



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

(11) PI 0520362-7 B1

(22) Data do Depósito: 08/07/2005

(45) Data de Concessão: 17/10/2017



* B R F I 0 5 2 0 3 6 2 B 1 *

(54) Título: PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS DE INSULINA

(51) Int.Cl.: C07K 14/62

(73) Titular(es): BIOCON LIMITED

(72) Inventor(es): PARTHA HAZRA; S.H. MANJUNATH; ANAND KHEDKAR; HARISH IYER; NITESH DAVE; GAUTAM KRISHNAN; SHRIKUMAR SURYANARAYAN

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS DE INSULINA**".

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo para fazer um conjugado insulina-oligômero como uma reação "one pot" pela conjugação de
5 éster de insulina com um oligômero ativado em que é realizado desbloqueio e conjugação simultaneamente.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As células β das ilhotas pancreáticas secretam um precursor de
10 cadeia única da insulina, conhecido como pró-insulina, que após a proteólise resulta no polipeptídeo de insulina biologicamente ativo. A molécula de insulina é altamente conservada entre as espécies e consiste geralmente em duas cadeias de aminoácidos ligadas por pontes de dissulfeto. A molécula de insulina humana natural (pm 5.807 Dáltons) tem uma cadeia-A de 21 re-
15 síduos de aminoácidos com glicina na terminação amino; e uma cadeia-B de 30 resíduos de aminoácidos com fenilalanina na terminação amino. A insulina pode existir como um monômero ou pode se agregar em um dímero ou um hexâmero formado por três dos dímeros. O monômero tem a habilidade de se ligar aos receptores e é a forma biologicamente ativa.

20 O polipeptídeo de insulina é o hormônio primário responsável por controlar o transporte, a utilização e o armazenamento de glicose no corpo. Um defeito no metabolismo de carboidrato como um resultado de produção insuficiente de insulina ou sensibilidade reduzida do receptor à insulina leva ao distúrbio biológico do diabetes. O diabetes prejudica a habi-
25 lidade normal de usar a glicose e como um resultado os níveis de açúcar no sangue aumentam (hiperglicemia). Como a glicose se acumula no sangue, níveis excessivos de açúcar são excretados na urina (glicosúria). Outros sintomas de diabetes incluem volume e frequência urinários aumentados, sede, irritação, fome, perda de peso e fraqueza. Diabetes quando não tratado leva
30 a cetose, seguida por acidose com náusea e vômito. Como os produtos tóxicos continuam a se acumular, o paciente vai ao coma diabético, que leva à morte do paciente. Há dois tipos de diabetes. Tipo I é o diabetes melito insu-

lina-dependente, ou IDDM. IDDM era anteriormente referido como "diabetes de início na juventude". No IDDM, a insulina não é secretada pelo pâncreas e deve ser fornecida a partir de uma fonte externa. Tipo II ou diabetes de início na idade adulta pode geralmente ser controlado pela dieta, embora em alguns casos avançados a insulina seja necessária.

Banting *et al* descreveram o uso de insulina para o tratamento de diabetes usando extrato ativo do pâncreas em cães diabéticos. "Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus" (Can. Med. Assoc. J., 12:141-146 (1922)). Naquele mesmo ano, o tratamento de um paciente com extratos pancreáticos resultou em uma melhora clínica dramática, que salvou sua vida.

Tradicionalmente, insulina bovina e suína eram usadas quase que exclusivamente para tratar diabetes em seres humanos. Com o desenvolvimento da tecnologia recombinante em escala comercial, a produção de insulina humana tornou-se possível pela fermentação. Além disso, análogos de insulina manipulados geneticamente que têm atividade biológica comparável àquela da insulina humana natural foram desenvolvidos para combater a doença.

Entretanto, o tratamento do diabetes requer tipicamente injeções regulares de insulina. Devido à inconveniência de injeções de insulina, várias abordagens têm sido tentadas para formular insulina para administração por vias não injetáveis. Uma lista de tais descrições inclui: US 4.338.306 (Kitao *et al.*) descreve composições farmacêuticas de insulina e ácidos graxos que têm 8 a 14 átomos de carbono e sais atóxicos desses para administração retal de insulina; US 4.579.730 (Kidron *et al.*) descreve composições de insulina com revestimento entérico com um ácido biliar ou sal de metal alcalino desse para administração oral de insulina; US 5.283.236 (Chiou *et al.*) descreve uma composição de insulina com um agente que aumenta a permeabilidade para auxiliar a absorção sistêmica de polipeptídeos de peso molecular maior, assim como inibidores de peptidase para liberação sistêmica de insulina através dos olhos em que o fármaco passa pelo duto nasolacrimal e é absorvido pela circulação; US 5.658.878 (Backstrom *et al.*) descreve insulina

e um sal de sódio de um ácido graxo saturado de extensão de cadeia de carbono de 10 (isto é, caprato de sódio), 12 (laurato de sódio) ou 14 (miristato de sódio) que aumentam a absorção de insulina no trato respiratório inferior; US 5.853.748 (New *et al.*) descreve uma composição de insulina com revestimento entérico, um sal biliar ou ácido biliar, e íons de carbonato ou bicarbonato, usados para ajustar o pH do intestino para um pH entre 7.5 a 9 para administração oral de insulina; US 6.200.602 (Watts *et al.*) descreve uma composição para liberação de fármaco de insulina para liberação colônica de insulina com um promotor de absorção que inclui uma mistura de ácidos graxos que têm 6 a 16 átomos de carbonos e seus sais ou uma mistura de mono/diglicerídeos de ácidos graxos de cadeia média junto com um agente dispersante, em um revestimento para impedir a liberação da insulina e do promotor de absorção até que o comprimido, cápsula ou pélete alcance o cólon proximal.

Foram feitas tentativas para liberar a insulina por administração oral. Os problemas associados com a administração oral de insulina para se obter a euglicemia em pacientes diabéticos estão bem-documentados na literatura farmacêutica e médica. As enzimas digestivas no trato GI degradam rapidamente a insulina, resultando em produtos de degradação biologicamente inativos. No estômago, por exemplo, insulina administrada oralmente sofre proteólise enzimática e degradação ácida. A sobrevivência no intestino é impedida pela proteólise excessiva. No lúmen, a insulina é bombardeada por uma variedade de enzimas incluindo enzimas gástricas e pancreáticas, exo e endopeptidases e peptidases de borda em escova. Mesmo que a insulina sobreviva a esse ataque enzimático, as barreiras biológicas que devem ser transpostas antes que a insulina possa alcançar os seus receptores *in vivo* podem limitar a administração oral de insulina. Por exemplo, a insulina pode possuir baixa permeabilidade de membrana, limitando sua habilidade de passar do lúmen para a corrente sanguínea.

Polipeptídeos farmacologicamente ativos tal como a insulina foram conjugados com misturas polidispersas de polietileno glicol ou misturas polidispersas de polietileno glicol contendo polímeros para fornecer misturas

5 polidispersas de conjugados fármaco-oligômero: US 4 179.337 (Davis *et al.*)
descreve conjugação de polipeptídeos tal como a insulina com vários polieti-
leno glicóis tais como MPEG-1900 e MPEG- 5000 fornecidos por Union
Carbide. US 5.567.422 (Greenwald) descreve a conjugação de nucleófilos
biologicamente ativos com polietileno glicóis tais como m-PEG-OH (Union
Carbide), que tem um número de peso molecular médio de 5000 Dáltons.

10 A conjugação de polipeptídeos, tal como insulina, com polímeros
de glicolípido modificado por polietileno glicol e polímeros de ácido graxo
modificado por polietileno glicol é descrita em US 5.359.030 (Ekwuribe *et*
al.).

15 US 6.011.008 (Domb *et al.*) descreve um método para produzir
um conjugado de polissacarídeo solúvel em água de uma substância sensí-
vel à oxidação que compreende ativar o polissacarídeo para um dialdeído
por oxidação com periodato; (b) purificar o dialdeído a partir de íons interfe-
rentes e subprodutos; e (c) acoplar a substância ao dialdeído purificado pela
20 formação de base de Schiff para formar o conjugado. Opcionalmente, o con-
jugado da etapa (c) é reduzido para um conjugado de amina por uma subs-
tância redutora. Insulina foi conjugada a AG (arabinogalactano) oxidado a-
través de uma ligação de amina ou imina pela reação de uma solução pura
de AG (arabinogalactano) oxidado em solução tampão de borato em pH 8.9
com insulina a 4°C durante a noite. A solução clara foi dialisada através de
uma diálise em celulose e a solução foi liofilizada para produzir 115 mg de
um sólido branco.

25 US 6.022.524 (Maisano *et al.*) Gd-DTPA foi conjugado com insu-
lina de porco em uma solução de DTPA e dimetilsulfóxido (DMSO), é prepa-
rado por aquecimento e agitação, então é resfriado em temperatura ambien-
te e adicionado com uma solução de 11,73 g de NHS (0,102 mol) em 300 ml
de DMSO, então, gota a gota, com uma solução de 19,6 g de N,N'-
diciclohexilcarbodiimida (0,097 mol) em 400 ml de DMSO. A mistura é agita-
30 da por 16 horas, então filtrada e o filtrado é concentrado por evaporação a
50 graus C. e 5 Pa para um óleo espesso com um volume de cerca de 160
ml.

US 6.309.633 (Ekwuribe *et al.*) descreve o uso de insulina sólida para conjugação de insulina com PEG₅ laurato na presença de Trietilamina e DMSO em temperatura ambiente. A reação foi monitorada através de HPLC a cada 30 min. O conjugado foi purificado usando um HPLC preparativo.

- 5 US 6.828.297 (Ekwuribe *et al.*) descreve métodos para fazer PEG7-Hexil-Insulina pelo uso de zinco ou insulina humana sem zinco para conjugação com oligômero ativado e purificação de PEG7-Hexil-Insulina modificada B29. Insulina em dimetilsulfóxido e trietilamina foi reagida com oligômero ativado a 22+/- 4°C. A mistura de reação bruta é dialisada ou diafiltrada para remover solventes orgânicos e impurezas de baixo peso molecular, trocada contra tampão de acetato de amônio e liofilizada; que é ainda submetida à RP-HPLC equilibrado com tampão de trietilamina 0,5%/ácido fosfórico 0,5% (TEAP A). A coluna foi eluída com um fluxo em gradiente usando um sistema de solvente TEAP A e TEAP B (80% de acetonitrila e 20% de TEAP A).
- 10 Frações contendo o conjugado foram agrupadas, o tampão de eluição e o solvente foram removidos por diálise ou diafiltração contra tampão de acetato de amônio e liofilizados para produzir um pó branco de PEG7-hexil-insulina, monoconjugado B29 (pureza>97%).
- 15

Atualmente, a técnica anterior existente ensina o uso de pó ou cristais de insulina pura como material de partida para fazer insulina conjugada em que a insulina usada é uma forma biologicamente ativa.

20

A presente invenção facilita a conjugação de insulina em sua forma de éster inativo com um oligômero, em que o éster de insulina é desbloqueado e conjugado ao oligômero simultaneamente como uma reação "one pot".

25

A presente invenção é mais simplificada e econômica para a produção de um conjugado de insulina em que várias etapas de purificação para obter insulina pura na forma biologicamente ativa são evitadas. O material de partida é o caldo fermentado contendo o precursor de insulina. O caldo contendo o precursor de insulina é submetido a uma etapa de combinação de purificação por troca de cátion, cristalização com fenol e ZnCl₂, liofilização e transpeptidação para se obter o éster de insulina. O éster de insuli-

30

na é submetido à conjugação com um oligômero que tem a fórmula geral $OC-(CH_2)_n-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ e mais preferivelmente um oligômero ativado de fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO_8$ (CAS.nº 622405-78-1), para se obter o conjugado de insulina. O conjugado insulina-oligômero mais preferido é insulina-
5 $OC-CH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_3-OCH_3$ daqui por diante referido como IN 105. O custo total de produção de insulina conjugada como um resultado desse processo é minimizado.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo para fazer um con-
10 jugado insulina-oligômero em uma reação "one pot" pela conjugação de um éster de insulina com um oligômero ativado em que o desbloqueio e conjugação simultâneos são feitos em tampão de borato. O oligômero ativado solubilizado em acetonitrila é adicionado a uma solução contendo éster de insulina e o pH da mistura é elevado para cerca de 11.

15 DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção descreve um processo de reação "one pot" para a preparação de conjugados insulina-oligômero que compreende o desbloqueio e conjugação simultâneos de um éster de insulina.

O conjugado insulina-oligômero é ainda purificado e liofilizado
20 para um pó seco.

O processo para fazer um conjugado insulina-oligômero em "one pot" compreendendo:

- (i) transpeptidação de precursor de insulina,
- (ii) desbloqueio de éster de insulina e conjugação com um oligômero si-
25 multaneamente em "one pot",
- (iii) fornecimento de conjugado insulina-oligômero.

O processo ainda compreende:

- (i) purificação do precursor de insulina por cromatografia e precipitação,
- (ii) transpeptidação para fornecer um éster de insulina,
- 30 (iii) purificação do éster de insulina usando RP-HPLC,
- (iv) tratamento do éster de insulina com um oligômero em tampão de borato, para efetuar o desbloqueio e conjugação simultaneamente,

- (v) purificação opcional do conjugado.
- (vi) fornecimento de conjugado insulina-oligômero.

O processo em que a preparação do conjugado insulina-oligômero compreende o processo "one pot" de desbloqueio do éster de insulina e conjugação com o oligômero.

O processo de produzir um conjugado insulina-oligômero compreendendo a adição de um oligômero solubilizado em acetonitrila a uma solução contendo éster de insulina em tampão de borato e aumento do pH da mistura.

O processo em que o pH é aumentado para cerca de 11.

O processo em que o precursor de insulina é pró-insulina ou mini-pró-insulina.

O processo em que o oligômero é um alquil-PEG ou derivado desse.

O processo em que o oligômero é ativado antes da conjugação.

O processo em que o oligômero ativado usado para a conjugação é $C_{14}H_{23}NO_8$.

O processo em que o alquil-PEG tem a fórmula geral - $OC-(CH_2)_n-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$

O processo em que o conjugado insulina-oligômero é conjugado insulina B29 $N\epsilon$ -oligômero.

O processo em que o conjugado insulina-alquil PEG é conjugado insulina B29 $N\epsilon$ -alquil PEG.

O processo em que o conjugado é insulina $-OC-CH_2-CH_2-(O-CH_2CH_2)_3-OCH_3$.

Fermentação de levedura recombinante contendo o gene de insulina

Inóculo de levedura recombinante contendo o gene de insulina é preparado pela adição de 100 microlitros de cultura estoque de glicerol em 50 ml de meio mínimo de glicerol (MGY) em frascos de agitação de 250 ml.

O meio MGY contém base nitrogênio leveduras (YNB), glicerol, tampão fosfato e D-biotina. Frascos de semeadura são incubados a 30 graus C, 240+/- 10 até que OD de 15+/-5 (densidade óptica a 600 nm) seja alcançada.

O meio de fermentação contém ácido orto-fosfórico, sulfato de cálcio dihidratado, sulfato de potássio, sulfato de magnésio heptahidratado, hidróxido de potássio, glicerol, sais residuais e D-biotina. O fermentador é preparado pela adição de todos os componentes acima exceto sais residuais e D-biotina e autoclavado a 121 - 124° C por uma hora. A solução de sal residual é preparada por esterilizar por filtração uma solução de sulfato cúprico pentahidratado, iodeto de sódio, sulfato de manganês monohidratado, molibdato de sódio dihidratado, ácido bórico, cloreto de cobalto hexa-hidratado, cloreto de zinco, sulfato ferroso heptahidratado. A solução de biotina também é esterilizada por filtração. O fermentador é inoculado e corrido em uma temperatura de 30°C, pH 5.5, fluxo de ar 0,5 lpm e DO de 30. Após a fase de "batelada", a alimentação de glicerol (50% p/p com água) é iniciada para produzir a biomassa. Glicerol 50% p/p é preparado e autoclavado por 30 min a 121-124 graus C e então as soluções de sais residuais & biotina são adicionadas na taxa de 12 ml/l. A taxa de alimentação de glicerol é gradualmente aumentada até 20 +/- 5 g/h. Uma vez que 300-400 g/l de biomassa é produzida, a temperatura é reduzida para 20 – 25°C, o pH é alterado para 3.5 – 6.5 e é iniciada a alimentação de metanol. O metanol é esterilizado por filtração e as soluções de sal residual e biotina são adicionadas na taxa de 12 g/l. A alimentação de metanol é aumentada com base no consumo até 25 +/- 5 g/h. Durante a alimentação de metanol, alimentação de extrato de levedura e peptona é adicionada na taxa de 0,2 – 0,5 g/h. A fermentação é continuada até 12 dias.

Purificação de pró-insulina a partir do caldo

900 mg de caldo contendo o Precursor de Insulina foi ajustado para pH 4.0 com ácido acético e passado através de resinas de troca de cá-tion, pré-equilibradas com ácido acético 50 mM. A coluna foi lavada com ácido acético 50 mM e eluída com ácido acético 50 mM com NaCl 1M. Foram obtidos 855 g do produto que foram diluídos 1:3 com água e a concentração foi levada para 6mg/ml. Fenol foi adicionado (1,25 mg/l) e ZnCl₂ 5% (v/v) de estoque 5% (p/v) foi adicionado à solução. O pH foi ajustado para 5.2 com NaOH 1N. A solução foi mantida a 4°C durante a noite. A suspensão de sólidos

do foi centrifugada e o precipitado formado foi liofilizado até secar. A recuperação na etapa foi de 90%.

Transpeptidação e esterificação da pró-insulina

400 mg de pó seco de precursor foram solubilizados em 30 ml
5 de DMF contendo 30-70% de N,N dimetil formamida. 724 mg de éster butílico de treonina foram adicionados à solução. O pH da solução foi ajustado para 6.5 com ácido acético 3 N. A reação foi iniciada com a adição de 55 mg de tripsina. A reação foi monitorada a cada hora e foi paralisada com 5 ml de ácido acético 3 N após 4 h quando a conversão de precursor de insulina para éster de insulina era de 74%. O rendimento dessa etapa foi de 68% em
10 termos de conversão de produto.

O produto obtido foi precipitado como acima, em pH 6.0 e 228 mg de éster de insulina foram recuperados. O precipitado cristalino de éster de insulina foi solubilizado em 250 mM de ácido acético. O material filtrado
15 foi passado através de uma matriz C8 Kromasil e o éster de insulina 95% puro foi recuperado a partir do gradiente de acetonitrila. No final do RP-HPLC, 149 mg do produto foram recuperados.

O éster de insulina assim obtido é usado para a preparação do conjugado de insulina como descrito aqui nos seguintes exemplos, não considerados como limitantes.
20

EXEMPLOS

Exemplo 1

5 ml do conjunto de eluição de RP obtidos como no exemplo 2 são tomados e 1,2 ml de tampão de borato 1M são adicionados a mistura de
25 reação; o pH da mistura de reação foi elevado para 11 e a mistura de reação foi agitada por 3 h a 24°C. Desbloqueio foi monitorado e quando se completou, 0,5 mg do oligômero ativado ($C_{14}H_{23}NO_8$) solubilizado em 300 µl de acetonitrila foram adicionados à mistura de reação. A reação foi paralisada pela queda do pH da reação para 7.5. O rendimento é de 44%, com uma pureza
30 cromatográfica de 28%. A maioria do produto permanece não convertida.

Exemplo 2

5 ml do conjunto de eluição de RP são tomados como material de partida e 1,2 ml de tampão de borato 1M são adicionados a mistura de reação; o pH da mistura de reação foi aumentado para 11 e a mistura de reação foi agitada por 3 h a 24°C. Desbloqueio foi monitorado e quando se completou, 2,5 mg do oligômero ativado ($C_{14}H_{23}NO_8$) foi solubilizado em 300 µl de acetonitrila e adicionado à mistura de reação. A reação foi paralisada pela queda do pH da reação para 7.5. O rendimento é de 63% com um produto de pureza cromatográfica de 56%.

Exemplo 3

5 ml de conjunto de eluição de RP são tomados como material de partida e 1,2 ml de tampão de borato 1M são adicionados à mistura de reação; o pH da mistura de reação foi aumentado para 11 e a mistura de reação foi agitada por 3 h a 24°C. Desbloqueio foi monitorado e quando se completou, 10 mg do oligômero ativado ($C_{14}H_{23}NO_8$) foi solubilizado em 300 µl de acetonitrila. A amostra foi analisada a partir de todos os grupos em 10 min e 1h. O rendimento é de 18% com uma pureza cromatográfica do produto de 11%. Na maior parte, o produto diconjugado foi observado.

Exemplo 4

5 ml de conjunto de eluição de RP são tomados como material de partida e 1,2 ml de tampão de borato 1M são adicionados à mistura de reação; o pH foi ajustado para 10.5 e mantido por 5 h. 2,5 mg do oligômero ativado ($C_{14}H_{23}NO_8$) foram dissolvidos em 300 µl de acetonitrila e adicionados uma vez que o DESBLOQUEIO estava completo. Uma alíquota foi retirada e analisada. O rendimento foi de 58% com uma pureza cromatográfica de 51%.

Exemplo 5

5 ml de conjunto de eluição de RP são tomados como material de partida e 1,2 ml de tampão de borato 1M são adicionados à mistura de reação; o pH foi ajustado para 10.75 e mantido por 4 h. 2,5 mg do oligômero ativado ($C_{14}H_{23}NO_8$) foram dissolvidos em 300 µl de acetonitrila e adicionados uma vez que o DESBLOQUEIO estava completo. Uma alíquota foi reti-

rada e analisada. O rendimento foi de 61% com uma pureza cromatográfica de 53%.

Exemplo 6 (Desbloqueio e conjugação simultâneos)

5 ml de conjunto de eluição de RP são tomados como material de partida e 1,2 ml de tampão de borato 1M são adicionados à mistura de reação; o pH foi ajustado para 11 e 4 mg do oligômero ativado ($C_{14}H_{23}NO_8$) dissolvido em 300 μ l de acetonitrila foram adicionados. A amostra foi analisada aos 10 min, 1h, 2h e 3h após o desbloqueio simultâneo com a conjugação ter ocorrido. O rendimento foi de 64% com uma pureza cromatográfica de 58%.

Exemplo 7 (Desbloqueio e conjugação simultâneos)

5 ml de conjunto de eluição de RP são tomados como material de partida e 1,2 ml de tampão de borato 1M são adicionados à mistura de reação; o pH foi ajustado para 11 e 2,5 mg do oligômero ativado ($C_{14}H_{23}NO_8$) dissolvido em 300 μ l de acetonitrila foram adicionados. A amostra foi analisada aos 10 min, 1h, 2h e 3h após o desbloqueio simultâneo com a conjugação ter ocorrido. O rendimento após 3h foi de 75% com uma pureza do produto de 73,4%.

O desbloqueio continuou por 1h, 2h e 3h e a conjugação foi iniciada em cada ponto de tempo e deixada continuar até que tanto o desbloqueio como a conjugação estivessem completos para cada caso.

5 ml de cada conjunto de eluição de RP foram colocados em cada um de 4 tubos. 1,2 ml de tampão de borato 1M são adicionados à mistura de reação; o pH foi ajustado para 11. No 1pool tubo, 2,5 mg de oligômero ativado ($C_{14}H_{23}NO_8$) foram adicionados a 0h. O desbloqueio foi deixado continuar por 1h no 2pool tubo e a mesma quantidade de oligômero ativado ($C_{14}H_{23}NO_8$) foi adicionada à mistura de reação. O desbloqueio foi deixado continuar por 2h no 3pool tubo e 2,5 mg de oligômero ativado ($C_{14}H_{23}NO_8$) foram adicionados após 2h. No 4pool tubo o desbloqueio continuou por 3h antes da mesma quantidade de oligômero ativado ($C_{14}H_{23}NO_8$) ser adicionada. A conjugação foi deixada continuar para cada tubo até parecer estar completa como confirmado por cromatografia analítica. O rendimento da e-

tapa assim como o percentual de pureza do conjugado de insulina foi monitorado por cromatogramas analíticos.

Experimento N°	Rendimento (%)	Pureza de IN 105 (%)
Tubo 1	74,7	73,0
Tubo 2	71,0	70,1
Tubo 3	67,6	65,7
Tubo 4	64,8	59,0

Exemplo 8

150 ml de conjunto de eluição de RPHPLC em 36 ml de tampão de borato são tomados em pH 8.7. O pH foi elevado para 11 pela adição de 10 ml de NaOH 10 N e a mistura de reação foi mantida a 25^o C por 3h. 135 mg do oligômero ativado (C₁₄H₂₃NO₈) solubilizados em 9 ml de acetonitrila foram adicionados à mistura de reação para iniciar a reação de conjugação. Após 1h, a reação de conjugação foi paralisada pela diminuição do pH da mistura de reação para 7.5 pela adição de ácido acético glacial. O rendimento encontrado do desbloqueio e conjugação foi de 61% nessa reação e a pureza do produto foi de 62%.

Exemplo 9

975 ml de conjunto de eluição de RP com concentração de 8,4 mg/ml são tomados e 234 ml de tampão de borato 1 M são adicionados em pH 8.2. O pH é ajustado para 11 com NaOH 10 N. 975 mg do oligômero ativado (C₁₄H₂₃NO₈) dissolvidos em 58,5 ml de acetonitrila foram adicionados à mistura de reação e os processos de desbloqueio assim como de conjugação foram iniciados juntos.

Alíquotas foram retiradas com 2 e 3 h, analisadas em HPLC para monitorar o perfil da reação. A conjugação foi paralisada após 3h pela redução do pH da mistura de reação para 7.5 pela adição de ácido acético glacial. O rendimento encontrado foi de 68% com uma pureza do produto de 69%.

Exemplo 10 (Recuperação do produto)

O produto conjugado final é diluído com ácido acético 250 mM para levar a concentração para 2,5 mg/ml. O material é aplicado em uma coluna Kromasil CS RP HPLC e eluído com gradiente de acetonitrila. O conjunto eluído tem o IN 105 com uma pureza de 96,7% e com a recuperação na etapa de 72%.

O IN 105 purificado, eluído da coluna de RPHPLC é cristalizado com fenol e $ZnCl_2$ em pH 5.2 em condição fria. O pélete cristalino final foi coletado por centrifugação. O pélete cristalino coletado foi liofilizado e coletado como cristais secos purificados de IN 105.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para fazer um conjugado de oligômero de insulina em "one pot", caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (i) transpeptidação e esterificação de um precursor de insulina para fornecer um éster de insulina;

(ii) desbloqueio do éster de insulina e conjugação com um oligômero simultaneamente em "one pot" através de adição simultânea de um oligômero solubilizado em acetonitrila a uma solução contendo o éster de insulina em tampão borato e aumento do pH da solução; e

10 (iii) obtenção do conjugado de oligômero de insulina.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ainda compreende,

(i) purificação do precursor de insulina por cromatografia e precipitação,

15 (ii) purificação do éster de insulina usando RP-HPLC,

(iii) purificação opcional do conjugado.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pH é aumentado para cerca de 11.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
20 pelo fato de que o precursor de insulina é proinsulina ou mini-proinsulina.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o oligômero é um alquil-PEG ou derivado desse.

6. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
25 pelo fato de que o oligômero é ativado antes da conjugação.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o oligômero ativado usado para conjugação é $C_{14}H_{23}NO_8$.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, em que o alquil-PEG tem a fórmula geral $-OC-(CH_2)_n-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$.

30 9. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o conjugado de oligômero de insulina é conjugado de oligômero de insulina B29 Nε.

10. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o conjugado de insulina alquil-PEG é conjugado de alquil PEG de insulina B29 Nε.

5 11. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o conjugado de insulina é o conjugado insulina B29 Nε -OC-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃.