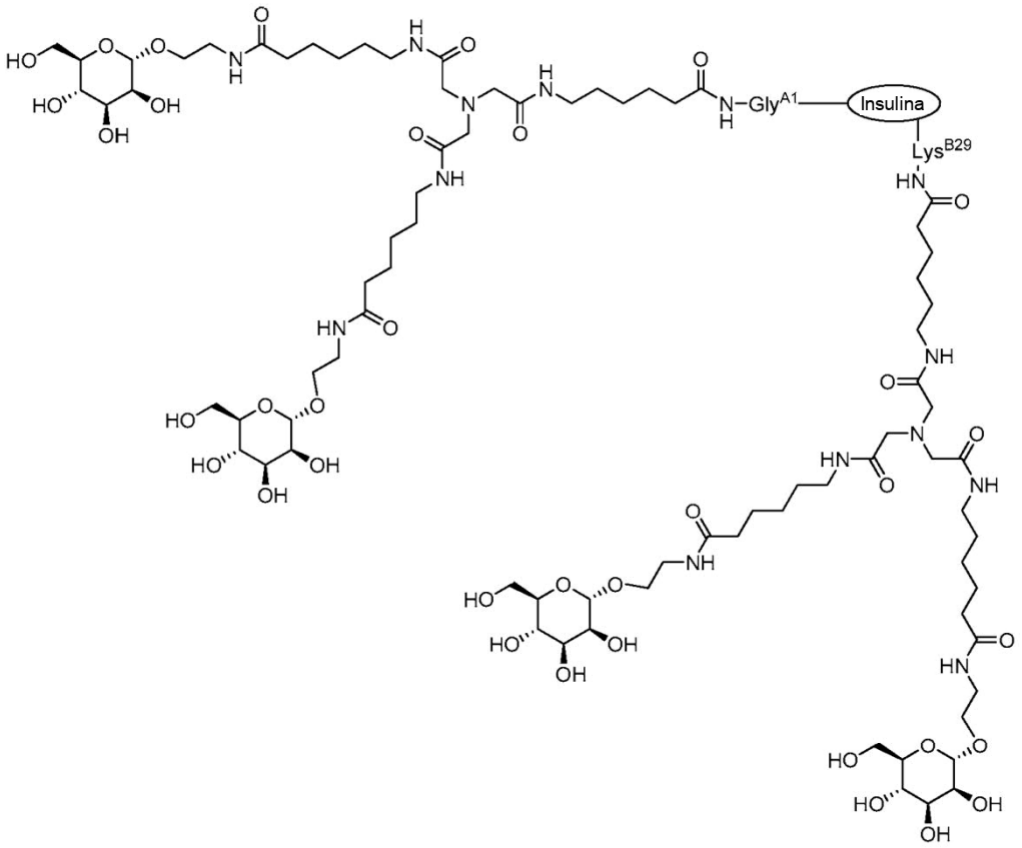
Figura 45 (continuación)



Conjugado I-17

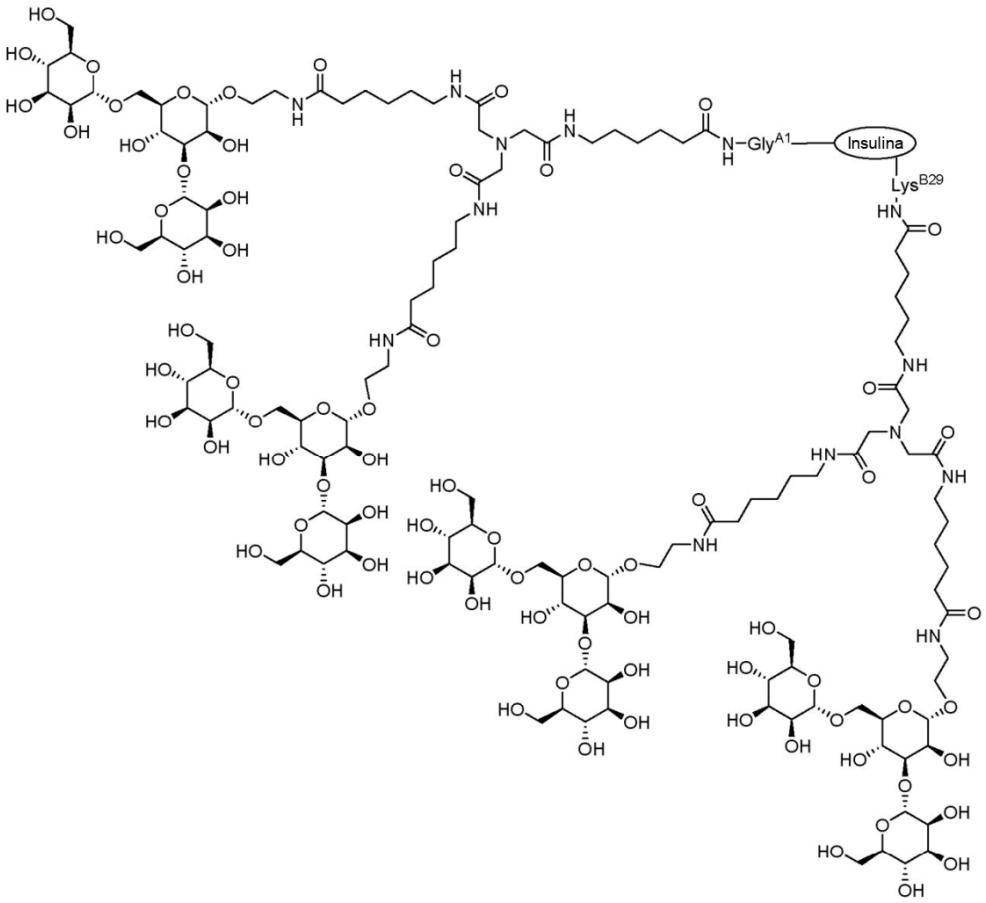
C6-Amide-AEM-2 (B29)

Figura 45 (continuación)



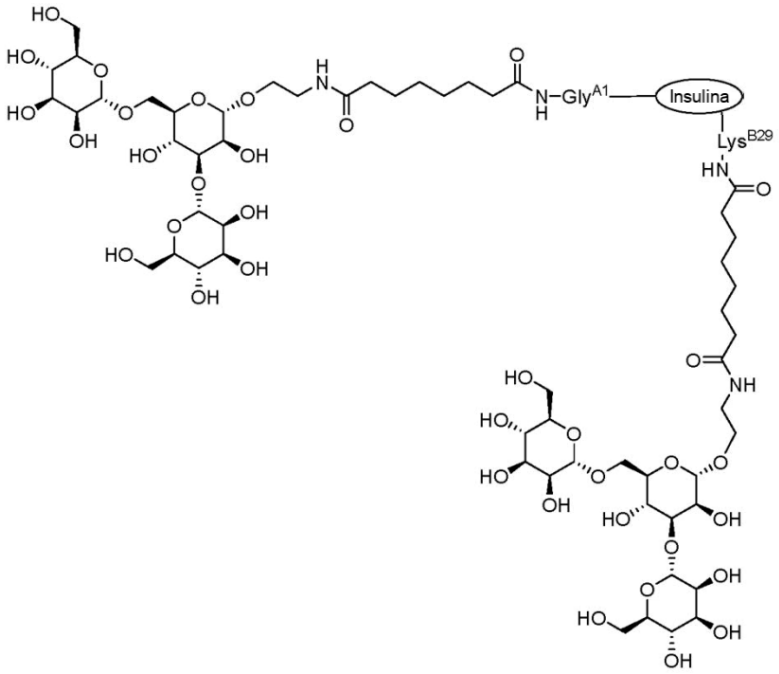
Conjugado II-1
TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (A1,B29)

Figura 45 (continuación)

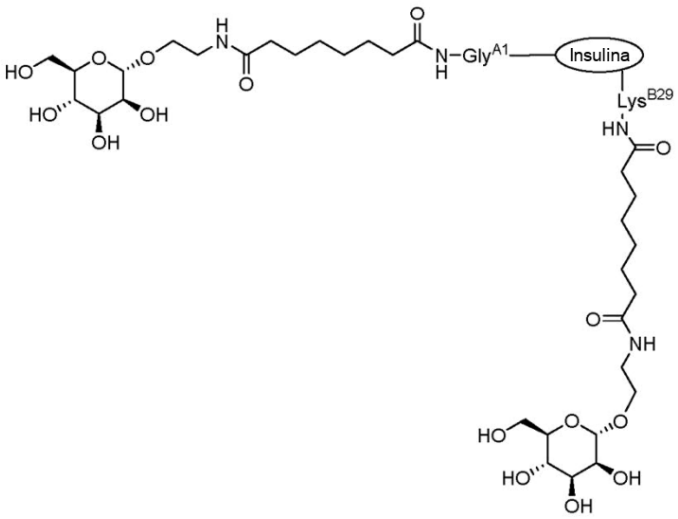


Conjugado II-2
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1,B29)

Figura 45 (continuación)

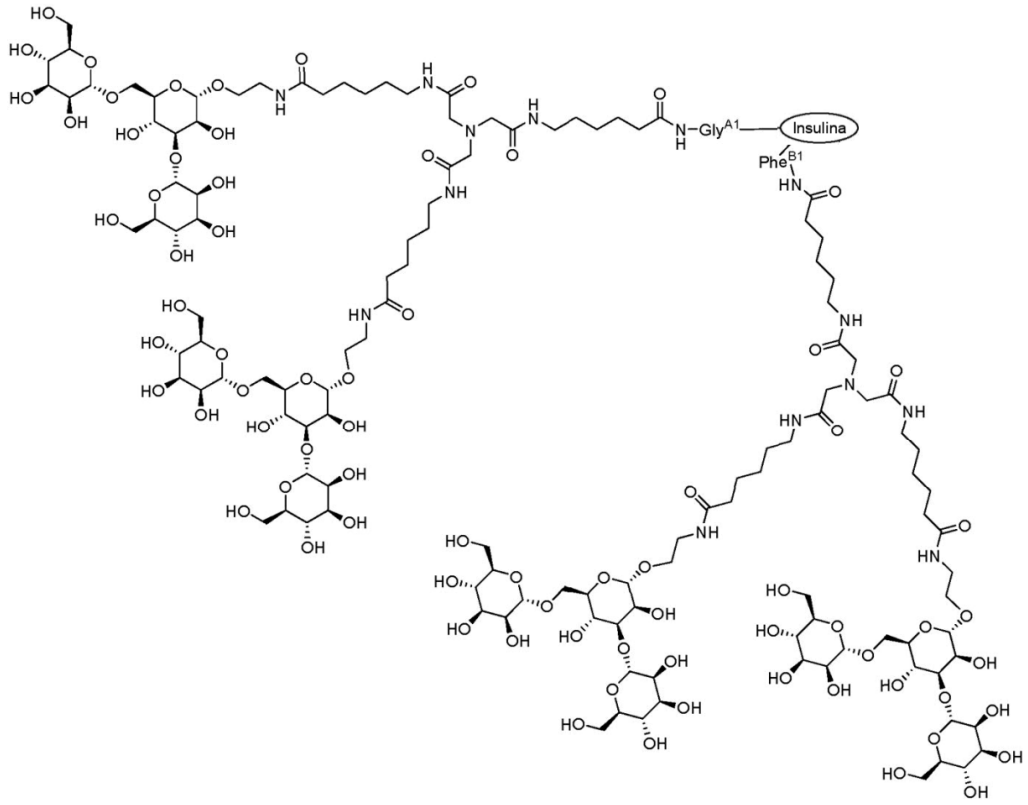


Conjugado II-3
DSS-Di-sub-AETM-1 (A1,B29)



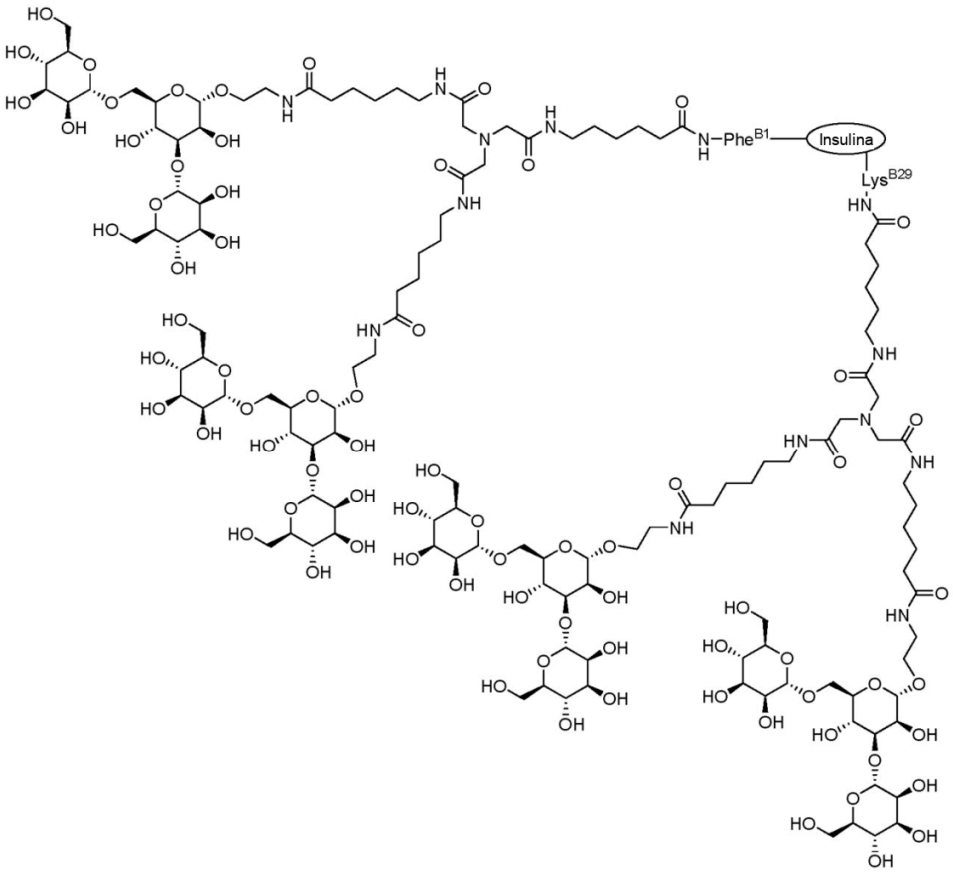
Conjugado II-4
DSS-Di-sub-AEM-1 (A1,B29)

Figura 45 (continuación)



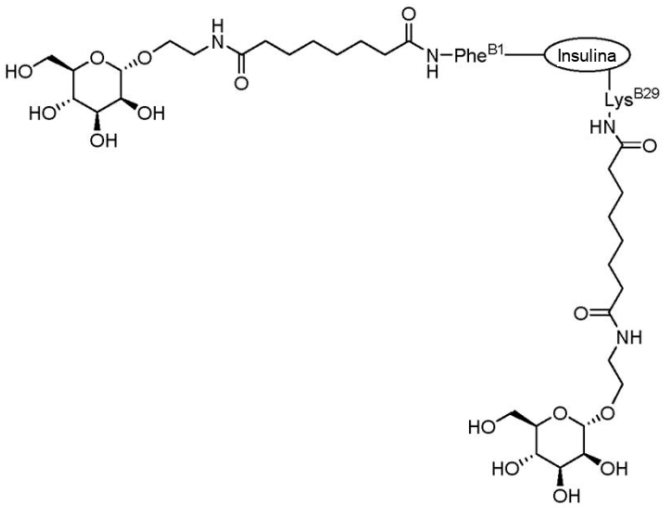
Conjugado II-5
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1,B1)

Figura 45 (continuación)



Conjugado II-6
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (B1,B29)

Figura 45 (continuación)



Conjugado II-7
DSS-Di-sub-AETM-2 (B1,B29)

Figura 45 (continuación)

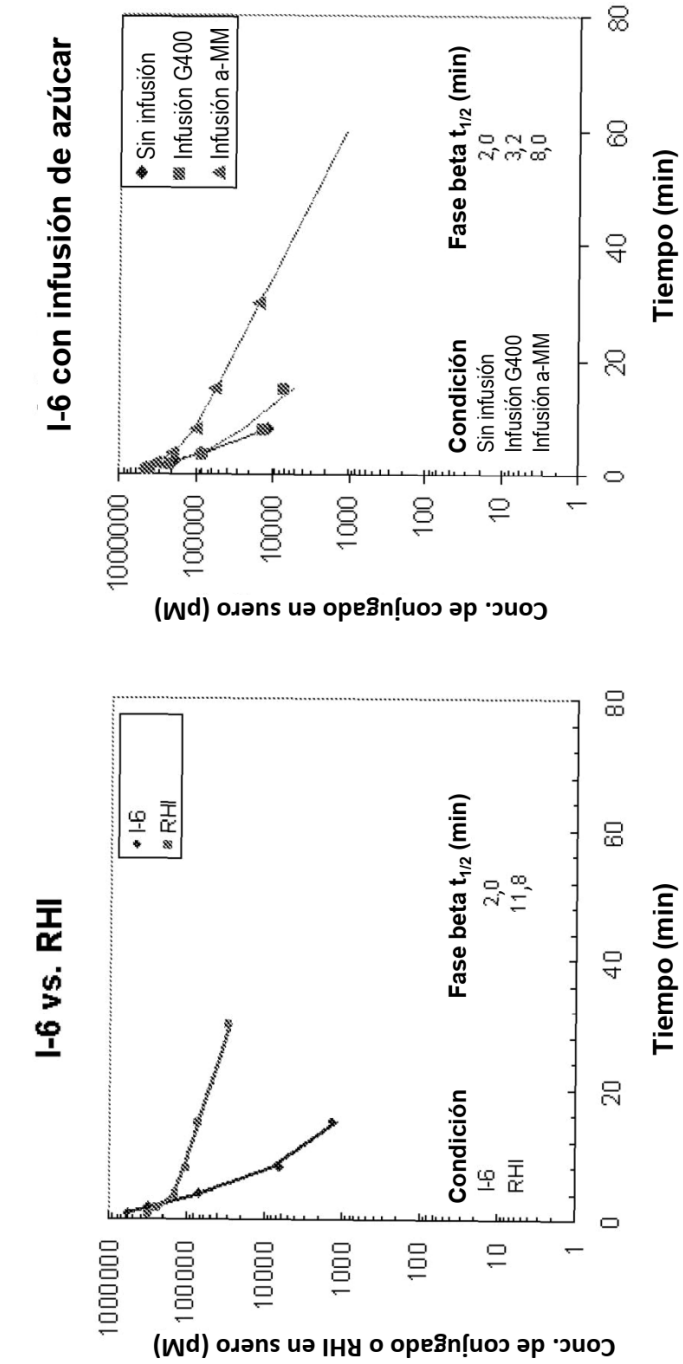

I-6 con infusión de azúcar
Conc. de conjugado en suero (pM)
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
Tiempo (min)
Sin infusión
Infusión G400
Infusión a-MM
Condición
Sin infusión
Infusión G400
Infusión a-MM
Fase beta t1/2 (min)
2,0
3,2
8,0
I-6 vs. RHI
Conc. de conjugado o RHI en suero (pM)
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
Tiempo (min)
I-6
RHI
Condición
I-6
RHI
Fase beta t1/2 (min)
2,0
11,8

Figura 46

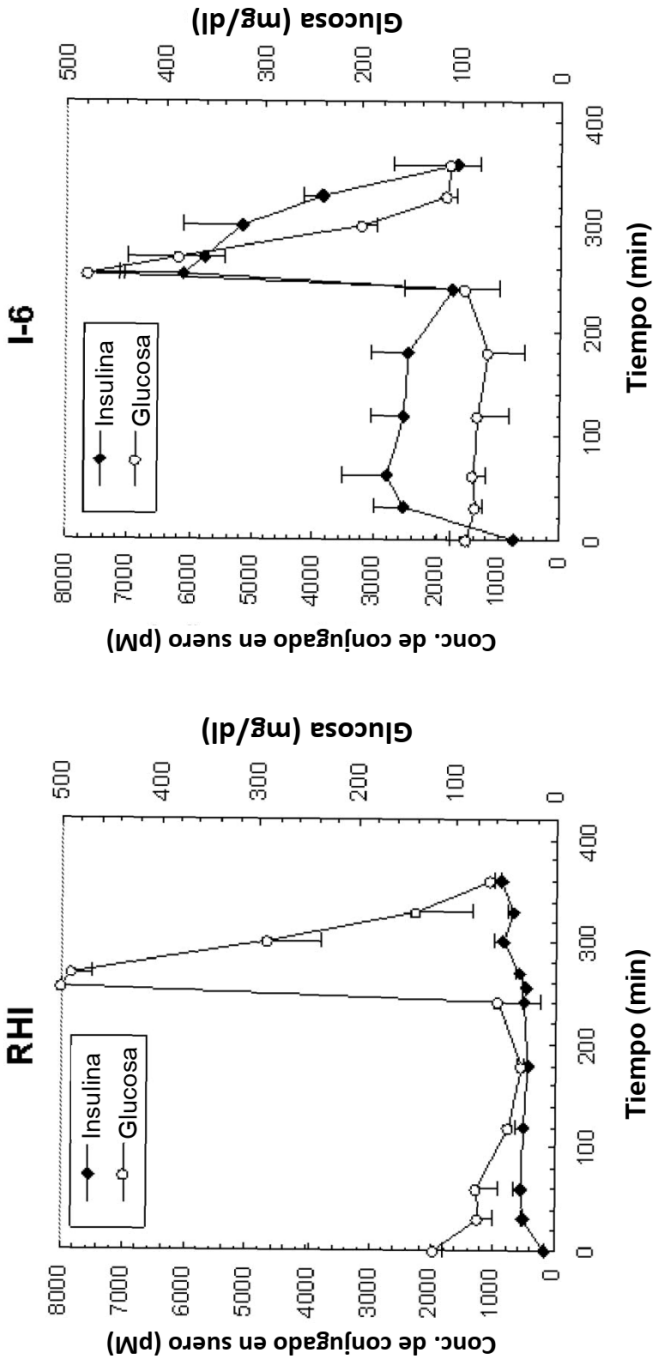

RHI
I-6
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado en suero (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
100
200
300
400
500

Figura 47

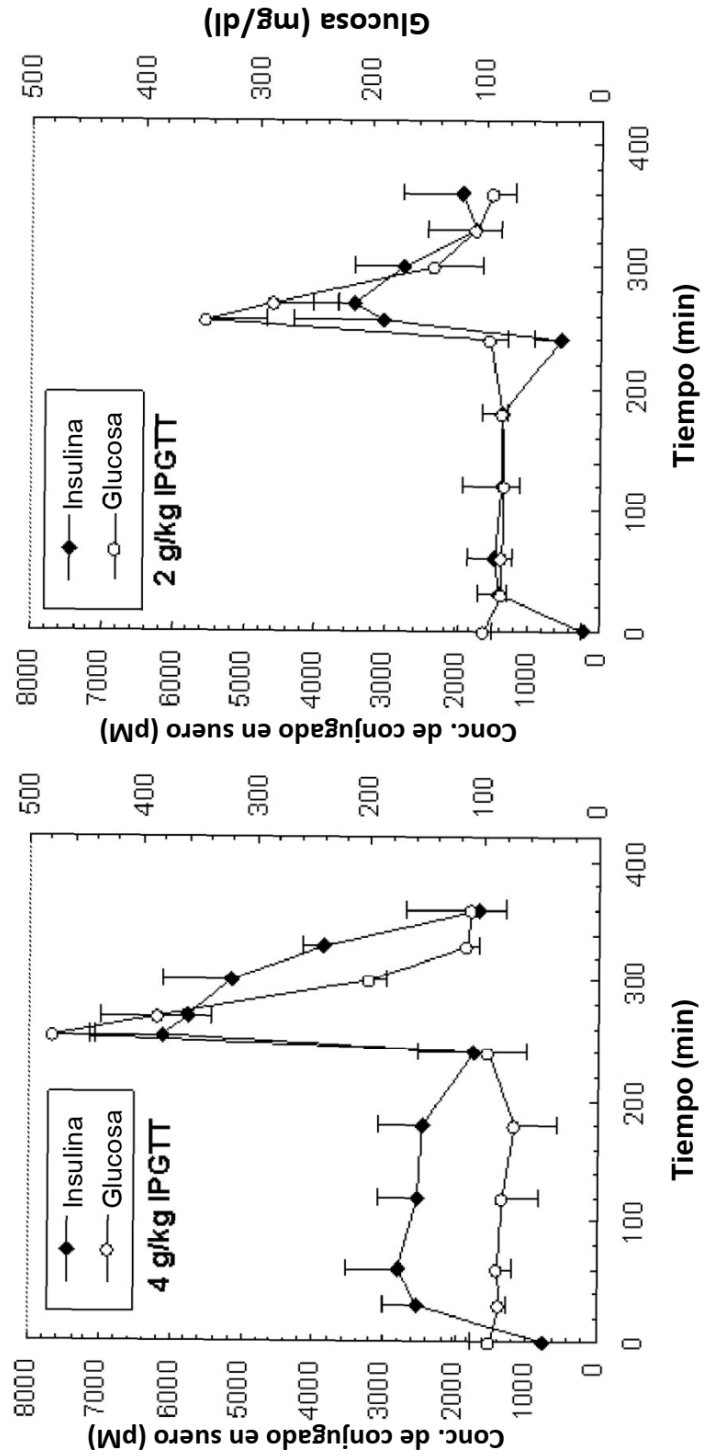


Figura 47 (continuación)

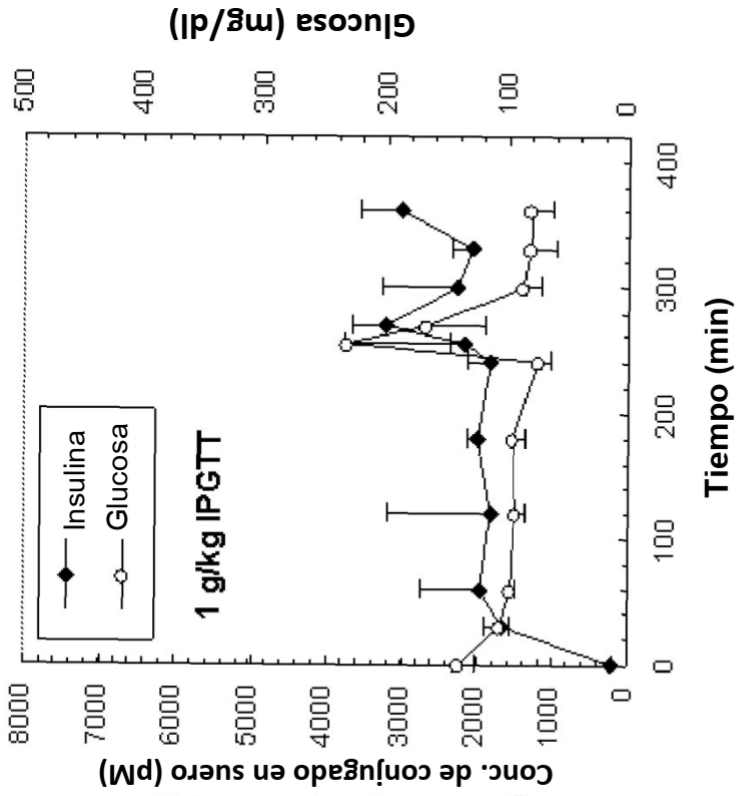
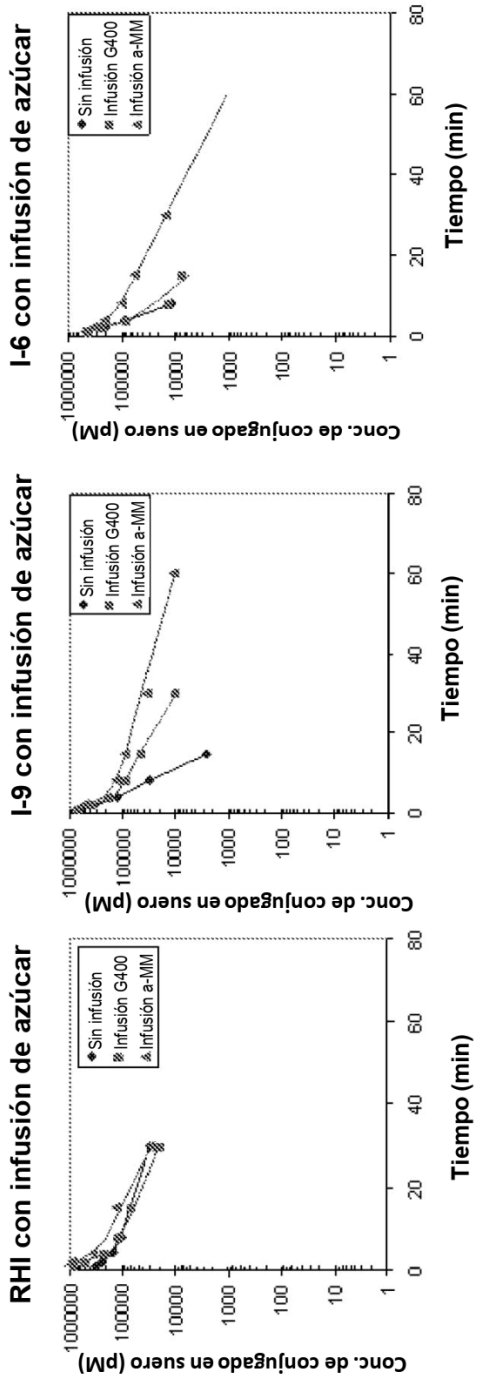


Figura 47 (continuación)

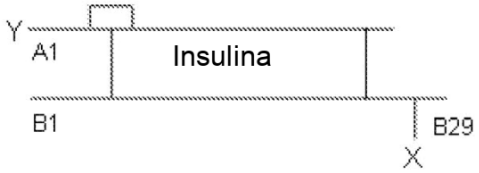


Condición	Fase beta $t_{1/2}$ (min)
Sin infusión	11,8
Infusión G400	8,6
Infusión a-MM	8,0

Condición	Fase beta $t_{1/2}$ (min)
Sin infusión	2,0
Infusión G400	6,9
Infusión a-MM	14,4

Condición	Fase beta $t_{1/2}$ (min)
Sin infusión	2,0
Infusión G400	3,2
Infusión a-MM	8,0

Figura 48



Formulación	Bastidor - X	Bastidor - Y	Azúcar (n)
RHI	n/a	n/a	n/a
I-7: AEM-2	n/a	TSAT-C_6	AEM (2)
I-6: AETM-2	n/a	TSAT-C_6	AETM (2)
I-11: AETM-3	n/a	TSPE	AETM (3)
II-2: Di-sub-AETM-2	TSAT-C_6	TSAT-C_6	AETM (2x2)

Figura 49

	Semivida fase β (min) para cada tipo de infusión		
Formulación	**S. salino**	**Glucosa**	**α-metilmanosa**
RHI	2,7	2,3	3,3
I-7: AEM-2	5,5	5,8	5,4
I-6: AETM-2	4,8	3,3	8,1
I-11: AETM-3	6,7	3,7	10,8
II-2: Di-sub-AETM-2	2,5	n/a	20,3

Figura 50

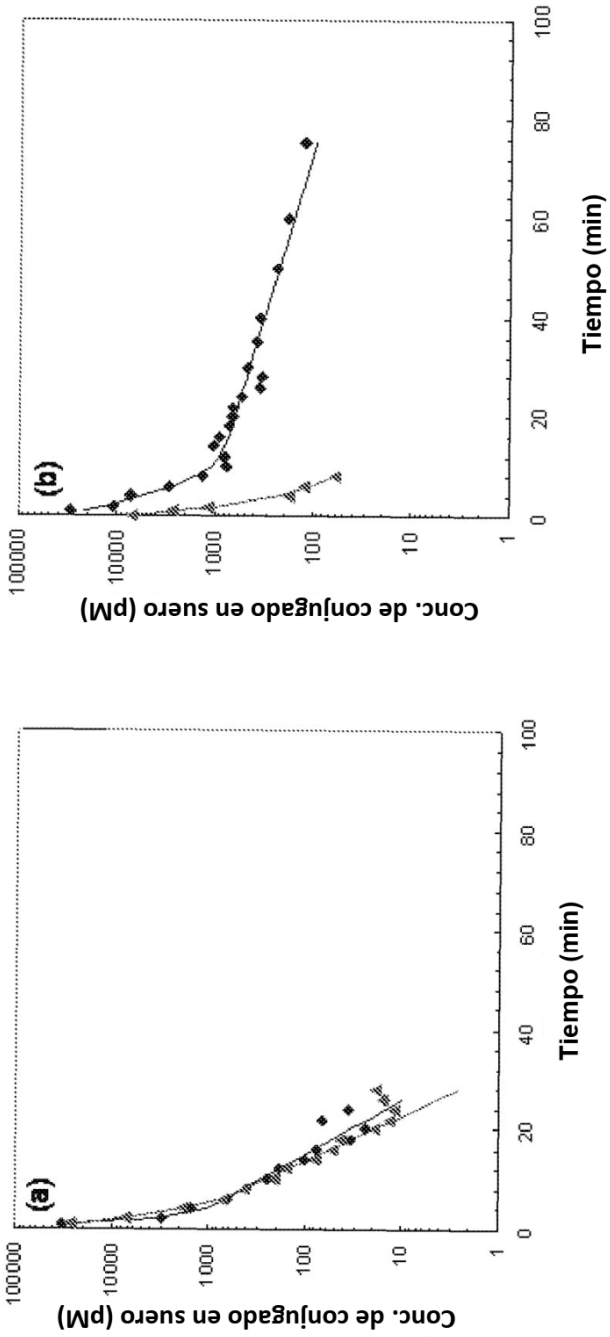

(b)
Conc. de conjugado en suero (pM)
100000
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
Tiempo (min)
(a)
Conc. de conjugado en suero (pM)
100000
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
Tiempo (min)

Figura 51

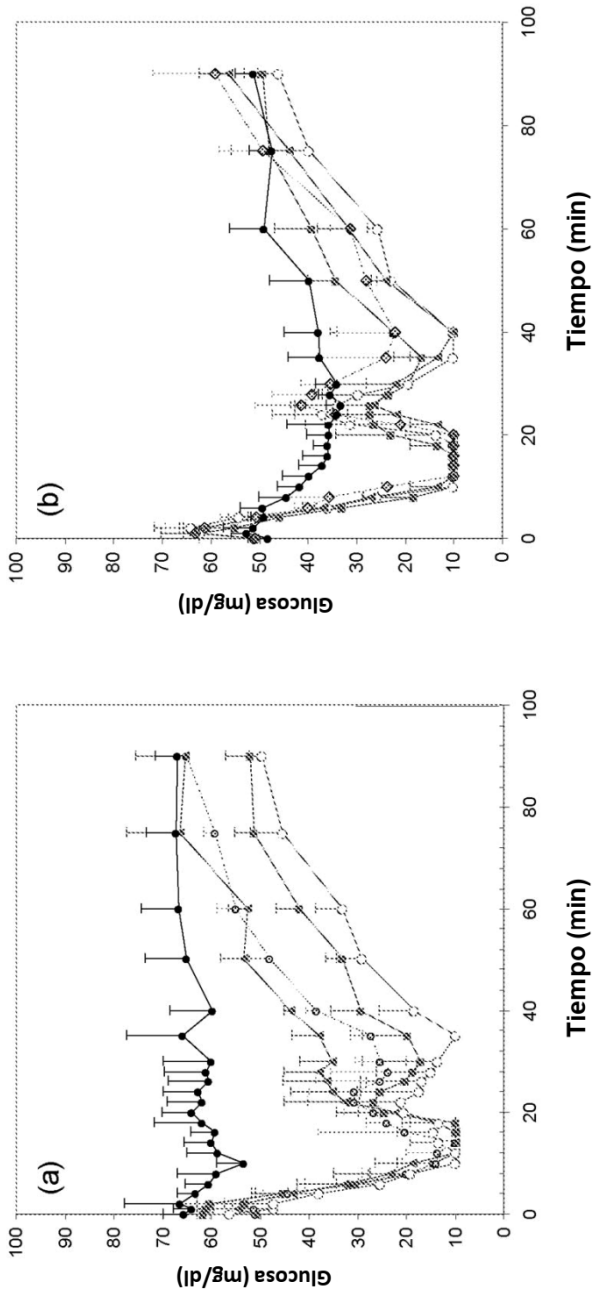

(a)
(b)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
20
40
60
80
100

Figura 52

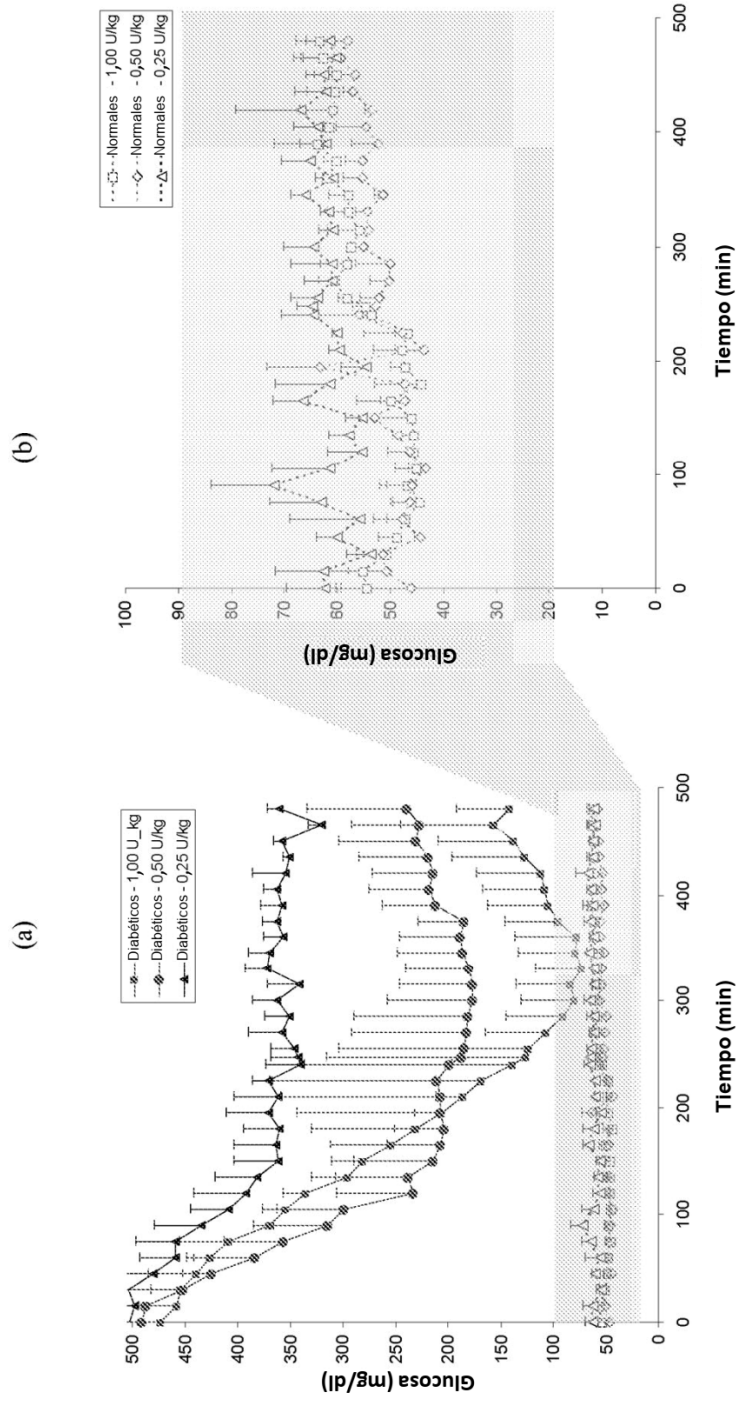

(a)
(b)
Diabéticos - 1,00 U_kg
Diabéticos - 0,50 U/kg
Diabéticos - 0,25 U/kg
Normales - 1,00 U/kg
Normales - 0,50 U/kg
Normales - 0,25 U/kg
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 53

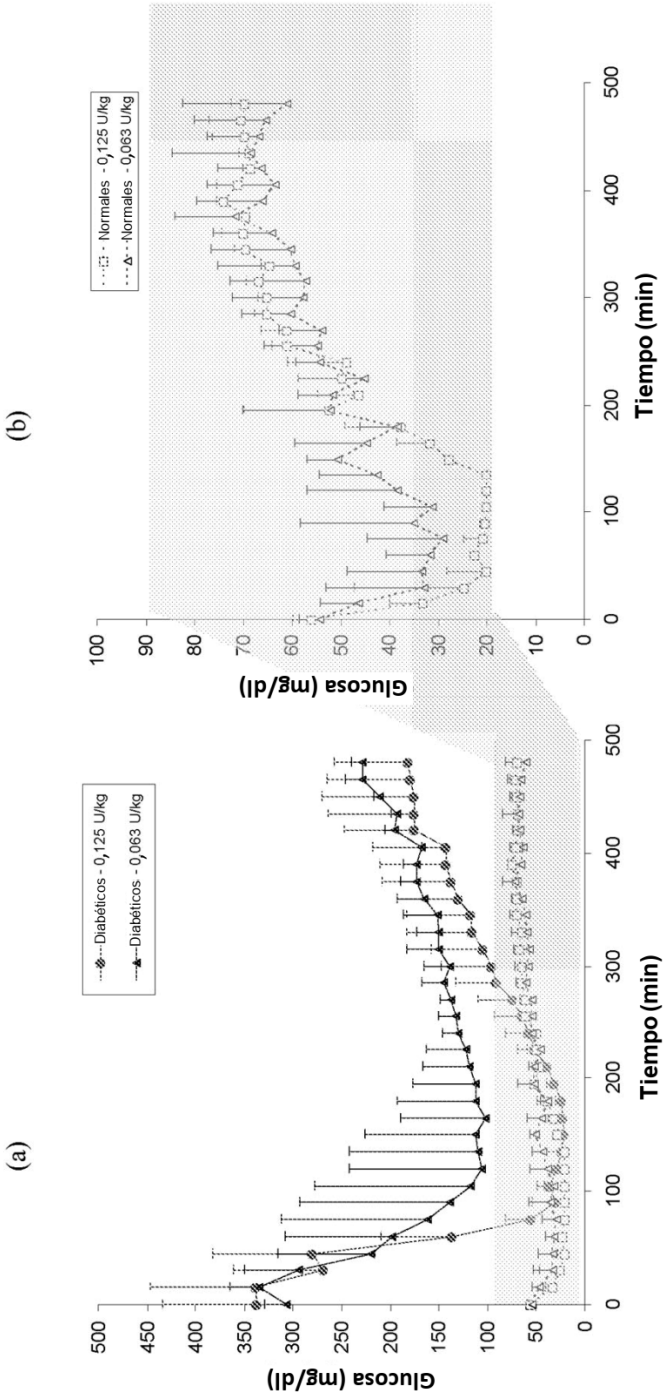
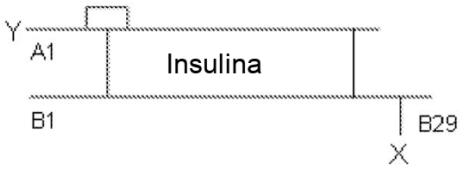
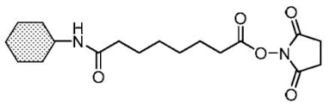

(a)
Diabéticos - 0,125 U/kg
Diabéticos - 0,063 U/kg
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
(b)
Normales - 0,125 U/kg
Normales - 0,063 U/kg
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

Figura 54





DSS

Formulación	Bastidor - X	Bastidor - Y	Azúcar (n)
I-12: AETM-2	n/a	TSAT-C_6	AETM (2)
I-13: AEM-2	n/a	TSAT-C_6	AEM (2)
I-15: AEM-3	n/a	TSPE	AEM (3)
I-14: AETM-3	n/a	TSPE	AETM (3)
II-1: Di-sub-AEM-2	TSAT-C_6	TSAT-C_6	AEM (2x2)
II-3: Di-sub-AETM-1	DSS	DSS	AETM (2x1)
II-4: Di-sub-AEM-1	DSS	DSS	AEM (2x1)

Figura 55

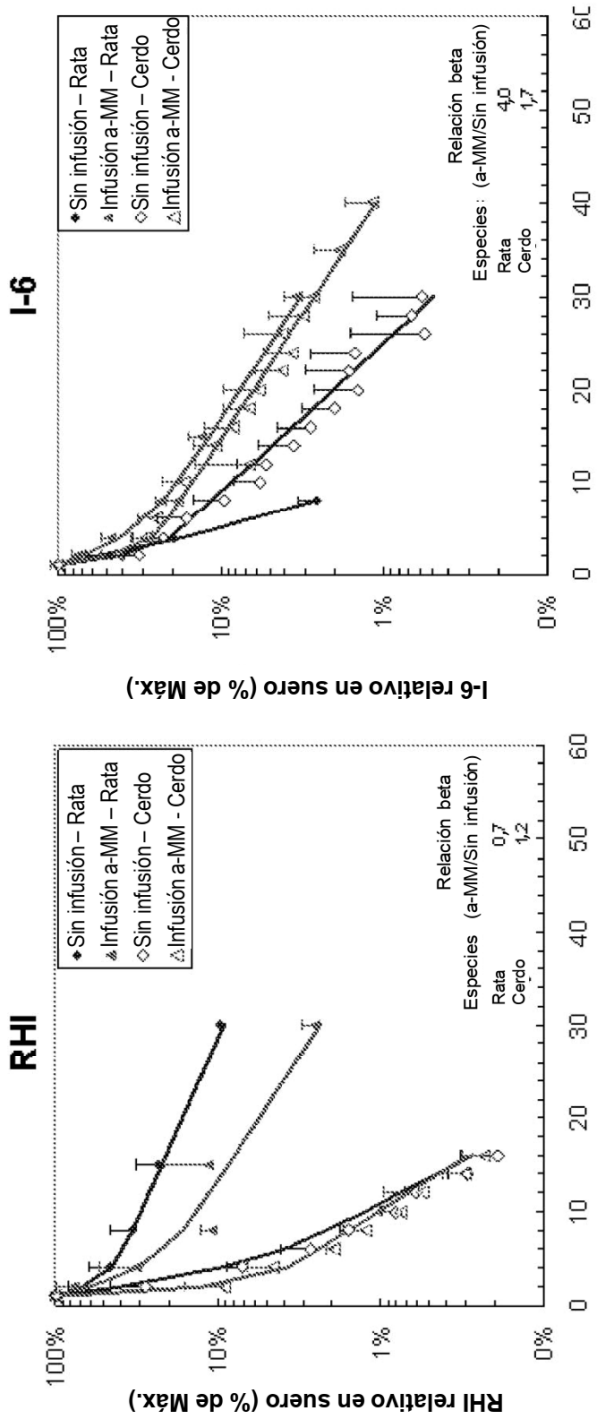

I-6
Sin infusión – Rata
Infusión a-MM – Rata
Sin infusión – Cerdo
Infusión a-MM - Cerdo
Relación beta
Especies (a-MM/Sin infusión)
Rata 4,0
Cerdo 1,7
100%
10%
1%
0%
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo (min)
I-6 relativo en suero (% de Máx.)
RHI
Sin infusión – Rata
Infusión a-MM – Rata
Sin infusión – Cerdo
Infusión a-MM - Cerdo
Relación beta
Especies (a-MM/Sin infusión)
Rata 0,7
Cerdo 1,2
100%
10%
1%
0%
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo (min)
RHI relativo en suero (% de Máx.)

Figura 56

Conjugado de insulina	Composición de azúcar	$t_{1/2,\beta}$ (a-MM)/ $t_{1/2,\beta}$ (No Inf)
II-2	B29: AETMx2, A1: AETMx2	8,1
I-12	A1: AETMx2	2,3
I-6	B29: AETMx2	1,7
I-11	B29: AETMx3	1,6
I-9	B29: AEMx3	1,6
II-1	B29: AEMx2, A1: AEMx2	1,5
II-3	B29: AETMx1, A1: AETMx1	1,3
RHI	n/a	1,2
I-7	B29: AEMx2	1,0
II-4	B29: AEMx1, A1: AEMx1	0,9

Figura 57

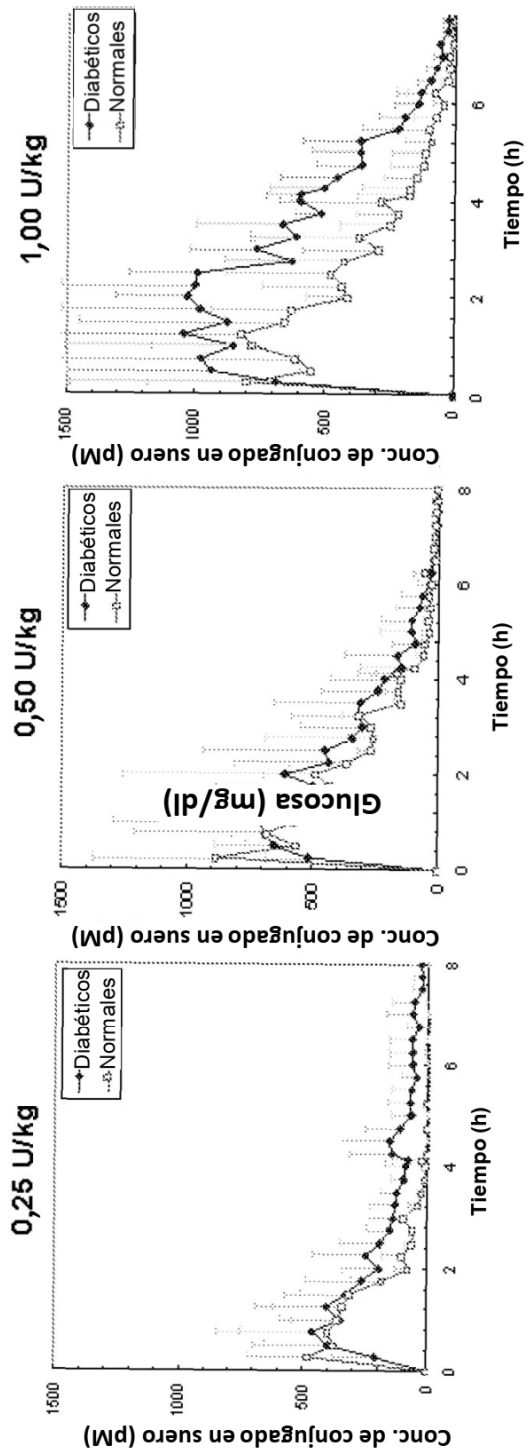
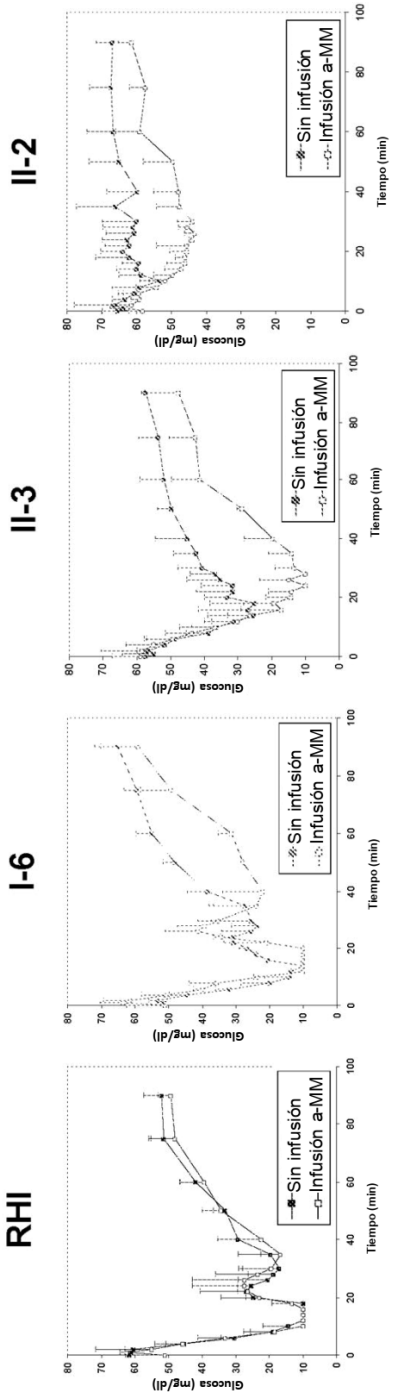

0,25 U/kg
0,50 U/kg
1,00 U/kg
Diabéticos
Normales
Conc. de conjugado en suero (pM)
Tiempo (h)
Glucosa (mg/dl)

Figura 58



Formulación	Relación ABC (a-MM/sin infusión)	$t_{1/2,\beta}$ (a-MM)/ $t_{1/2,\beta}$ (sin infusión)	
RHI	0,99	1,2	
I-6	1,36	1,6	
II-3	2,34	1,3	Falta de correlación entre semivida dependiente de azúcar y bioactividad
II-2	2,58	8,1	

Figura 59

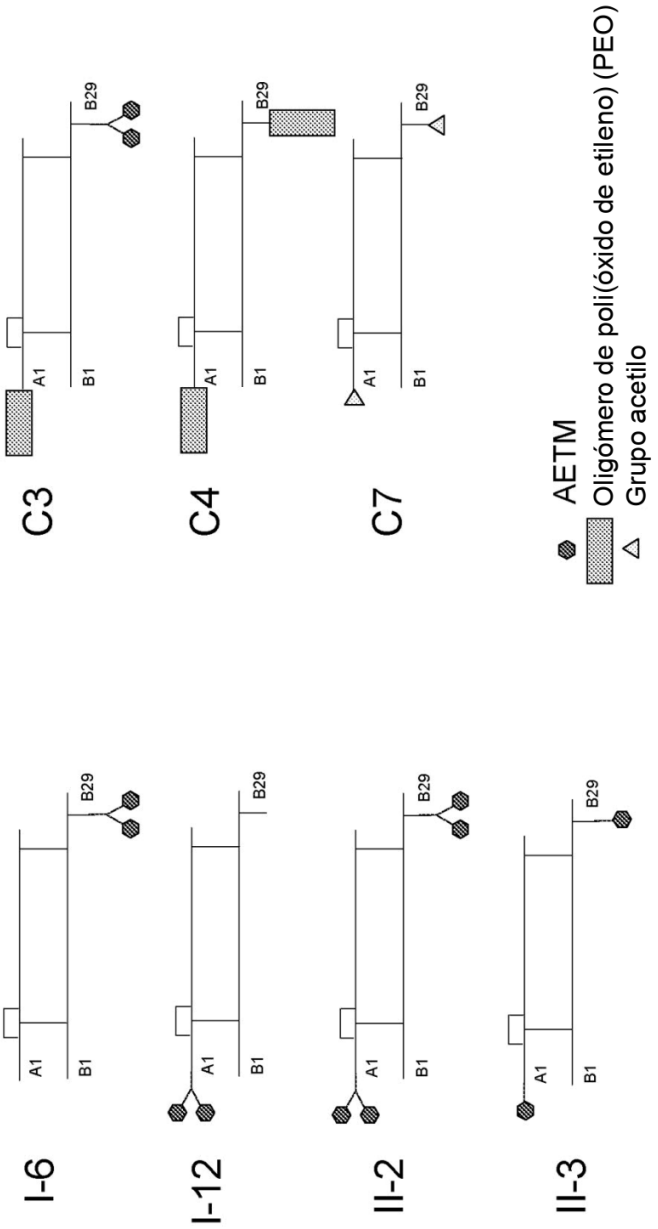

C3
C4
C7
I-6
I-12
II-2
II-3
A1
B1
B29
AETM
Oligómero de poli(óxido de etileno) (PEO)
Grupo acetilo

Figura 60

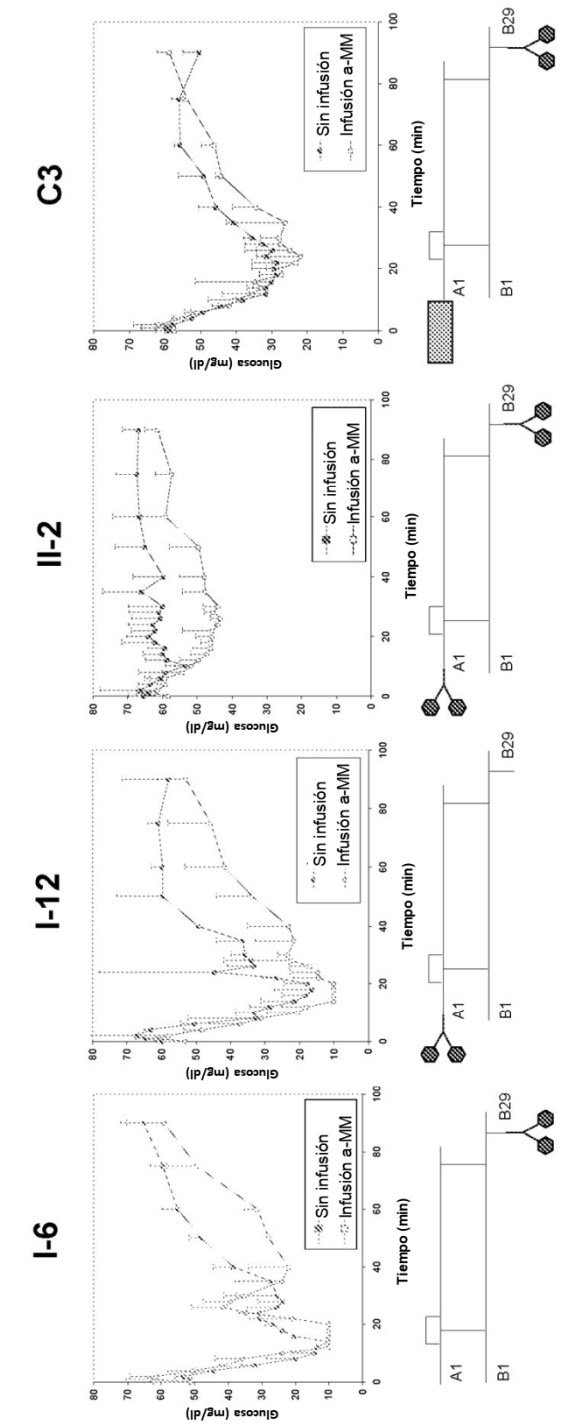

I-6
I-12
II-2
C3
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
Sin infusión
Infusión a-MM
A1
B1
B29

Figura 61

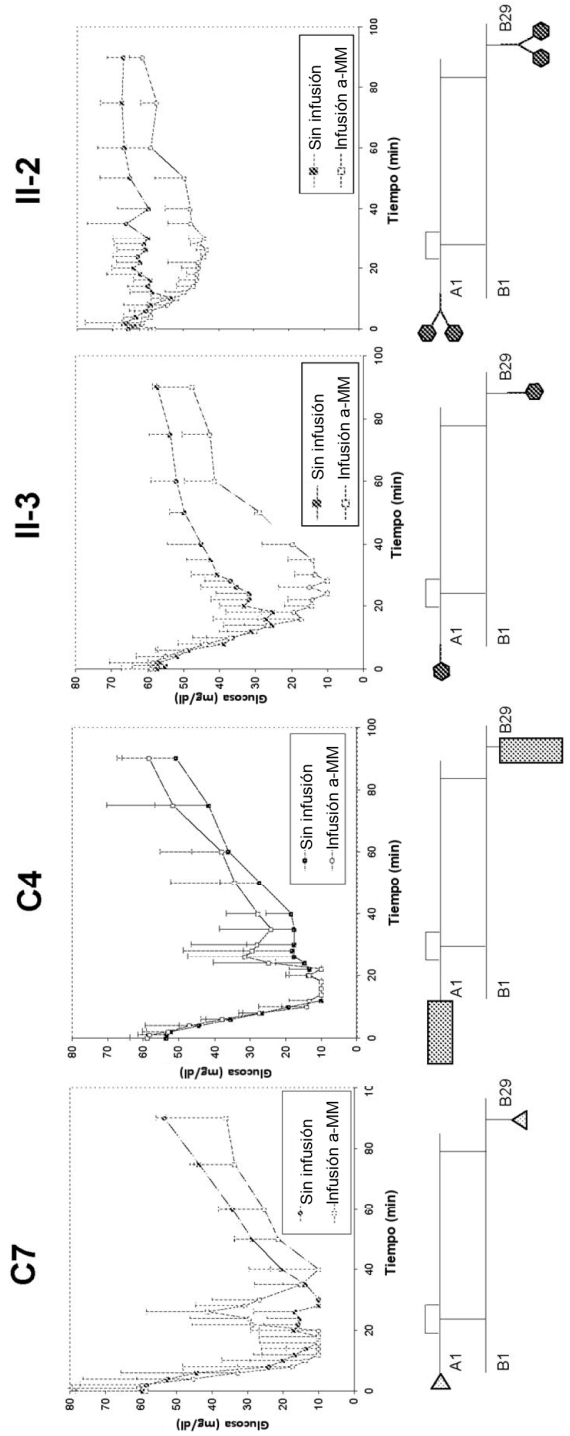

II-2
II-3
C4
C7
Sin infusión
Infusión a-MM
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
A1
B1
B29

Figura 62

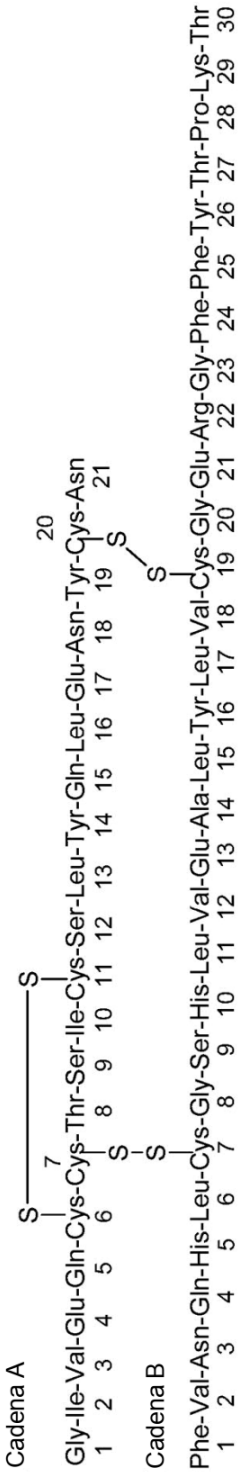

Cadena A
Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
S S S S
Cadena B
Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Figura 63