



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 781**

51 Int. Cl.:
C07K 14/62 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02766246 .9**
96 Fecha de presentación : **06.09.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1430082**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2004**

54 Título: **Procedimientos de síntesis de conjugados de polipéptido insulina-oligómero y conjugados de polipéptido proinsulina-oligómero, y procedimientos de síntesis de los mismos.**

30 Prioridad: **07.09.2001 US 318197 P**
21.12.2001 US 36744
18.01.2002 US 349462 P

73 Titular/es: **Biocon Limited**
20th K.M. Hosur Road, Electronics City P.O.
Bangalore, Karnataka 560 100, IN

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2010

72 Inventor/es: **Soltero, Richard;**
Radhakrishnan, Balasingham y
Ekwuribe, Nnochiri, N.

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2010

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 333 781 T3

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

Procedimientos de síntesis de conjugados de polipéptido insulina-oligómero y conjugados de polipéptido proinsulina-oligómero, y procedimientos de síntesis de los mismos.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a conjugados de insulina y a procedimientos de síntesis de tales conjugados.

10 **Antecedentes de la invención**

El polipéptido insulina es la hormona principal responsable de controlar el transporte, la utilización y el almacenamiento de la glucosa en el cuerpo. Las células β de los islotes pancreáticos segregan un precursor monocatenario de insulina conocido como proinsulina. La proteólisis de la proinsulina da como resultado la eliminación de ciertos aminoácidos básicos de la cadena de la proinsulina y del péptido C o conector, y proporciona el polipéptido insulina biológicamente activo.

15

La molécula de insulina se ha conservado mucho durante su evolución y consta, en general, de dos cadenas de aminoácidos unidas por enlace de tipo disulfuro. En la molécula de insulina bicatenaria humana natural (P.M.: 5.800 daltons), la cadena A está compuesta por 21 residuos de aminoácido y tiene glicina en el terminal amino; y la cadena B tiene 30 residuos de aminoácido y tiene fenilalanina en el terminal amino.

20

La insulina puede existir como un monómero o puede agregarse en un dímero o en un hexámero formado a partir de tres de los dímeros. La actividad biológica, i.e., la capacidad de unirse a receptores y estimular las acciones biológicas de la insulina, reside en el monómero.

25

La diabetes es un trastorno biológico que implica un metabolismo incorrecto de los hidratos de carbono. La diabetes resulta de una producción insuficiente de o una sensibilidad reducida a la insulina. Las personas con diabetes tienen inhibida la capacidad normal de usar la glucosa, aumentado de ese modo los niveles de azúcar en sangre (hiperglicemia). A medida que la glucosa se va acumulando en la sangre, se excretan los niveles excesivos de azúcar en la orina (glicosuria). Otros síntomas de la diabetes incluyen el aumento del volumen y de la frecuencia urinaria, sed, picor, hambre, pérdida de peso y debilidad.

30

Hay dos variedades de diabetes. La diabetes mellitus dependiente de la insulina de tipo I o IDDM. La IDDM antes se denominaba "diabetes de aparición juvenil". En la IDDM, la insulina no es segregada por el páncreas y debe ser proporcionada por una fuente externa. La diabetes de aparición en edad adulta o de tipo II puede ser normalmente controlada mediante la dieta, aunque en algunos casos avanzados, se necesita insulina.

35

Antes del aislamiento de la insulina en los años 20 del siglo XX, la mayoría de los pacientes fallecían en un breve período de tiempo tras la aparición de la enfermedad. La diabetes no tratada conduce a la cetosis, la acumulación de cetonas, productos de la descomposición de las grasas, en la sangre. A esto le sigue la acumulación de ácido en la sangre (acidosis) con náuseas y vómitos. A medida que se siguen acumulando los productos tóxicos del metabolismo incorrecto de los hidratos de carbono y de las grasas, el paciente entra en un coma diabético que le conduce a la muerte.

40

El uso de insulina como tratamiento de la diabetes data de 1922, cuando Banting *et al.* ("Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus", *Can. Med. Assoc. J.*, 12:141-146 (1922)) demostraron que el extracto activo del páncreas tenía efectos terapéuticos en perros diabéticos. En ese mismo año, el tratamiento de un paciente diabético con extractos pancreáticos dio como resultado una mejora clínica espectacular que le salvó la vida.

45

Hasta hace poco tiempo, se usaba la insulina bovina y porcina casi exclusivamente para tratar la diabetes en seres humanos. Sin embargo, hoy en día, se conocen numerosas variaciones de la insulina entre las especies. Cada variación difiere de la insulina humana natural en que tiene sustitución(es) de aminoácidos en una o más posiciones de la cadena A y/o la cadena B. A pesar de estas diferencias, la mayoría de la insulina de mamífero tiene una actividad biológica comparable. El advenimiento de la tecnología recombinante permite la fabricación a una escala comercial de la insulina humana (p. ej., insulina HumulinTM, comercialmente disponible en Eli Lilly y Compañía Indianápolis, IN) o insulina diseñada genéticamente con una actividad biológica comparable a la insulina humana natural.

50

55

Comúnmente, el tratamiento de la diabetes requiere inyecciones regulares de insulina. Debido a la incomodidad de las inyecciones de insulina, se han hecho esfuerzos masivos por mejorar la administración y la bioasimilación de la insulina.

60

Se han hecho intentos por administrar insulina por vía oral. Los problemas asociados con la administración oral de la insulina para alcanzar la euglicemia en pacientes diabéticos están bien documentados en la bibliografía farmacéutica y médica. Las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal degradan rápidamente la insulina, dando como resultado productos de descomposición biológicamente inactivos. En el estómago, por ejemplo, la insulina administrada oralmente sufre una proteólisis enzimática y una degradación ácida. En el intestino, se produce una descomposición proteolítica comparable de la insulina. En el lumen, la insulina es atacada por una variedad de enzimas, incluyendo las enzimas gástricas y pancreáticas, las exo- y endo-peptidasas y las peptidasas del borde en cepillo. Incluso aunque la

65

insulina sobreviva a este ataque enzimático, las barreras biológicas que deben ser atravesadas antes de que la insulina pueda llegar a sus receptores *in vivo* pueden limitar su biodisponibilidad tras la administración oral de la insulina. Por ejemplo, la membrana puede ser poco permeable a la insulina, lo que limita la capacidad de la insulina para pasar desde el lumen intestinal al torrente sanguíneo.

5

Algunos de los esfuerzos por proporcionar una forma oral de la insulina se han centrado en proporcionar conjugados de insulina-oligómero. La insulina humana y muchas insulinas estrechamente relacionadas que se usan terapéuticamente contienen tres residuos de aminoácido que portan grupos amino principales libres. Los tres grupos amino principales, concretamente, el terminal N (grupos alfa-amino) de las cadenas A y B (Gly^{A1} y Phe^{B1}) y el grupo épsilon-amino de Lys^{B29}, pueden ser modificados por la conjugación con oligómeros. En función de las condiciones de reacción, la N-acilación de una insulina desprotegida conduce a una mezcla compleja de mono-, di- y tri-conjugados (p. ej., insulina mono-conjugada en Gly^{A1}, insulina mono-conjugada en Phe^{B1}, insulina mono-conjugada en Lys^{B29}, insulina di-conjugada en Gly^{A1} y Phe^{B1}, insulina di-conjugada en Gly^{A1} y Lys^{B29}, insulina di-conjugada en Phe^{B1} y Lys^{B29}, e insulina tri-conjugada en Gly^{A1}, Phe^{B1} y Lys^{B29}). Cuando se desea un conjugado en concreto, por ejemplo, insulina mono-conjugada en Lys^{B29}, puede resultar oneroso y/o caro separar (o purificar) tal mezcla compleja de conjugados para obtener el conjugado deseado.

10

15

Como resultado de ello, se han realizado diversos esfuerzos por sintetizar selectivamente el conjugado de insulina deseado. Por ejemplo, Muranishi y Kiso, en la solicitud de patente japonesa 1-254.699, proponen una síntesis en cinco etapas para preparar derivados de insulina de ácidos grasos. Los grupos A1- y B1-amino de la insulina son protegidos (o bloqueados) con p-metoxibenzoxi-carbonil-azida (pMZ). Tras la acilación con un éster de ácido graso, se eliminan los grupos de protección (bloqueo) para proporcionar insulina mono-acilada en Lys^{B29} con un ácido graso. Como otro ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.750.497, concedida a Havelund *et al.*, propone tratar la insulina humana con un reactivo de Boc (p. ej., di-*tert*-butil-dicarbonato) para formar insulina humana de (A1,B1)-diBoc, i.e., insulina humana en la que el extremo N-terminal de tanto la cadena A como de la cadena B está protegido por un grupo Boc. Tras una purificación opcional, p. ej., mediante CLAR, se introduce un grupo acilo lipófilo en el grupo ϵ -amino de Lys^{B29} permitiendo que el producto reaccione con un éster de N-hidroxisuccinimida de fórmula X-OSu, en la que X es el grupo acilo lipófilo que se va a introducir. En la etapa final, se usa ácido trifluoroacético para eliminar los grupos Boc y se aísla el producto, insulina humana N^{B29}-X.

30

Se han aplicado otros diversos esfuerzos para sintetizar de forma preferente el conjugado de insulina deseado con el fin de proporcionar una mezcla de conjugados en la que el conjugado de insulina deseado sea el producto preferido. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.646.242, concedida a Baker *et al.*, propone una reacción que se lleva a cabo sin el uso de grupos protectores amino. Baker propone la reacción de un éster graso activado con el grupo ϵ -amino de la insulina en condiciones básicas en un disolvente polar. La acilación del grupo ϵ -amino depende de la basicidad de la reacción. A un pH superior de 9,0, la reacción acila de forma preferente el grupo ϵ -amino de la lisina de B29 frente a los grupos α -amino. Los ejemplos 1 a 4 presentan rendimientos de reacción de la insulina mono-conjugada como un porcentaje de la cantidad inicial de insulina entre el 67,1% y el 75,5%. En el ejemplo 5, Baker también propone la acilación de la proinsulina humana con N-succinimidil-palmitato. No se calcularon las proporciones exactas entre la especie ϵ -amino acilada y la especie α -amino acilada. La suma de todas las especies ϵ -amino aciladas del cromatograma representaban el 87-90% de la superficie total, mientras que la suma de todas las sustancias relacionadas (que incluirían presumiblemente cualquier especie α -amino acilada) representaron < 7% de la superficie total, para cualquier punto temporal dado.

35

40

Es deseable proporcionar procedimientos de síntesis específica de sitio de conjugados concretos deseados de insulina-oligómero que puedan ser menos onerosos y/o más rentables que los procedimientos convencionales descritos anteriormente.

45

50 Resumen de la invención

Cuando se comparan con los esquemas convencionales descritos anteriormente, las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar un esquema de fabricación comercialmente menos caro y/o más productivo para generar monoconjugados de insulina-oligómero en los que la conjugación de sitio específico es deseable (p. ej., en los que es deseable proporcionar un monoconjugado de insulina que tenga un oligómero acoplado a Lys de B-29 de la molécula de insulina). A diferencia de los esquemas convencionales descritos anteriormente, que proponen la conjugación selectiva de la insulina bloqueando los terminales N de la insulina con compuestos, tales como p-metoxibenzoxi-carbonil-azida (Muranishi y Kiso) o intentando controlar las condiciones de reacción para reducir, pero no eliminar, la conjugación en los terminales N de la insulina (Baker), las realizaciones de la presente invención acoplan el oligómero a Lys de B-29 de la proinsulina o de la proinsulina artificial (p. ej., proinsulina acoplada en el terminal N de su cadena B con un péptido líder). El péptido C y el péptido líder es entonces escindido del conjugado de proinsulina-oligómero para proporcionar insulina mono-conjugada en Lys de B-29 con el oligómero. Las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar una especificidad de sitio elevada para la modificación de Lys de B-29. Los procedimientos según las realizaciones de la presente invención que utilizan polipéptidos proinsulina pueden proporcionar producto modificado en B-29 de alta conversión, por ejemplo, que produce tanto como un 80% o más, en comparación con el obtenido mediante las rutas convencionales de la insulina.

65

Según realizaciones de la presente invención, un procedimiento para sintetizar un monoconjugado de insulina-oligómero comprende: (i) poner en contacto una proinsulina con un oligómero, en el que la proinsulina comprende una insulina que tiene una cadena A y una cadena B, y un péptido C conector acoplado en un primer extremo con el terminal C de la cadena B y acoplado en un segundo extremo con el terminal N de la cadena A mediante enlaces peptídicos, y un péptido líder acoplado al terminal N de la cadena B mediante un enlace peptídico, en el que los enlaces peptídicos son capaces de ser escindidos enzimáticamente para producir el monoconjugado de insulina-oligómero, y en el que el oligómero comprende un resto hidrófilo y un resto lipófilo, y en el que la proinsulina y el oligómero son puestos en contacto en condiciones suficientes para acoplar el oligómero al residuo de lisina de la parte de insulina de la proinsulina y proporcionar un monoconjugado de proinsulina-oligómero; y (ii) escindir enzimáticamente el péptido C y el péptido líder del monoconjugado de proinsulina-oligómero para proporcionar un monoconjugado de insulina-oligómero.

Según otra realización de la presente invención, un monoconjugado de proinsulina-oligómero comprende una proinsulina y un oligómero, en el que la proinsulina comprende una insulina que tiene una cadena A y una cadena B; un péptido C conector acoplado en un primer extremo con el terminal C de la cadena B y acoplado en un segundo extremo con el terminal N del polipéptido de la cadena A mediante enlaces peptídicos; y un péptido líder acoplado al terminal N del polipéptido de la cadena B mediante un enlace peptídico, y en el que el oligómero comprende un resto hidrófilo y un resto lipófilo, resto hidrófilo que comprende al menos un resto de polialquilenglicol, y en el que el oligómero está acoplado a un residuo de lisina de la parte de insulina de la proinsulina.

Según otra realización de la presente invención, un monoconjugado de insulina-oligómero comprende una insulina acoplada en una función amino de la posición B29 de la lisina a un resto oligomérico que tiene la siguiente estructura:



en la que: m es entre 1 y 30; n es entre 1 y 50; y R es alquilo.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra realizaciones de una ruta sintética para la preparación de insulina modificada en Lys de B-29 usando una proinsulina que tiene un péptido líder;

La Figura 2 ilustra un perfil de CLAR de la conjugación de proinsulina II;

La Figura 3 ilustra un espectro de EM del monoconjugado de proinsulina II purificado;

La Figura 4 ilustra un espectro de EM del diconjugado de proinsulina II purificado;

La Figura 5 ilustra un perfil de CLAR de la producción de monoconjugado de insulina-hexil-PEG₇;

La Figura 6 ilustra un espectro de EM del producto de la escisión con tripsina de un monoconjugado de proinsulina II;

La Figura 7 ilustra un perfil de CLAR de la escisión de insulina(Arg³¹)-hexil-PEG₇ por carboxi-peptidasa B;

La Figura 8 ilustra un espectro de EM del producto de la escisión con carboxi-peptidasa de un conjugado de insulina(Arg³¹) acilada en B-29-hexil-PEG₇;

La Figura 9 ilustra un perfil de CLAR de la producción de insulina-hexil-PEG₇ (polidispersado) a partir del monoconjugado de proinsulina II escindido mediante una mezcla enzimática de carboxi-peptidasa B y tripsina;

La Figura 10 ilustra un espectro de EM de insulina-hexil-PEG_n (polidispersado) mediante proinsulina II;

La Figura 11 ilustra un perfil de CLAR de la producción de insulina acilada en B-29-hexil-PEG₇ mediante proinsulina I;

La Figura 12 ilustra un espectro de EM de insulina acilada en B-29-hexil-PEG₇ mediante proinsulina I;

La Figura 13 ilustra un espectro de EM de la insulina (producto secundario) derivada de la mezcla de conjugados de proinsulina I;

La Figura 14 ilustra un perfil de CLAR del monoconjugado A de proinsulina I, el monoconjugado B de proinsulina I y el diconjugado de proinsulina I;

ES 2 333 781 T3

La Figura 15 ilustra un perfil de CLAR de la producción de monoconjugado de insulina-hexil-PEG₇ a partir de la reacción de diconjugado de proinsulina I con una mezcla enzimática de carboxi-peptidasa B y tripsina; y

La Figura 16 ilustra un perfil de CLAR de la producción de insulina (producto secundario) a partir de la reacción de monoconjugado A de proinsulina I con una mezcla enzimática de carboxi-peptidasa B y tripsina.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Ahora se describirá la presente invención más detalladamente en lo sucesivo con referencia a las figuras anexas, en las que se muestran las realizaciones preferidas de la invención. Sin embargo, esta invención puede ser realizada de muchas formas diferentes y no debería ser interpretada como aquélla que se limita a las realizaciones expuestas en la presente memoria; más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta revelación sea rigurosa y completa, y transmita totalmente el ámbito de la invención a los expertos en la técnica.

Como se usa en la presente memoria, el término “entre”, cuando se usa para describir diversos intervalos, debería ser interpretado como que incluye los extremos de los intervalos descritos.

Como se usa en la presente memoria, el término “sustancialmente monodispersado” se usa para describir una mezcla de compuestos, en la que al menos aproximadamente el 95 por cien de los compuestos de la mezcla tiene el mismo peso molecular.

Como se usa en la presente memoria, el término “monodispersado” se usa para describir una mezcla de compuestos, en la que aproximadamente el 100 por cien de los compuestos de la mezcla tiene el mismo peso molecular.

Como se usa en la presente memoria, el término “insulina” significa la insulina de una de las siguientes especies: de ser humano, vaca, cerdo, oveja, caballo, perro, pollo, pato o ballena, proporcionada mediante fuentes naturales, sintéticas o diseñadas genéticamente. En diversas realizaciones de la presente invención, la insulina es preferiblemente insulina humana.

Como se usa en la presente memoria, el término “análogo de insulina” significa insulina en la que se han reemplazado uno o más de los aminoácidos a la vez que se conserva una actividad biológica comparable a la de la insulina humana natural. El análogo se describe apuntando los aminoácidos de la sustitución con la posición de la sustitución en superíndice seguida por una descripción de la insulina. Por ejemplo, “insulina Pro^{B29}, humana” significa que la lisina comúnmente encontrada en la posición B29 de una molécula de insulina humana ha sido reemplazada por prolina.

Los análogos de insulina se pueden obtener mediante diversos procedimientos, como será entendido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden sustituir ciertos aminoácidos por otros aminoácidos en la estructura de insulina sin una pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión antigénica de anticuerpos o sitios de unión de moléculas sustrato. Como la capacidad interactiva y la naturaleza de la insulina definen su actividad funcional biológica, se pueden hacer ciertas sustituciones en la secuencia de aminoácidos, quedando no obstante un polipéptido con propiedades similares.

Al hacer tales sustituciones, se puede tener en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en conferir función biológica interactiva a un polipéptido es generalmente conocida en la técnica. Está aceptado que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye en la estructura secundaria del polipéptido resultante, lo que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. Se ha asignado a cada aminoácido un índice hidropático en base a su hidrofobicidad y a sus características de carga, como se presentan a continuación: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Como será entendido por los expertos en la técnica, es posible sustituir ciertos aminoácidos por otros aminoácidos que tengan una puntuación o un índice hidropático similar y seguir teniendo como resultado un polipéptido con una actividad biológica similar, i.e., seguir obteniendo un polipéptido funcionalmente equivalente biológico. Al hacer tales cambios, se prefiere la sustitución de los aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén en ± 2 entre sí, siendo particularmente preferidos aquéllos que estén en ± 1 entre sí, e incluso más particularmente preferidos aquéllos en $\pm 0,5$ entre sí.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar eficazmente en base a la hidrofiliidad. La patente estadounidense n.º 4.554.101 revela que la mayor hidrofiliidad media local de una proteína, gobernada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, está correlacionada con una propiedad biológica de la proteína. Como se explica detalladamente en la patente estadounidense n.º 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina ($\pm 3,0$); aspartato ($+3,0 \pm 1$); glutamato ($+3,0 \pm 1$); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina ($-0,5 \pm 1$); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Según lo entendido por los expertos en la técnica, es posible sustituir un aminoácido por otro que tenga un valor de hidrofiliidad similar y seguir obteniendo un polipéptido biológicamente equivalente y, en concreto, inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de los aminoácidos cuyos

ES 2 333 781 T3

valores de hidrofiliidad estén en ± 2 entre sí, siendo particularmente preferidos aquéllos que estén en ± 1 entre sí, e incluso más particularmente preferidos aquéllos en $\pm 0,5$ entre sí.

Como se explica resumidamente con anterioridad, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente, por tanto, en la similitud relativa de los sustituyentes de las cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Los ejemplos de sustituciones (i.e., aminoácidos que pueden ser intercambiados sin alterar significativamente la actividad biológica del polipéptido) que tienen diversas de las siguientes características en cuenta son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Como será entendido por los expertos en la técnica, los análogos de insulina se pueden preparar mediante una variedad de técnicas de síntesis de péptidos reconocidas, que incluyen, pero no se limitan a, procedimientos (de disolución) clásicos, procedimientos en fase sólida, procedimientos semisintéticos y procedimientos de ADN recombinante.

Los ejemplos de análogos de insulina humana incluyen, pero no se limitan a, insulina Gly^{A21}, humana; insulina Gly^{A21} Gln^{B3}, humana; insulina Ala^{A21}, humana; insulina Ala^{A21} Gln^{B3}, humana; insulina Gln^{B3}, humana; insulina Gln^{B30}, humana; insulina Gly^{A21} Glu^{B30}, humana; insulina Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30}, humana; insulina Gln^{B3} Glu^{B30}, humana; insulina Asp^{B28}, humana; insulina Lys^{B28}, humana; insulina Leu^{B28}, humana; insulina Val^{B28}, humana; insulina Ala^{B28}, humana; insulina Asp^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Lys^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Leu^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Val^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Ala^{B28} Pro^{B29}, humana.

Como se usa en la presente memoria, el término “proinsulina” significa la proinsulina de una de las siguientes especies: de ser humano, vaca, cerdo, oveja, caballo, perro, pollo, pato o ballena, proporcionada mediante fuentes naturales, sintéticas o diseñadas genéticamente. En general, la proinsulina consta de insulina que tiene un péptido C conectando el terminal N de la cadena A de la insulina con el terminal C de la cadena B de la insulina. En diversas realizaciones de la presente invención descritas en la presente memoria, la proinsulina es preferiblemente proinsulina humana.

Como se usa en la presente memoria, el término “análogo de proinsulina” significa proinsulina en la que uno o más aminoácidos de la proinsulina han sido reemplazados según lo descrito anteriormente con respecto a análogos de insulina. El análogo se describe apuntando los aminoácidos de la sustitución con la posición de la sustitución en superíndice seguida por una descripción de la proinsulina. Por ejemplo, “proinsulina Pro^{B29}, humana” significa que la lisina comúnmente encontrada en la posición B29 de una molécula de proinsulina humana ha sido reemplazada por prolina.

Como se usa en la presente memoria, el término “preproinsulina” significa la preproinsulina de una de las siguientes especies: de ser humano, vaca, cerdo, oveja, caballo, perro, pollo, pato o ballena, proporcionada mediante fuentes naturales, sintéticas o diseñadas genéticamente. En general, la preproinsulina es un polipéptido monocatenario (p. ej., un polipéptido que tiene un péptido líder acoplado al terminal N de la cadena B de la insulina y que tiene el terminal C de la cadena B acoplado al terminal N de la cadena A mediante un péptido conector) en el que la cadena A está acoplada a la cadena B mediante, por ejemplo, enlaces de tipo disulfuro. En las diversas realizaciones de la presente invención descritas en la presente memoria, la preproinsulina es preferiblemente preproinsulina humana.

Como se usa en la presente memoria, el término “análogo de preproinsulina” significa preproinsulina en la que uno o más aminoácidos de la preproinsulina han sido reemplazados según lo descrito anteriormente con respecto a análogos de insulina. El análogo se describe apuntando los aminoácidos de la sustitución con la posición de la sustitución en superíndice seguida por una descripción de la insulina.

Como se usa en la presente memoria, el término “péptido C” significa un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos del péptido C de la proinsulina de una de las siguientes especies: de ser humano, vaca, cerdo, oveja, caballo, perro, pollo, pato o ballena, proporcionada mediante fuentes naturales, sintéticas o diseñadas genéticamente. En diversas realizaciones de la presente invención descritas en la presente memoria, el péptido C es preferiblemente péptido C humano.

Como se usa en la presente memoria, el término “análogo de péptido C” significa péptido C en la que uno o más aminoácidos del péptido C han sido reemplazados según lo descrito anteriormente con respecto a análogos de insulina. Preferiblemente, el análogo de péptido C comprende el segmento pentapeptídico en el terminal C de un péptido C y/o el segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 de un péptido C. Cuando el análogo de péptido C comprende el segmento pentapeptídico, el segmento pentapeptídico está preferiblemente en el terminal C del análogo de péptido C. Más preferiblemente, el análogo de péptido C comprende el segmento tetrapeptídico en el terminal C de un péptido C y/o el segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 de un péptido C. Cuando el análogo de péptido C comprende el segmento tetrapeptídico, el segmento tetrapeptídico está preferiblemente en el terminal C del análogo de péptido C. El segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 de un péptido C descrito anteriormente es, preferiblemente, el segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 del péptido C humano.

Como se usa en la presente memoria, el término “fragmento de péptido C” significa un segmento de la secuencia de aminoácidos del péptido C que conserva parte de, sustancialmente toda o toda la actividad biológica del péptido C.

Preferiblemente, el fragmento de péptido C comprende el segmento pentapeptídico en el terminal C de un péptido C y/o el segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 de un péptido C. Cuando el fragmento de péptido C comprende el segmento pentapeptídico, el segmento pentapeptídico está preferiblemente en el terminal C del fragmento de péptido C. Más preferiblemente, el fragmento de péptido C comprende el segmento tetrapeptídico en el terminal C de un péptido C y/o el segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 de un péptido C. Cuando el fragmento de péptido C comprende el segmento tetrapeptídico, el segmento tetrapeptídico está preferiblemente en el terminal C del fragmento de péptido C. Incluso más preferiblemente, el fragmento de péptido C consta de un péptido seleccionado del grupo constituido por el segmento pentapeptídico del terminal C de un péptido C, el segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 de un péptido C y el segmento tetrapeptídico del terminal C de un péptido C. El segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 de un péptido C descrito anteriormente es, preferiblemente, el segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 del péptido C humano.

Como se usa en la presente memoria, el término “análogo de fragmento de péptido C” significa un segmento de la secuencia de aminoácidos de un péptido C, en el que uno o más de los aminoácidos del segmento han sido reemplazados según lo descrito anteriormente con referencia a los análogos de insulina a la vez que se conserva parte de, sustancialmente toda o toda la actividad biológica de la insulina. Preferiblemente, el análogo de fragmento de péptido C comprende el segmento pentapeptídico en el terminal C de un péptido C y/o el segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 de un péptido C. Cuando el análogo de fragmento de péptido C comprende el segmento pentapeptídico, el segmento pentapeptídico está preferiblemente en el terminal C del análogo de fragmento de péptido C. Más preferiblemente, el análogo de fragmento de péptido C comprende el segmento tetrapeptídico en el terminal C de un péptido C y/o el segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 de un péptido C. Cuando el análogo de fragmento de péptido C comprende el segmento tetrapeptídico, el segmento tetrapeptídico está preferiblemente en el terminal C del análogo de fragmento de péptido C. El segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 de un péptido C descrito anteriormente es, preferiblemente, el segmento nonapeptídico encontrado en las posiciones 11-19 del péptido C humano.

Como se usa en la presente memoria, el término “polipéptido péptido C” significa un polipéptido que tiene una utilidad terapéutica y una actividad biológica similares a la utilidad terapéutica y a la funcionalidad biológica de los péptidos C y/o fragmentos de péptido C descritos en J. Wahren *et al.*, “Role of C-peptide in Human Physiology”, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 278: E759-E768 (2000) y/o T. Forst *et al.*, “New Aspects on Biological Activity of C-peptide in IDDM Patients”, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 106: 270-276 (1998).

Por ejemplo, los polipéptidos péptido C tienen utilidad terapéutica que incluye, pero no se limita a, disminuir la hiperfiltración glomerular, aumentar la utilización de la glucosa del cuerpo entero y/o los músculos esqueléticos, mejorar la función nerviosa autonómica y/o redistribuir el flujo sanguíneo cutáneo microvascular. Los polipéptidos péptidos C tienen actividad biológica que incluye, pero no se limita a, la capacidad para estimular la actividad ATPasa de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, la capacidad para estimular la actividad óxido nítrico sintasa endotelial y/o la capacidad para unirse específicamente a superficies celulares (p. ej., en un receptor superficial acoplado a la proteína G) con la posterior activación de las rutas de señalización intracelular dependiente de Ca^{2+} . Los polipéptidos de péptido C tienen preferiblemente una velocidad de asociación constante para la unión a células endoteliales, células tubulares renales y fibroblastos de $\sim 3 \times 10^9 \text{M}^{-1}$. Los polipéptidos péptidos C son, preferiblemente, péptidos C, análogos de péptidos C, fragmentos de péptido C o análogos de fragmentos de péptido C.

Como se usa en la presente memoria, el término “polipéptido pro-péptido C” significa un polipéptido péptido C acoplado a uno o más péptidos que son escindibles para proporcionar el polipéptido péptido C.

Como se usa en la presente memoria, el término “cadena A” significa un polipéptido que es sustancialmente biológicamente equivalente a la cadena A de una molécula de insulina. Por ejemplo, las cadenas A pueden ser análogos de cadena A, que se pueden proporcionar según lo descrito anteriormente con respecto a análogos de insulina.

Como se usa en la presente memoria, el término “cadena B” significa un polipéptido que es sustancialmente biológicamente equivalente a la cadena B de una molécula de insulina. Por ejemplo, las cadenas B pueden ser análogos de cadena B, que se pueden proporcionar según lo descrito anteriormente con respecto a análogos de insulina.

Como se usa en la presente memoria, el término “polipéptido” significa un péptido que tiene dos o más residuos de aminoácido.

Como se usa en la presente memoria, el término “anfifilicalmente equilibrado” significa capaz de disolverse sustancialmente en agua y capaz de penetrar a través de membranas biológicas.

Como se usa en la presente memoria, el término “polialquilenglicol” se refiere a polímeros de polialquilenglicol lineales o ramificados, tales como polietilenglicol, polipropilenglicol y polibutilenglicol, e incluye el monoalquiléter del polialquilenglicol. El término “subunidad de polialquilenglicol” se refiere a una sola unidad de polialquilenglicol. Por ejemplo, una subunidad de polietilenglicol sería $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$.

Como se usa en la presente memoria, el término “lipófilo” significa la capacidad para disolverse en lípidos y/o la capacidad para penetrar, interactuar con y/o atravesar membranas biológicas, y el término “resto lipófilo” o “lipófilo” significa un resto que es lipófilo y/o que, cuando se une con otra entidad química, aumenta la lipofilia de tal entidad

química. Los ejemplos de restos lipófilos incluyen, pero no se limitan a, alquilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, colesteroles, adamantilos y similares.

5 Como se usa en la presente memoria, el término “alquilo inferior” se refiere a restos de alquilo sustituidos o no sustituidos que tienen de uno a cinco átomos de carbono.

Como se usa en la presente memoria, el término “alquilo superior” se refiere a restos de alquilo sustituidos o no sustituidos que tienen seis o más átomos de carbono.

10 Según realizaciones de la presente invención, los procedimientos para sintetizar un conjugado de insulina-oligómero comprenden: (i) poner en contacto una proinsulina con un oligómero, en el que la proinsulina comprende una insulina que tiene una cadena A y una cadena B, y un péptido C conector acoplado en un primer extremo con el terminal C de la cadena B y acoplado en un segundo extremo con el terminal N de la cadena A mediante enlaces peptídicos, y un péptido líder acoplado al terminal N de la cadena B mediante un enlace peptídico, en el que los enlaces peptídicos son capaces de ser escindidos enzimáticamente para producir el monoconjugado de insulina-oligómero, y en el que el oligómero comprende un resto hidrófilo y un resto lipófilo, y en el que la proinsulina y el oligómero son puestos en contacto en condiciones suficientes para acoplar el oligómero al residuo de lisina de la parte de insulina de la proinsulina y proporcionar un monoconjugado de proinsulina-oligómero; y (ii) escindir enzimáticamente el péptido C y el péptido líder del monoconjugado de proinsulina-oligómero para proporcionar un monoconjugado de insulina-oligómero. Por ejemplo, es posible sintetizar conjugados de insulina-oligómero según lo descrito en los ejemplos proporcionados más adelante. En la Figura 1, se proporciona una realización de una ruta de síntesis.

25 La proinsulina puede ser diversas proinsulinas que comprenden una insulina acoplada a uno o más péptidos mediante enlace(s) peptídicos capaces de ser escindidos para producir la insulina, como los expertos en la técnica entenderán. En algunas realizaciones, el polipéptido proinsulina es un análogo de proinsulina que tiene un péptido líder. El análogo de proinsulina que tiene un péptido líder es producido por Itoham Foods, Inc. de Ibaraki Pref, Japón. El péptido líder y el péptido C del análogo de proinsulina carecen cada uno de residuos de lisina. En otras realizaciones, la proinsulina es una proinsulina producida por Biobras de Belo Horizonte, Brasil. La proinsulina tiene un péptido líder acoplado al terminal N de la cadena B de la proinsulina. El péptido líder carece de residuos de lisina.

30 La insulina tiene preferiblemente una cadena A y una cadena B. La cadena A carece preferiblemente de residuos de lisina. La cadena B comprende preferiblemente un solo residuo de lisina. La cadena A y la cadena B están preferiblemente entrecruzadas y, más preferiblemente, se entrecruzan usando uno o más enlaces de tipo disulfuro. Incluso más preferiblemente, la cadena A y la cadena B comprenden cada una residuos de cisteína, uno o más de los cuales están acoplados usando uno o más enlaces de tipo disulfuro para entrecruzar el polipéptido de la cadena A con el polipéptido de la cadena B.

35 La proinsulina tiene un péptido conector (péptido C) acoplado en un primer extremo con el terminal C de la cadena B de la insulina y acoplado en un segundo extremo con el terminal N de la cadena A de la insulina. En algunas realizaciones, el péptido conector carece de residuos de lisina. Estas realizaciones pueden utilizar menos reactivos oligoméricos reduciendo el número posibles sitios de conjugación en la molécula de proinsulina.

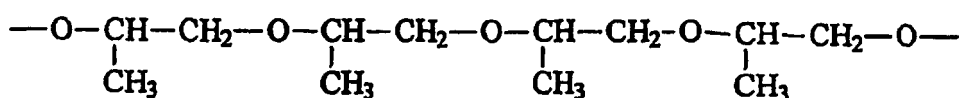
40 La proinsulina también tiene un péptido líder que está acoplado al terminal N de la cadena B. En general, la secuencia de aminoácidos del péptido líder es irrelevante. En algunas realizaciones, el péptido líder carece de residuos de lisina. Estas realizaciones pueden reducir la cantidad de reactivo oligomérico usado limitando el número sitios de conjugación en la molécula de proinsulina.

45 Los enlaces peptídicos son enlaces que pueden ser escindidos de diversos modos, como será entendido por los expertos en la técnica. Específicamente, los enlaces peptídicos son enlaces que pueden ser escindidos enzimáticamente por enzimas incluyendo, pero no limitándose a, tripsina, carboxi-peptidasa B, trombina, pepsina y quimiotripsina. Los enlaces peptídicos que pueden ser escindidos enzimáticamente serán conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, Arg-Arg, Thr-Arg, Ala-Arg, Thr-Arg-Arg, Thr-Lys, Arg-Gly y Arg-Phe.

50 El oligómero puede ser diversos oligómeros como será entendido por los expertos en la técnica. En general, el oligómero puede ser cualquier oligómero capaz de ser acoplado a un polipéptido como será entendido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el oligómero puede ser un oligómero polidispersado según lo descrito en la patente estadounidense n.º 4.179.337, concedida a Davis *et al.*; la patente estadounidense n.º 5.567.422, concedida a Greenwald; la patente estadounidense n.º 5.359.030, concedida a Ekwuribe; la patente estadounidense n.º 5.438.040, concedida a Ekwuribe; la patente estadounidense n.º 5.681.811, concedida a Ekwuribe y la patente estadounidense n.º 6.309.633, concedida a Ekwuribe *et al.* Como otro ejemplo, el oligómero puede ser un oligómero no polidispersado según lo descrito en el documento US 2003-0004304 (solicitud de patente estadounidense, n.º de serie 09/873.731 presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe *et al.*, titulada “Methods of Synthesizing Substantially Monodispersed Mixtures of Polymers Having Polyethylene Glycol Mixtures”); documento US 2003-0228275 (solicitud de patente estadounidense, n.º de serie 09/873.797 presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe *et al.*, titulada “Mixtures of Drug-Oligomer Conjugates Comprising Polyalkylene Glycol, Uses Thereof, and Methods of Making Same”); y el documento US 2003-0027748 (solicitud de patente estadounidense, n.º de serie 09/873.899 presentada el 4 de junio 2001 por Ekwuribe *et al.*, titulada “Mixtures of Insulin Drug-Oligomer Conjugates Comprising Polyalkylene Glycol, Uses Thereof, and Methods of Making Same”).

ES 2 333 781 T3

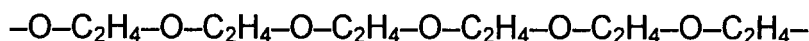
En algunas realizaciones, el oligómero comprende un resto hidrófilo como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, polialquilenglicoles, tales como polietilenglicol o polipropilenglicol, polioles polioxiétlenados, copolímeros de los mismos y copolímeros en bloques de los mismos, con la condición de que se mantenga la hidrofiliadad de los copolímeros en bloques. El resto hidrófilo es preferiblemente un resto de polialquilenglicol. El resto de polialquilenglicol tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 subunidades de polialquilenglicol. El resto de polialquilenglicol tiene preferiblemente entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más subunidades de polialquilenglicol. El resto de polialquilenglicol tiene, más preferiblemente, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5 ó 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 subunidades de polialquilenglicol. Incluso más preferiblemente, el resto de polialquilenglicol tiene entre un límite inferior de 3, 4, 5 ó 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 subunidades de polialquilenglicol. Es todavía más preferible que el resto de polialquilenglicol tenga entre un límite inferior de 4, 5 ó 6 y un límite superior de 6, 7 ó 8 subunidades de polialquilenglicol. Lo más preferible es que el resto de polialquilenglicol tenga 7 subunidades de polialquilenglicol. El resto de polialquilenglicol del oligómero es preferiblemente un resto de polialquilenglicol de alquilo inferior, tal como un resto de polietilenglicol, un resto de polipropilenglicol o un resto de polibutilenglicol. Cuando el resto de polialquilenglicol es un resto de polipropilenglicol, el resto tiene preferiblemente una estructura uniforme (i.e., no aleatoria). Un ejemplo de resto de polipropilenglicol que tiene una estructura uniforme es el siguiente:



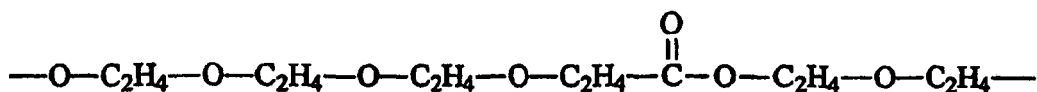
Esta estructura de polipropilenglicol uniforme puede ser descrita como aquella que sólo tiene un átomo de carbono sustituido por metilo adyacente a cada átomo de oxígeno de la cadena de polipropilenglicol. Tales restos de polipropilenglicol uniformes pueden presentar características tanto lipófilas como hidrófilas.

El oligómero puede comprender uno o más restos distintos como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, más restos hidrófilos, restos lipófilos, restos espaciadores, restos ligadores y restos de terminación. Los diversos restos del oligómero están acoplados covalentemente entre sí por enlaces bien hidrolizables o no hidrolizables.

El oligómero puede comprender además uno o más restos hidrófilos adicionales (i.e., restos además del resto de polialquilenglicol), incluyendo, pero no limitándose a, azúcares, polialquilenglicoles y copolímeros de poliamina/PEG. Los restos de polialquilenglicol adyacentes serán considerados el mismo resto si están acoplados por enlaces de tipo éter. Por ejemplo, el resto:



es un resto de polietilenglicol que tiene seis subunidades de polietilenglicol. Si este resto fuera el único resto hidrófilo del oligómero, el oligómero no contendría un resto hidrófilo más. Los restos de polietilenglicol adyacentes serán considerados restos diferentes si están acoplados por un enlace distinto del de tipo éter. Por ejemplo, el resto:



es un resto de polietilenglicol que tiene cuatro subunidades de polietilenglicol y un resto hidrófilo más que tiene dos subunidades de polietilenglicol. Preferiblemente, los oligómeros según las realizaciones de la presente invención comprenden un resto de polialquilenglicol sin más restos hidrófilos.

Preferiblemente, el oligómero comprende además uno o más restos lipófilos como será entendido por los expertos en la técnica. El resto lipófilo tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono. El resto lipófilo tiene preferiblemente entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 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 ó 30 átomos de carbono. El resto lipófilo tiene, más preferiblemente, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 átomos de carbono. El resto lipófilo tiene, incluso más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 átomos de carbono. El resto lipófilo tiene, todavía más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6 ó 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9 ó 10 átomos de carbono. Lo más preferible es que el resto lipófilo tenga 6 átomos de carbono. El resto lipófilo se selecciona preferiblemente del grupo constituido por restos de alquilo lineales o ramificados, saturados o insaturados, restos de ácido graso lineales o ramificados, saturados o insaturados, colesterol y adamantano. Los ejemplos de restos de alquilo incluyen, pero no se limitan a, restos de alquilo lineales saturados, tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo,

ES 2 333 781 T3

tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo y eicosilo; restos de alquilo ramificados saturados, tales como isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metil-pentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo; y restos de alquilo insaturados derivados de los anteriores restos de alquilo saturados que incluyen, pero no se limitan a, vinilo, alililo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo y 2-propinilo. Los ejemplos de restos de ácido graso incluyen, pero no se limitan a, restos de ácido graso insaturados, tales como lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato y docosahexaenoato; y restos de ácido graso saturados, tales como acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato y cerotato.

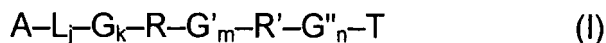
El oligómero puede comprender además uno o más restos espaciadores como será entendido por los expertos en la técnica. Los restos espaciadores se pueden usar, por ejemplo, para separar un resto hidrófilo de un resto lipófilo, para separar un resto lipófilo o un resto hidrófilo del polipéptido proinsulina, para separar un primer resto hidrófilo o lipófilo de un segundo resto hidrófilo o lipófilo, o para separar un resto hidrófilo o un resto lipófilo de un resto ligador. Los restos espaciadores, preferiblemente, son seleccionados del grupo constituido por restos de azúcar, colesterol y glicerina. Los restos de azúcar pueden ser diversos restos de azúcar como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, restos de monosacáridos y restos de disacáridos. Los restos de monosacáridos preferidos tienen entre 4 y 6 átomos de carbono.

El oligómero puede comprender además uno o más restos ligadores que se usan para unir el oligómero con el polipéptido proinsulina como será entendido por los expertos en la técnica. Los restos ligadores se seleccionan preferiblemente del grupo constituido por restos de alquilo y de ácido graso. El resto ligador de alquilo puede ser un resto de alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metil-pentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alililo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo y 2-propinilo. El resto de alcoxilo puede ser diversos restos de alcoxilo, incluyendo, pero no limitándose a metoxilo, etoxilo, propoxilo, butoxilo, pentiloxilo, hexiloxilo, heptiloxilo, octiloxilo, noniloxilo, deciloxilo, undeciloxilo, dodeciloxilo, trideciloxilo, tetradeciloxilo, pentadeciloxilo, hexadeciloxilo, octadeciloxilo, nonadeciloxilo, eicosiloxilo, isopropoxilo, *sec*-butoxilo, *terc*-butoxilo, 2-metilbutoxilo, *terc*-pentiloxilo, 2-metilpentiloxilo, 3-metilpentiloxilo, 2-etilhexiloxilo, 2-propilpentiloxilo, viniloxilo, alliloxilo, 1-buteniloxilo, 2-buteniloxilo, etiniloxilo, 1-propiniloxilo y 2-propiniloxilo. El resto ligador de alquilo puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 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 ó 30 átomos de carbono, y preferiblemente tiene entre 1, 2, 3, 4 ó 5 y 8, 9, 10, 11 ó 12 átomos de carbono. El resto ligador de ácido graso puede ser un resto de ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato y docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato y cerotato. El resto ligador de ácido graso puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 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 ó 30 átomos de carbono, y preferiblemente tiene entre 1, 2, 3, 4 ó 5 y 8, 10, 12, 14 ó 16 átomos de carbono.

El oligómero puede comprender además uno o más restos de terminación en uno o más extremos del oligómero, que no están acoplados al polipéptido insulina. El resto de terminación es preferiblemente un resto de alquilo o alcoxilo. El resto de alquilo o alcoxilo tiene preferiblemente entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 átomos de carbono. El resto de alquilo o alcoxilo tiene, más preferiblemente, entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 átomos de carbono. El resto de alquilo o alcoxilo tiene, incluso más preferiblemente, entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4 ó 5 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 átomos de carbono. El resto de alquilo o alcoxilo tiene, todavía más preferiblemente, entre un límite inferior de 1, 2, 3 ó 4 y un límite superior de 5, 6 ó 7 átomos de carbono. El resto de alquilo puede ser un resto de alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metil-pentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alililo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo y 2-propinilo. El resto de alcoxilo puede ser diversos restos de alcoxilo, incluyendo, pero no limitándose a metoxilo, etoxilo, propoxilo, butoxilo, pentiloxilo, hexiloxilo, heptiloxilo, octiloxilo, noniloxilo, deciloxilo, undeciloxilo, dodeciloxilo, trideciloxilo, tetradeciloxilo, pentadeciloxilo, hexadeciloxilo, octadeciloxilo, nonadeciloxilo, eicosiloxilo, isopropoxilo, *sec*-butoxilo, *terc*-butoxilo, 2-metilbutoxilo, *terc*-pentiloxilo, 2-metilpentiloxilo, 3-metilpentiloxilo, 2-etilhexiloxilo, 2-propilpentiloxilo, viniloxilo, alliloxilo, 1-buteniloxilo, 2-buteniloxilo, etiniloxilo, 1-propiniloxilo y 2-propiniloxilo. El resto de terminación es, más preferiblemente, un resto de alquilo inferior, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo o *terc*-pentilo, o un resto de alcoxilo inferior, tal como metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, butoxilo, *sec*-butoxilo, *terc*-butoxilo, pentiloxilo o *terc*-pentiloxilo. Lo más preferible es que el resto de terminación sea metilo o metoxilo. Aunque el resto de terminación es preferiblemente un resto de alquilo o alcoxilo, se entenderá que el resto de terminación puede ser diversos restos como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, azúcares, colesterol, alcoholes y ácidos grasos.

ES 2 333 781 T3

Según otras realizaciones de la presente invención, el oligómero comprende la estructura de fórmula I:



en la que:

A es un resto activable;

L es un resto ligador;

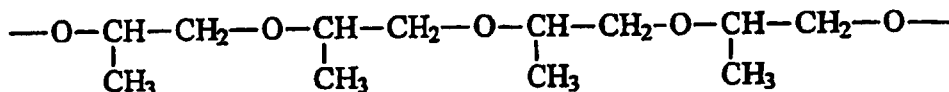
G, G' y G'' son restos espaciadores seleccionados individualmente;

R es un resto lipófilo y R' es un resto de polialquilenglicol, o R' es el resto lipófilo y R es el resto de polialquilenglicol;

T es un resto de terminación; y

j, k, m y n son individualmente 0 ó 1.

Según estas realizaciones de la presente invención, el resto de polialquilenglicol tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 subunidades de polialquilenglicol. El resto de polialquilenglicol tiene preferiblemente entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más subunidades de polialquilenglicol. El resto de polialquilenglicol tiene, más preferiblemente, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5 ó 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 subunidades de polialquilenglicol. Incluso más preferiblemente, el resto de polialquilenglicol tiene entre un límite inferior de 3, 4, 5 ó 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 subunidades de polialquilenglicol. Es todavía más preferible que el resto de polialquilenglicol tenga entre un límite inferior de 4, 5 ó 6 y un límite superior de 6, 7 ó 8 subunidades de polialquilenglicol. Lo más preferible es que el resto de polialquilenglicol tenga 7 subunidades de polialquilenglicol. El resto de polialquilenglicol del oligómero es preferiblemente un resto de polialquilenglicol de alquilo inferior, tal como un resto de polietilenglicol, un resto de polipropilenglicol o un resto de polibutilenglicol. Cuando el resto de polialquilenglicol es un resto de polipropilenglicol, el resto tiene preferiblemente una estructura uniforme (i.e., no aleatoria). Un ejemplo de resto de polipropilenglicol que tiene una estructura uniforme es el siguiente:



Esta estructura de polipropilenglicol uniforme se puede describir como aquella que sólo tiene un átomo de carbono sustituido por metilo adyacente a cada átomo de oxígeno de la cadena de polipropilenglicol. Tales restos de polipropilenglicol uniformes pueden presentar características tanto lipófilas como hidrófilas.

Según estas realizaciones de la presente invención, el resto lipófilo es un resto lipófilo según lo entendido por los expertos en la técnica. El resto lipófilo tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono. El resto lipófilo tiene preferiblemente entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 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 ó 30 átomos de carbono. El resto lipófilo tiene más preferiblemente entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 átomos de carbono. El resto lipófilo tiene, incluso más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 átomos de carbono. El resto lipófilo tiene, todavía más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6 ó 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9 ó 10 átomos de carbono. Lo más preferible es que el resto lipófilo tenga 6 átomos de carbono. El resto lipófilo se selecciona preferiblemente del grupo constituido por restos de alquilo lineales o ramificados, saturados o insaturados, restos de ácido graso lineales o ramificados, saturados o insaturados, colesterol y adamantano. Los ejemplos de restos de alquilo incluyen, pero no se limitan a, restos de alquilo lineales saturados, tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo y eicosilo; restos de alquilo ramificados saturados, tales como isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metil-pentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo; y restos de alquilo insaturados derivados de los anteriores restos de alquilo saturados que incluyen, pero no se limitan a, vinilo, alililo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo y 2-propinilo. Los ejemplos de restos de ácido graso incluyen, pero no se limitan a, restos de ácido graso insaturados, tales como lauroleato, miristoleato, palmítoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato y docosahexaenoato; y restos de ácido graso saturados, tales como acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato y cerotato.

ES 2 333 781 T3

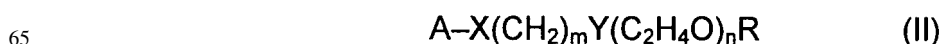
Según estas realizaciones de la presente invención, los restos espaciadores, G, G' y G'', son restos espaciadores como será entendido por los expertos en la técnica. Los restos espaciadores, preferiblemente, son seleccionados del grupo constituido por restos de azúcar, colesterol y restos de glicerina. Los restos de azúcar pueden ser diversos restos de azúcar como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, restos de monosacáridos y restos de disacáridos. Los restos de monosacáridos preferidos tienen entre 4 y 6 átomos de carbono. Preferiblemente, los oligómeros de estas realizaciones no incluyen restos espaciadores (i.e., k, m y n son preferiblemente 0).

Según estas realizaciones de la presente invención, el resto ligador, L, puede ser usado para acoplar el oligómero con el fármaco como será entendido por los expertos en la técnica. Los restos ligadores se seleccionan preferiblemente del grupo constituido por restos de alquilo y de ácido graso. El resto ligador de alquilo puede ser un resto de alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metil-pentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo y 2-propinilo. El resto de alcoxilo puede ser diversos restos de alcoxilo, incluyendo, pero no limitándose a metoxilo, etoxilo, propoxilo, butoxilo, pentiloxilo, hexiloxilo, heptiloxilo, octiloxilo, noniloxilo, deciloxilo, undeciloxilo, dodeciloxilo, trideciloxilo, tetradeciloxilo, pentadeciloxilo, hexadeciloxilo, octadeciloxilo, nonadeciloxilo, eicosiloxilo, isopropoxilo, *sec*-butoxilo, *terc*-butoxilo, 2-metilbutoxilo, *terc*-pentiloxilo, 2-metilpentiloxilo, 3-metilpentiloxilo, 2-etilhexiloxilo, 2-propilpentiloxilo, viniloxilo, alililoxilo, 1-buteniloxilo, 2-buteniloxilo, etiniloxilo, 1-propiniloxilo y 2-propiniloxilo. El resto ligador de alquilo puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 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 ó 30 átomos de carbono, y preferiblemente tiene entre 1, 2, 3, 4 ó 5 y 8, 9, 10, 11 ó 12 átomos de carbono. El resto ligador de ácido graso puede ser un resto de ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato y cerotato. El resto ligador de ácido graso puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 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 ó 30 átomos de carbono, y preferiblemente tiene entre 1, 2, 3, 4 ó 5 y 8, 10, 12, 14 ó 16 átomos de carbono.

Según estas realizaciones de la presente invención, el resto de terminación, T, es preferiblemente un resto de alquilo o alcoxilo. El resto de alquilo o alcoxilo tiene preferiblemente entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 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 ó 30 átomos de carbono. El resto de alquilo o alcoxilo tiene, más preferiblemente, entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 átomos de carbono. El resto de alquilo o alcoxilo tiene, incluso más preferiblemente, entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4 ó 5 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 átomos de carbono. El resto de alquilo o alcoxilo tiene, todavía más preferiblemente, entre un límite inferior de 1, 2, 3 ó 4 y un límite superior de 5, 6 ó 7 átomos de carbono. El resto de alquilo puede ser diversos restos de alquilo lineales o ramificados, saturados o insaturados, como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metil-pentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo y 2-propinilo. Los restos de alcoxilo ejemplares pueden ser diversos restos de alcoxilo, incluyendo, pero no limitándose a metoxilo, etoxilo, propoxilo, butoxilo, pentiloxilo, hexiloxilo, heptiloxilo, octiloxilo, noniloxilo, deciloxilo, undeciloxilo, dodeciloxilo, trideciloxilo, tetradeciloxilo, pentadeciloxilo, hexadeciloxilo, octadeciloxilo, nonadeciloxilo, eicosiloxilo, isopropoxilo, *sec*-butoxilo, *terc*-butoxilo, 2-metilbutoxilo, *terc*-pentiloxilo, 2-metilpentiloxilo, 3-metilpentiloxilo, 2-etilhexiloxilo, 2-propilpentiloxilo, viniloxilo, alililoxilo, 1-buteniloxilo, 2-buteniloxilo, etiniloxilo, 1-propiniloxilo y 2-propiniloxilo. El resto de terminación es, más preferiblemente, un resto de alquilo inferior, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo o *terc*-pentilo, o un resto de alcoxilo inferior, tal como metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, butoxilo, *sec*-butoxilo, *terc*-butoxilo, pentiloxilo o *terc*-pentiloxilo. Lo más preferible es que el resto de terminación sea metilo o metoxilo. Aunque el resto de terminación es preferiblemente un resto de alquilo o alcoxilo, se entenderá que el resto de terminación puede ser diversos restos como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, restos de azúcar, colesterol, alcoholes y restos de ácidos grasos.

Según estas realizaciones de la presente invención, el resto activable, A, es un resto que permite el acoplamiento del oligómero a un agente de activación para formar un oligómero activado capaz de acoplarse con el polipéptido proinsulina. El resto activable puede ser diversos restos activables como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no se limitándose a, -C(O)-OH, C(S)-OH, -C(S)-SH, -OH, -SH y NH₂.

En otras realizaciones más, el oligómero comprende la estructura de fórmula II:



ES 2 333 781 T3

en la que:

A es -C(O)-OH, C(S)-OH, -C(S)-SH, -OH, -SH o NH₂;

5 X es un átomo de oxígeno o un enlace covalente con la condición de que X no sea un átomo de oxígeno cuando A sea -OH;

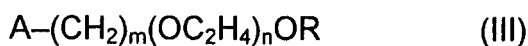
Y es un resto de unión de éster, de éter, de carbamato, de carbonato o de amida, y es, preferiblemente, un resto de unión de éter;

10 m está entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 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 ó 30, estando, más preferiblemente, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó 22, estando, incluso más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14, y estando, incluso todavía más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6 ó 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9 ó 10;

15 n está entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50, estando, más preferiblemente, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5 ó 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20, estando, incluso más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5 ó 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 subunidades de polialquilenglicol, y estando, incluso todavía más preferiblemente, entre un límite inferior de 4, 5 ó 6 y un límite superior de 6, 7 ó 8 subunidades de polialquilenglicol, y siendo lo más preferible 7; y

25 R es un resto de alquilo, un resto de azúcar, colesterol, adamantano, un resto de alcohol o un resto de ácido graso. El resto de alquilo puede ser un resto de alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metil-pentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo y 2-propinilo. El resto de alquilo es, más preferiblemente, un resto de alquilo inferior, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo o *terc*-pentilo. El resto de alquilo es, todavía más preferiblemente, un alquilo(C₁-C₃). Lo más preferible es que el resto de alquilo sea metilo. El resto de ácido graso puede ser un resto de ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato y cerotato.

40 En otras realizaciones más, el oligómero comprende la estructura de fórmula III:



45 en la que:

A es -C(O)-OH, C(S)-OH, -C(S)-SH, -OH, -SH o NH₂;

50 m está entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 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 ó 30 estando, más preferiblemente, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó 22, estando, incluso más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14, y estando, incluso todavía más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6 ó 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9 ó 10;

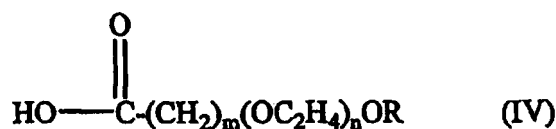
55 n está entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50, estando, más preferiblemente, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5 ó 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20, estando, incluso más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5 ó 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 subunidades de polialquilenglicol, y estando, incluso todavía más preferiblemente, entre un límite inferior de 4, 5 ó 6 y un límite superior de 6, 7 ó 8 subunidades de polialquilenglicol, y siendo lo más preferiblemente 7; y

65 R es un resto de alquilo, un resto de azúcar, colesterol, adamantano, un resto de alcohol o un resto de ácido graso. El resto de alquilo puede ser un resto de alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metil-pentilo, 3-metilpentilo,

ES 2 333 781 T3

2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo y 2-propinilo. El resto de alquilo es, más preferiblemente, un resto de alquilo inferior, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo o *terc*-pentilo. El resto de alquilo es, todavía más preferiblemente, un alquilo(C₁-C₃). Lo más preferible es que el resto de alquilo sea metilo. El resto de ácido graso puede ser un resto de ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato y cerotato.

En incluso otras realizaciones más, el oligómero comprende la estructura de fórmula IV:



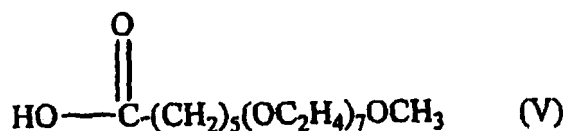
en la que:

m está entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 20, 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 ó 30 estando, más preferiblemente, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó 22, estando, incluso más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14, y estando, incluso todavía más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6 ó 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9 ó 10;

n está entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50, estando, más preferiblemente, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5 ó 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20, estando, incluso más preferiblemente, entre un límite inferior de 3, 4, 5 ó 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 subunidades de polialquilenglicol, y estando, incluso todavía más preferiblemente, entre un límite inferior de 4, 5 ó 6 y un límite superior de 6, 7 ó 8 subunidades de polialquilenglicol, y siendo lo más preferible 7; y

R es un resto de alquilo, un resto de azúcar, colesterol, adamantano, un resto de alcohol o un resto de ácido graso. El resto de alquilo puede ser un resto de alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metil-pentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo y 2-propinilo. El resto de alquilo es, más preferiblemente, un resto de alquilo inferior, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo o *terc*-pentilo. El resto de alquilo es, todavía más preferiblemente, un alquilo(C₁-C₃). Lo más preferible es que el resto de alquilo sea metilo. El resto de ácido graso puede ser un resto de ácido graso lineal o ramificado, saturado o insaturado como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato y cerotato.

En otras realizaciones más, el oligómero comprende la estructura de fórmula V:



En las diversas realizaciones descritas anteriormente, el oligómero está acoplado covalentemente a insulina. En algunas realizaciones, el oligómero está acoplado a insulina utilizando un enlace hidrolizable (p. ej., un enlace de éster o carbonato). Un acoplamiento hidrolizable puede proporcionar un conjugado de insulina-oligómero que actúa como un profármaco. En ciertos casos, por ejemplo, cuando el conjugado de insulina-oligómero es biológicamente inactivo (i.e., el conjugado carece de la capacidad de ejercer un efecto en el cuerpo mediante el mecanismo de acción principal del polipéptido insulina), un acoplamiento hidrolizable puede proporcionar un efecto de liberación en el tiempo o de liberación controlada, proporcionando la insulina biológicamente activa durante un período de tiempo dado cuando uno o más oligómeros son escindidos de sus respectivos conjugados de insulina-oligómero biológicamente inactivos para proporcionar la insulina biológicamente activa. En otras realizaciones, el oligómero está acoplado a insulina

utilizando un enlace no hidrolizable (p. ej., un enlace de carbamato, amida o éter). El uso de un enlace no hidrolizable puede ser preferible cuando se desee permitir la circulación del conjugado de insulina-oligómero biológicamente inactivo en el torrente sanguíneo durante un período de tiempo prolongado, preferiblemente, durante al menos 2 horas. Cuando el oligómero está acoplado a la insulina utilizando un resto de unión que comprende un resto de carbonilo, tal como un resto de unión de éster, de carbamato, de carbonato o de amida, el conjugado de insulina-oligómero resultante es un conjugado de insulina-oligómero de acilo.

Los oligómeros empleados en las diversas realizaciones descritas anteriormente se encuentran comercialmente disponibles o se pueden sintetizar mediante diversos procedimientos, como será entendido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, es posible sintetizar oligómeros polidispersados mediante los procedimientos proporcionados en una o más de las siguientes referencias: la patente estadounidense n.º 4.179.337, concedida a Davis *et al.*, la patente estadounidense n.º 5.567.422, concedida de Greenwald; la patente estadounidense n.º 5.359.030, concedida a Ekwuribe; la patente estadounidense n.º 5.438.040, concedida a Ekwuribe; la patente estadounidense n.º 5.681.811, concedida a Ekwuribe; la patente estadounidense n.º 6.309.633, concedida a Ekwuribe *et al.* Los oligómeros no polidispersados (p. ej., sustancialmente monodispersados y monodispersados) se pueden sintetizar mediante los procedimientos proporcionados en una o más de las siguientes referencias: documento US 2003-0004304 (solicitud de patente estadounidense n.º de serie 09/873.731, presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe *et al.*, titulada "Methods of Synthesizing Substantially Monodispersed Mixtures of Polymers Having Polyethylene Glycol Mixtures"); documento US 2003-0228275 (solicitud de patente estadounidense n.º de serie 09/873.797, presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe *et al.*, titulada "Mixtures of Drug-Oligomer Conjugates Comprising Polyalkylene Glycol, Uses Thereof, and Methods of Making Same"); y el documento US 2003-0027748 (solicitud de patente estadounidense n.º de serie 09/873.899, presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe *et al.*, titulada "Mixtures of Insulin Drug-Oligomer Conjugates Comprising Polyalkylene Glycol, Uses Thereof, and Methods of Making Same"). Los oligómeros según las realizaciones de la presente invención son preferiblemente sustancialmente monodispersados y, más preferiblemente, monodispersados. Los ejemplos de procedimientos para sintetizar los oligómeros monodispersados preferidos se proporcionan en los Ejemplos 1 a 10 que figuran a continuación.

La puesta en contacto de la proinsulina con el oligómero en condiciones suficientes para proporcionar un conjugado de proinsulina-oligómero se puede realizar utilizando diversas condiciones, como será entendido por los expertos en la técnica. Preferiblemente, la puesta en contacto de la proinsulina con el oligómero en condiciones suficientes para proporcionar un conjugado de proinsulina-oligómero comprende poner en contacto el oligómero con un agente de activación en condiciones suficientes para proporcionar un oligómero activado; y poner en contacto el oligómero activado con la proinsulina en condiciones suficientes para proporcionar el conjugado de proinsulina. El oligómero activado se puede formar *ex situ* o *in situ*.

El agente de activación puede ser diversos agentes de activación capaces de activar uno o más de los oligómeros descritos anteriormente tal que el oligómero sea capaz de reaccionar con funciones hidroxilo nucleófilas y/o funciones amino en el polipéptido proinsulina, como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, *N*-hidroxisuccinimida, *p*-nitrofenil-cloroformiato, 1,3-diciclohexilcarbodiimida e hidroxibenzotriazida.

El experto en la técnica entenderá las condiciones suficientes para acoplar el agente de activación al oligómero para proporcionar un oligómero activado. Por ejemplo, el experto en la técnica puede referirse a R. C. Larock, "COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS. A GUIDE TO FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS" (II edición, Nueva York, Wiley-VCH, 1999), cuya revelación está incorporada por referencia en la presente memoria en su totalidad.

Las condiciones suficientes para acoplar el oligómero activado a la proinsulina serán entendidas por el experto en la técnica. Por ejemplo, se puede disolver la proinsulina en un disolvente aprótico dipolar, tal como dimetilsulfóxido, para proporcionar una solución de proinsulina. Se puede añadir un agente de tamponamiento, tal como trietilamina, a la solución de proinsulina. El oligómero activado disuelto en un disolvente anhidro, tal como acetonitrilo se puede añadir luego a la solución de proinsulina. El experto en la técnica puede referirse también a R. C. Larock, "COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS. A GUIDE TO FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS" (II edición, Nueva York, Wiley-VCH, 1999). La proporción molar entre el oligómero activado y la proinsulina es, preferiblemente, mayor de aproximadamente 1:1; es, más preferiblemente, mayor de aproximadamente 2:1; es, incluso más preferiblemente, mayor de aproximadamente 3:1; es, todavía más preferiblemente, mayor de aproximadamente 4:1; y es, incluso todavía más preferiblemente, mayor de aproximadamente 5:1.

En las diversas realizaciones descritas anteriormente, se puede acoplar más de un oligómero (i.e., una pluralidad de oligómeros) a la parte de insulina de la proinsulina. Los oligómeros de la pluralidad son preferiblemente iguales. Sin embargo, se entenderá que los oligómeros de la pluralidad pueden ser diferentes entre sí o, alternativamente, algunos de los oligómeros de la pluralidad pueden ser iguales y algunos pueden ser diferentes. Cuando se acopla una pluralidad de oligómeros a la parte de insulina de la proinsulina, puede ser preferible acoplar uno o más de los oligómeros a la parte de insulina de la proinsulina con enlaces hidrolizables y acoplar uno o más de los oligómeros a la parte de insulina de la proinsulina con enlaces no hidrolizables. Alternativamente, todos los enlaces que acoplan la pluralidad de oligómeros a la parte de insulina de la proinsulina pueden ser hidrolizables, pero tienen grados variables de capacidad de hidrólisis tal que, por ejemplo, uno o más de los oligómeros sean eliminados rápidamente de la insulina o la parte de insulina de la proinsulina mediante hidrólisis en el cuerpo y uno o más de los oligómeros sean eliminados lentamente de la insulina o la parte de insulina mediante hidrólisis en el cuerpo.

ES 2 333 781 T3

En las diversas realizaciones descritas anteriormente, el oligómero puede ser acoplado a la parte de insulina de la proinsulina en diversos residuos nucleófilos de la parte de insulina incluyendo, pero no se limitándose a, funciones hidroxilo y/o funciones amino nucleófilas. Se puede encontrar una función hidroxilo nucleófila, por ejemplo, en los residuos de serina y/o tirosina, y se puede encontrar una función amino nucleófila, por ejemplo, en residuos de histidina y/o lisina, y/o en uno o más terminales N del polipéptido. Cuando se acopla un oligómero al uno o más terminales N de la proinsulina, el acoplamiento forma preferiblemente una amina secundaria. Cuando la proinsulina tiene un péptido líder acoplado al terminal N de la cadena B, es posible proteger los terminales N de la molécula de insulina de la conjugación (p. ej., acilación). Cuando la proinsulina es una proinsulina humana que tiene un péptido líder acoplado al terminal N de la cadena B, se puede acoplar el oligómero, por ejemplo, a las tres funcionalidades amino de la proinsulina: el terminal N del péptido líder, la funcionalidad amino del residuo Lys del péptido C y la funcionalidad amino de Lys^{B29}. Tras la escisión del péptido líder y del péptido C, se encuentra que el oligómero ha sido acoplado con especificidad de sitio a la Lys^{B29} de la insulina para proporcionar un solo conjugado de insulina, insulina monoconjugada con un oligómero en Lys^{B29}.

La escisión del uno o más péptidos del conjugado de proinsulina-oligómero para proporcionar el conjugado de insulina-oligómero se puede realizar mediante diversos procedimientos, como será entendido por los expertos en la técnica. Preferiblemente, la escisión del uno o más péptidos del conjugado de proinsulina-oligómero comprende poner en contacto el conjugado de proinsulina-oligómero con una o más enzimas que son capaces de escindir el o los enlaces entre el uno o más péptidos y la insulina en condiciones suficientes para escindir el uno o más péptidos del conjugado de proinsulina-oligómero. Según lo descrito en diversas referencias, por ejemplo, en Kemmler *et al.*, "Studies on the Conversion of Proinsulin to Insulin", *J. Biol. Chem.*, 246: 6786-6791 (1971), el experto en la técnica sabrá cómo seleccionar las enzimas apropiadas con vistas al o a los enlaces peptídicos concretos por ser escindidos y cómo proporcionar las condiciones suficientes para escindir el uno o más péptidos del conjugado de proinsulina-oligómero. La una o más enzimas comprenden preferiblemente diversas enzimas que incluyen, pero no se limitan a, tripsina, quimi tripsina, carboxi-peptidasa B y mezclas de las mismas. Más preferiblemente, la una o más enzimas son seleccionadas del grupo constituido por tripsina, carboxi-peptidasa B y mezclas de las mismas.

En algunas realizaciones, tales como aquéllas descritas anteriormente que tienen un péptido conector, el péptido conector tiene un residuo de aminoácido terminal en el primer extremo. En algunas de estas realizaciones, la escisión del péptido conector del conjugado de proinsulina-oligómero comprende poner en contacto el conjugado de proinsulina-oligómero con una primera enzima en condiciones suficientes para proporcionar un conjugado de residuo de aminoácido terminal-insulina-oligómero, y poner en contacto el conjugado de residuo de aminoácido terminal-insulina-oligómero con una segunda enzima en condiciones suficientes para proporcionar el conjugado de insulina-oligómero. La puesta en contacto del conjugado de proinsulina-oligómero con una primera enzima y la puesta en contacto del conjugado de residuo de aminoácido terminal-insulina-oligómero con una segunda enzima pueden tener lugar de una manera sustancialmente simultánea, por ejemplo, cuando la primera enzima y la segunda enzima se proporcionan como una mezcla o un cóctel. Preferiblemente, la primera enzima es tripsina y la segunda enzima es carboxi-peptidasa B. El residuo de aminoácido terminal puede ser diversos residuos, tales como un residuo de arginina. Por ejemplo, el residuo de aminoácido terminal es un residuo de arginina cuando la insulina es insulina y el péptido conector es péptido C humano.

La escisión del uno o más péptidos del conjugado de proinsulina-oligómero proporciona, preferiblemente, un producto de conjugado de insulina-oligómero que consta de un solo conjugado de insulina-oligómero (i.e., carece sustancialmente de más conjugados de insulina-oligómero). Preferiblemente, el producto de conjugado de insulina-oligómero consta de un solo monoconjugado de insulina-oligómero. Por ejemplo, en realizaciones descritas anteriormente en las que la proinsulina comprende insulina que tiene una cadena A que carece de residuos de lisina y una cadena B que comprende un solo residuo de lisina, el producto de conjugado de insulina-oligómero consta, preferiblemente, de un solo monoconjugado de insulina-oligómero, en el que el oligómero está acoplado al residuo de lisina de la cadena B. Como otro ejemplo, cuando la proinsulina es proinsulina con un péptido líder, la escisión del péptido C y del péptido líder del conjugado de proinsulina-oligómero proporciona un monoconjugado de insulina-oligómero, en el que la insulina está monoconjugada en Lys^{B29}.

Las realizaciones de los procedimientos para sintetizar conjugados de insulina-oligómero descritas anteriormente dan como resultado, preferiblemente, un rendimiento de conjugados de insulina-oligómero que es mayor del 75, 76, 77, 78 ó 79 por ciento. Más preferiblemente, el rendimiento es mayor del 80, 81, 82, 83, 84 ó 85 por ciento. Incluso más preferiblemente, el rendimiento es mayor del 86, 87, 88, 89 ó 90 por ciento. Todavía más preferiblemente, el rendimiento es mayor del 91, 92, 93, 94 ó 95 por ciento. Cuando el conjugado de proinsulina-oligómero es proporcionado mediante la puesta en contacto de un oligómero activado con el conjugado de proinsulina-oligómero, puede ser preferible usar un exceso de oligómeros activados para conseguir rendimientos superiores. Por ejemplo, los rendimientos descritos anteriormente se obtienen preferiblemente usando una proporción molar entre el oligómero activado y la proinsulina mayor de aproximadamente 2:1; más preferiblemente, mayor de aproximadamente 3:1; incluso más preferiblemente, mayor de aproximadamente 4:1; y todavía más preferiblemente, mayor de aproximadamente 5:1. Preferiblemente, los rendimientos mayores del 91, 92, 93, 94 ó 95 por ciento se obtienen usando una proporción molar entre el oligómero activado y la proinsulina de más de aproximadamente 4:1; más preferiblemente, de más de aproximadamente 5:1.

Según otras realizaciones más de la presente invención, un monoconjugado de proinsulina-oligómero comprende una proinsulina y un oligómero,

en el que la proinsulina comprende una insulina que tiene una cadena A y una cadena B; un péptido C conector acoplado en un primer extremo con el terminal C de la cadena B y acoplado en un segundo extremo con el terminal N del polipéptido de la cadena A mediante enlaces peptídicos; y un péptido líder acoplado al terminal N del polipéptido de la cadena B mediante un enlace peptídico, y en el que el oligómero comprende un resto hidrófilo y un resto lipófilo, resto hidrófilo que comprende al menos un resto de polialquilenglicol, y en el que el oligómero está acoplado a un residuo de lisina de la parte de insulina de la proinsulina.

La proinsulina puede ser diversas proinsulinas incluyendo, pero no limitándose a, la proinsulina descrita anteriormente con referencia a los procedimientos de síntesis de monoconjugados de proinsulina-oligómero. El oligómero puede ser diversos oligómeros incluyendo, pero no limitándose a, los oligómeros descritos anteriormente con referencia a los procedimientos de síntesis de monoconjugados de proinsulina-oligómero. El oligómero comprende un resto hidrófilo y un resto lipófilo. Los monoconjugados de proinsulina-oligómero según la presente invención pueden ser sintetizados mediante diversos procedimientos como será entendido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, los procedimientos de síntesis de monoconjugados de proinsulina-oligómero descritos anteriormente.

Ahora, se describirá la presente invención con referencia a los siguientes ejemplos. Debería entenderse que estos ejemplos tienen la finalidad de ilustrar los aspectos de la presente invención y que no limitan el alcance de la invención según lo definido por las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-éster de ácido 6-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi)-hexanoico (8)

Monobenciléter de hexaetilenglicol (1). Se añadió lentamente una solución de hidróxido de sodio acuoso preparada disolviendo 3,99 g (100 mmoles) de NaOH en 4 ml de agua a hexaetilenglicol monodispersado (28,175 g; 25 ml; 100 mmoles). Se añadió cloruro de bencilo (3,9 g; 30,8 mmoles; 3,54 ml) y se calentó la mezcla de reacción con agitación hasta 100°C durante 18 horas. Entonces se enfrió la mezcla de reacción, se diluyó con salmuera (250 ml) y se extrajo con cloruro de metileno (200 ml x 2). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera una vez, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío hasta obtener un aceite marrón oscuro. Se purificó la mezcla de productos cruda mediante cromatografía por desorción ultrarrápida (gel de sílice; gradiente de elución: acetato de etilo a acetato de etilo/metanol (9/1)) para proporcionar 8,099 g (70%) de compuesto monodispersado 1 como un aceite amarillo.

6-metilsulfoniloxihexanoato de etilo (2). Se enfrió una solución de 6-hidroxihexanoato de etilo monodispersado (50,76 ml; 50,41 g; 227 mmoles) en diclorometano seco (75 ml) en un baño de hielo y se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió trietilamina (34,43 ml; 24,99 g; 247 mmoles). Se añadió una solución de cloruro de metanosulfonilo (19,15 ml; 28,3 g; 247 mmoles) en diclorometano seco (75 ml) en gotas desde un embudo de adición. Se agitó la mezcla durante tres horas y media lentamente permitiendo que llegara a la temperatura ambiente a medida que se fundía el baño de hielo. Se filtró la mezcla a través de gel de sílice y se lavó el filtrado sucesivamente con agua, NaHCO₃ saturado, agua y salmuera. Se secaron las partes orgánicas sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío hasta obtener un aceite amarillo pálido. La purificación final del producto crudo se alcanzó mediante cromatografía por desorción ultrarrápida (gel de sílice, hexanos/acetato de etilo (1/1)) para proporcionar el compuesto monodispersado 2 (46,13 g; 85%) como un aceite incoloro claro. EM-FAB : m/e 239 (M+H), 193 (M-C₂H₅O).

Etiléster de ácido 6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-benciloxietoxi)etoxi]etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-hexanoico (3). Se suspendió hidruro de sodio (3,225 g o una dispersión en aceite al 60%; 80,6 mmoles) en 80 ml de tolueno anhidro, se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió una solución del alcohol monodispersado 9 (27,3 g; 73,3 mmoles) en 80 ml de tolueno seco a la suspensión de NaH. Se agitó la mezcla a 0°C durante treinta minutos, se dejó que llegara a la temperatura ambiente y se agitó durante otras cinco horas, tiempo durante el cual la mezcla se convirtió en una solución marrón clara. El mesilato monodispersado 10 (19,21 g; 80,6 mmoles) en 80 ml de tolueno seco fue añadido a la mezcla de NaH/alcohol, y se agitaron las soluciones combinadas a temperatura ambiente durante tres días. Se detuvo la mezcla de reacción con 50 ml de metanol y se filtró a través de alúmina básica. Se concentró el filtrado al vacío y se purificó mediante cromatografía por desorción ultrarrápida (gel de sílice; gradiente de elución: acetato de etilo/hexanos (3/1) a acetato de etilo) para proporcionar el compuesto monodispersado 3 como un aceite amarillo pálido (16,52 g; 44%). EM-FAB: m/e 515 (M+H).

Etiléster de ácido 6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-hexanoico (4). Se disolvió el benciléter sustancialmente monodispersado 3 (1,03 g; 2,0 mmoles) en 25 ml de etanol. Se añadieron a esta solución 270 mg de Pd/C al 10%, y se colocó la mezcla bajo una atmósfera de hidrógeno y se agitó durante cuatro horas, tras las que una CCF mostró la desaparición total del material inicial. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite 545 para eliminar el catalizador, y se concentró el filtrado al vacío para producir el compuesto monodispersado 4 como un aceite claro (0,67 g; 79%). EM-FAB: m/e 425 (M+H), 447 (M+Na).

ES 2 333 781 T3

5 *Etiléster de ácido 6-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-metilsulfoniletoxi)etoxi]etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-hexanoico (5)*. Se disolvió el alcohol monodispersado 4 (0,835 g; 1,97 mmoles) en 3,5 ml de diclorometano seco y se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió trietilamina (0,301 ml; 0,219 g; 2,16 mmoles) y se enfrió la mezcla en un baño de hielo. Tras dos minutos, se añadió cloruro de metanosulfonilo (0,16 ml; 0,248 g; 2,16 mmoles). Se agitó la mezcla durante 15 minutos a 0°C, luego a temperatura ambiente durante dos horas. Se filtró la mezcla de reacción a través de gel de sílice para eliminar el cloruro de trietilamonio y se lavó el filtrado sucesivamente con agua, NaHCO₃ saturado, agua y salmuera. Se secaron las partes orgánicas sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo/metanol (9/1)) para proporcionar el compuesto monodispersado 5 como un aceite claro (0,819 g; 83%). EM-FAB: *m/e* 503 (M+H).

10 *Etiléster de ácido 6-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-hexanoico (6)*. Se suspendió NaH (88 mg de una dispersión en aceite al 60%; 2,2 mmoles) en tolueno anhidro (3 ml) bajo N₂ y se enfrió hasta 0°C. Se añadió el monometiléter de dietilenglicol monodispersado (0,26 ml; 0,26 g; 2,2 mmoles) que había sido secado mediante destilación azeotrópica con tolueno. Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se agitó durante cuatro horas, tiempo durante el cual la suspensión turbia de color gris se aclaró y se volvió amarilla, para volverse después marrón. Se añadió mesilato 5 (0,50 g; 1,0 mmoles) en 2,5 ml de tolueno seco. Tras agitar a temperatura ambiente durante una noche, se detuvo la reacción mediante la adición de 2 ml de metanol y se filtró la solución resultante a través de gel de sílice. Se concentró el filtrado al vacío, y se realizó una EM-FAB: *m/e* 499 (M+H), 521 (M+Na). La purificación adicional mediante cromatografía preparatoria (gel de sílice, cloroformo/metanol (19/3)) proporcionó el compuesto monodispersado 6 como un aceite amarillo claro (0,302 g; 57%). EM-FAB: *m/e* 527 (M+H), 549 (M+Na).

25 *Ácido 6-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-hexanoico (7)*. Se agitó el éster monodispersado 6 (0,25 g; 0,46 mmoles) durante 18 horas en 0,71 ml de NaOH 1N. Tras 18 horas, se concentró la mezcla al vacío para eliminar el alcohol y se disolvió el residuo en 10 ml más de agua. Se acidificó la solución acuosa hasta un pH 2 con HCl 2N y se extrajo el producto en diclorometano (30 ml x 2). Se lavaron entonces las partes orgánicas combinadas con salmuera (25 ml x 2), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar el compuesto monodispersado 15 como un aceite amarillo (0,147 g; 62%). EM-FAB: *m/e* 499 (M+H), 521 (M+Na).

30 *2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-éster de ácido 6-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-hexanoico (8)*. Se disolvió el ácido monodispersado 7 (0,209 g; 0,42 mmoles) en 4 ml de diclorometano seco, y se añadió a un matraz seco que ya contenía NHS (N-hidroxisuccinimida) (57,8 mg; 0,502 mmoles) y EDC (clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) (98,0 mg; 0,502 mmoles) bajo una atmósfera de N₂. Se agitó la solución a temperatura ambiente durante una noche y se filtró a través de gel de sílice para eliminar los reactivos en exceso y la urea formada a partir del EDC. Se concentró el filtrado al vacío para proporcionar el oligómero monodispersado activado 8 como un aceite amarillo oscuro (0,235 g; 94%). EM-FAB: *m/e* 596 (M+H), 618 (M+Na).

40 Ejemplo 2

Síntesis de MPEG₇-C₈ activado (14)

45 *Mesilato de monometiléter de trietilenglicol (9)*. Se añadió monometiléter de trietilenglicol monodispersado (25 g; 0,15 moles) a una solución de CH₂Cl₂ (100 ml) enfriada hasta 0°C en un baño de hielo. Luego se añadió trietilamina (29,5 ml; 0,22 moles) y se agitó la solución durante 15 min a 0°C, a lo que le siguió la adición en gotas de cloruro de metanosulfonilo (13,8 ml; 0,18 moles, disuelto en 20 ml de CH₂Cl₂). Se agitó la mezcla de reacción durante 30 min a 0°C, se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y luego se agitó durante 2 h. Se filtró la mezcla de reacción cruda a través de Celite (se lavó con CH₂Cl₂, ~200 ml), luego se lavó con H₂O (300 ml), NaHCO₃ al 5% (300 ml), H₂O (300 ml), NaCl sat. (300 ml), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó hasta la sequedad. Entonces se colocó el aceite sobre una línea al vacío durante ~2 h para garantizar la sequedad y se produjo el compuesto monodispersado 9 como un aceite amarillo (29,15 g; rendimiento del 80%).

55 *Monometiléter de heptaetilenglicol (10)*. A una solución de tetraetilenglicol monodispersado (51,5 g; 0,27 moles) en THF (1 l), se añadió *t*-butóxido de potasio (14,8 g; 0,13 moles, en partes pequeñas durante ~30 min). Entonces se agitó la mezcla de reacción durante 1 h y luego se añadió 9 (29,15 g; 0,12 moles) disuelto en THF (90 ml) en gotas y se agitó la mezcla de reacción durante una noche. Se filtró la mezcla de reacción cruda a través de Celite (se lavó con CH₂Cl₂, ~200 ml) y se evaporó hasta la sequedad. Entonces se disolvió el aceite en HCl (250 ml; 1N) y se lavó con acetato de etilo (250 ml) para eliminar el exceso de 9. Pueden ser necesarios más lavados de acetato de etilo (125 ml) para eliminar el 9 restante. Se lavó la fase acuosa repetidamente con CH₂Cl₂ (volúmenes de 125 ml) hasta que la mayoría del compuesto 18 se hubo eliminado de la fase acuosa. La primera extracción contendrá 9, 10 y subproducto desacoplado, y debería volver a ser extraída con HCl (125 ml; 1N). Se combinaron las capas orgánicas y se evaporaron hasta la sequedad. Entonces se disolvió el aceite resultante en CH₂Cl₂ (100 ml) y se lavó repetidamente con H₂O (volúmenes de 50 ml) hasta que se eliminó 10. Se combinaron las fracciones acuosas, volumen total de 500 ml, y se añadió NaCl hasta que la solución se enturbió, y luego se lavó con CH₂Cl₂ (2 x 500 ml). Se combinaron las capas orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar el compuesto monodispersado 10 como un aceite (16,9 g; rendimiento del 41%). Puede ser deseable repetir una o más etapas del procedimiento de purificación para garantizar una pureza elevada.

ES 2 333 781 T3

8-Bromo-octanoato (11). A una solución de ácido 8-bromo-octanoico monodispersado (5,0 g; 22 mmoles) en etanol (100 ml), se añadió H₂SO₄ (0,36 ml; 7,5 mmoles) y se calentó la reacción hasta el reflujo con agitación durante 3 h. Se enfrió la mezcla de reacción cruda hasta la temperatura ambiente y se lavó con H₂O (100 ml), NaHCO₃ sat. (2 x 100 ml), H₂O (100 ml), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó hasta la sequedad para proporcionar un aceite claro 11 (5,5 g; rendimiento del 98%).

Éster de MPEG₇-C₈ (12). A una solución del compuesto monodispersado 10 (3,0 g; 8,8 mmoles) en éter (90 ml), se añadió *t*-butóxido de potasio (1,2 g; 9,6 mmoles), y se agitó la mezcla de reacción durante 1 h. Entonces se añadió el compuesto monodispersado 11 (2,4 g; 9,6 mmoles) disuelto en éter (10 ml) y se agitó la mezcla de reacción durante una noche. Se filtró la mezcla de reacción cruda a través de Celite (se lavó con CH₂Cl₂, ~200 ml) y se evaporó hasta la sequedad. Se disolvió el aceite resultante en acetato de etilo y se lavó con H₂O (2 x 200 ml), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó hasta la sequedad. Se realizó una cromatografía en columna (sílice, acetato de etilo a acetato de etilo/metanol (10/1)), y se proporcionó el compuesto monodispersado 12 como un aceite claro (0,843 g; rendimiento del 19%).

Ácido de MPEG₇-C₈ (13). Al aceite del compuesto monodispersado 12 (0,70 g; 1,4 mmoles), se añadió NaOH (2,0 ml), y se agitó la mezcla de reacción durante 4 h. Se concentró la mezcla de reacción cruda, se acidificó (pH ~2), se saturó con NaCl y se lavó con CH₂Cl₂ (2 x 50 ml). Se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con NaCl sat., se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar el compuesto monodispersado 13 como un aceite claro (0,35 g; rendimiento del 53%).

Activación del ácido MPEG₇-C₈. Se disolvió el ácido MPEG₇-C₈ monodispersado 13 (0,31 g; 0,64 mmoles) en 3 ml de cloruro de metileno anhidro y luego se añadió solución de *N*-hidroxisuccinimida (0,079 g; 0,69 mmoles) en EDCI-HCl (135,6 mg; 0,71 mmoles) en cloruro de metileno anhidro. Se agitó la reacción durante varias horas, luego se lavó con HCl 1N y agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. Se purificó el material crudo mediante cromatografía en columna, se concentró para proporcionar MPEG₇-C₈ monodispersado activado 14 como un aceite claro y se secó al vacío.

Ejemplo 3

Síntesis de MPEG₇-C₁₀ activado (19)

10-hidroxidecanoato (15). A una solución de ácido 10-hidroxidecanoico monodispersado (5,0 g; 26,5 mmoles) en etanol (100 ml), se añadió H₂SO₄ (0,43 ml; 8,8 mmoles) y se calentó la reacción hasta el reflujo con agitación durante 3 h. Se enfrió la mezcla de reacción cruda hasta la temperatura ambiente y se lavó con H₂O (100 ml), NaHCO₃ sat. (2 x 100 ml), H₂O (100 ml), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó hasta la sequedad para proporcionar el compuesto monodispersado 15 como un aceite claro (6,9 g; rendimiento del 98%).

Mesilato de 10-hidroxidecanoato (16). Se añadió 10-hidroxidecanoato monodispersado 15 (5,6 g; 26 mmoles) a una solución de CH₂Cl₂ (27 ml) y se enfrió hasta 0°C en un baño de hielo. Luego se añadió trietilamina (5 ml; 37 mmoles) y se agitó la mezcla de reacción durante 15 min a 0°C. Entonces se añadió cloruro de metanosulfonilo (2,7 ml; 24 mmoles) disuelto en CH₂Cl₂ (3 ml) y se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 30 min, se retiró el baño de hielo y se agitó la reacción durante 2 h más a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción cruda a través de Celite (se lavó con CH₂Cl₂, 80 ml), y se lavó el filtrado con H₂O (100 ml), NaHCO₃ al 5% (2 x 100 ml), H₂O (100 ml), NaCl sat. (100 ml), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó hasta la sequedad para proporcionar el compuesto monodispersado 16 como un aceite amarillento (7,42 g; rendimiento del 97%).

Éster de MPEG₇-C₁₀ (17). A una solución del monometiléter de heptaetilenglicol sustancialmente monodispersado 10 (2,5 g; 7,3 mmoles) en tetrahidrofurano (100 ml), se añadió hidruro de sodio (0,194 g; 8,1 mmoles), y se agitó la mezcla de reacción durante 1 h. Entonces se añadió el mesilato de 10-hidroxidecanoato monodispersado 16 (2,4 g; 8,1 mmoles) disuelto en tetrahidrofurano (10 ml), y se agitó la mezcla de reacción durante una noche. Se filtró la mezcla de reacción cruda a través de Celite (se lavó con CH₂Cl₂, ~200 ml) y se evaporó hasta la sequedad. Se disolvió el aceite resultante en acetato de etilo y se lavó con H₂O (2 x 200 ml), se secó sobre MgSO₄, se evaporó hasta la sequedad, se cromatografió (sílice, acetato de etilo/metanol, (10:1)) y se cromatografió (sílice, acetato de etilo) para proporcionar el compuesto monodispersado 17 como un aceite claro (0,570 g; rendimiento del 15%).

Ácido de MPEG₇-C₁₀ (18). Al aceite del éster de MPEG₇-C₁₀ monodispersado 17 (0,570 g; 1,1 mmoles), se añadió NaOH 1N (1,6 ml), y se agitó la mezcla de reacción durante una noche. Se concentró la mezcla de reacción cruda, se acidificó (pH ~2), se saturó con NaCl y se lavó con CH₂Cl₂ (2 x 50 ml). Se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con NaCl sat. (2 x 50 ml), se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron hasta la sequedad para proporcionar el compuesto monodispersado 18 como un aceite claro (0,340 g; rendimiento del 62%).

Activación de ácido MPEG₇-C₁₀. El ácido monodispersado 18 fue activado usando procedimientos similares a aquéllos descritos anteriormente en el Ejemplo 10 para proporcionar el oligómero MPEG₇-C₁₀ activado 19.

ES 2 333 781 T3

Ejemplo 4

Síntesis del Oligómero (PEG₆)C₁₈ activado (22)

5 Síntesis del Oligómero (PEG₆)C₁₈ (20). Se añadió lentamente cloruro de estearoilo monodispersado (0,7 g; 2,31 mmoles) a una mezcla de PEG₆ monodispersado (5 g; 17,7 mmoles) y piridina (0,97 g; 12,4 mmoles) en benceno. Se agitó la mezcla de reacción durante varias horas (~5). La reacción fue seguida por una CCF usando acetato de etilo/metanol como un disolvente en desarrollo. Entonces se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó sobre MgSO₄, se concentró y se secó al vacío. Se analizó el compuesto monodispersado 20 purificado mediante EM-FAB: *m/e* 549/10 M+H.

Activación del Oligómero (PEG₆)C₁₈. La activación del oligómero (PEG₆)C₁₈ monodispersado se realizó en dos etapas:

- 15 1) Se disolvió PEG₆ de estearoilo monodispersado 20 (0,8 g; 1,46 mmoles) en tolueno, y se añadió a una solución de fosgeno (10 ml; 20% en tolueno), que fue enfriada con un baño de hielo. Se agitó la mezcla de reacción durante 1 h a 0°C y luego durante 3 h a temperatura ambiente. Entonces se destilaron el fosgeno y el tolueno, y se secó el PEG₆-cloroformiato de estearoilo sustancialmente monodispersado 21 sobre P₂O₅ durante una noche.
- 20 2) A una solución de PEG₆-cloroformiato de estearoilo monodispersado 21 (0,78 g; 1,27 mmoles) y TEA (128 mg; 1,27 mmoles) en cloruro de metileno anhidro, se añadió una solución de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) en cloruro de metileno. Se agitó la mezcla de reacción durante 16 horas, luego se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró, se concentró y se secó al vacío para proporcionar el oligómero de (PEG₆)C₁₈ 25 activado monodispersado 22.

Ejemplo 5

Síntesis del Oligómero (PEG₈)C₁₈ activado (28)

Monobenciléter de tetraetilenglicol (23). Al aceite de tetraetilenglicol monodispersado (19,4 g; 0,10 moles), se añadió una solución de NaOH (4,0 g en 4,0 ml) y se agitó la reacción durante 15 min. Se añadió entonces cloruro de bencilo (3,54 g; 30,8 mmoles) y se calentó la mezcla de reacción hasta 100°C y se agitó durante una noche. Se enfrió la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente, se diluyó con NaCl sat. (250 ml) y se lavó con CH₂Cl₂ (2 x 200 ml). Se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con NaCl sat., se secaron sobre MgSO₄ y cromatografiaron (sílice, acetato de etilo) para proporcionar el compuesto monodispersado 23 como un aceite amarillo (6,21 g; rendimiento del 71%).

40 *Mesilato de monobenciléter de tetraetilenglicol (24)*. A una solución de CH₂Cl₂ (20 ml), se añadió monobenciléter de tetraetilenglicol monodispersado 23 (6,21 g; 22 mmoles), y se enfrió hasta 0°C en un baño de hielo. Se añadió entonces trietilamina (3,2 ml; 24 mmoles) y se agitó la mezcla de reacción durante 15 min a 0°C. Entonces se añadió cloruro de metanosulfonilo (1,7 ml; 24 mmoles) disuelto en CH₂Cl₂ (2 ml) y se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 30 min, se retiró el baño de hielo y se agitó la reacción durante 2 h más a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción cruda a través de Celite (se lavó con CH₂Cl₂; 80 ml), se lavó el filtrado con H₂O (100 ml), NaHCO₃ al 5% (2 x 100 ml), H₂O (100 ml) y NaCl sat. (100 ml), y se secó sobre MgSO₄. Se cromatografió el aceite amarillo resultante sobre un lecho corto de sílice que contenía carbón activo (10 g) para proporcionar el compuesto monodispersado 24 como un aceite claro (7,10 g; rendimiento del 89%).

50 *Monobenciléter de octaetilenglicol (25)*. A una solución de tetrahidrofurano (140 ml) que contenía hidruro de sodio (0,43 g; 18 mmoles), se añadió una solución en gotas de tetraetilenglicol monodispersado (3,5 g; 18 mmoles) en tetrahidrofurano (10 ml) y se agitó la mezcla de reacción durante 1 h. Entonces se añadió mesilato de monobenciléter de tetraetilenglicol monodispersado 24 (6,0 g; 16,5 mmoles) disuelto en tetrahidrofurano (10 ml) en gotas, y se agitó la mezcla de reacción durante una noche. Se filtró la mezcla de reacción cruda a través de Celite (se lavó con CH₂Cl₂, 250 ml) y se lavó el filtrado con H₂O, se secó sobre MgSO₄ y se evaporó hasta la sequedad. Se cromatografió el aceite resultante (sílice, acetato de etilo/metanol, (10:1)) y se cromatografió (sílice, cloroformo/metanol, (25:1)) para proporcionar el compuesto monodispersado 25 como un aceite claro (2,62 g; rendimiento del 34%).

60 *Síntesis de estearato de PEG₈-bencilo (26)*. A una solución enfriada agitada de monobenciléter de octaetilenglicol monodispersado 25 (0,998 g; 2,07 mmoles) y piridina (163,9 mg; 2,07 mmoles), se añadió cloruro de estearoilo monodispersado (627,7 mg; 2,07 mmoles) en benceno. Se agitó la mezcla de reacción durante una noche (18 horas). Al día siguiente, se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó sobre MgSO₄, se concentró y se secó al vacío. Luego se cromatografió el producto crudo sobre una columna de gel de sílice por desorción ultrarrápida, usando metanol al 10%/cloroformo al 90%. Se combinaron las fracciones que contenían el producto, se concentraron y se secaron al vacío para proporcionar el compuesto monodispersado 26.

ES 2 333 781 T3

Hidrogenolisis de estearato de PEG8-bencilo. A una solución en metanol de estearato de PEG₈-Bzl monodispersado 26 (0,854 g; 1,138 mmoles), se añadió Pd/C (10%) (paladio 10% en peso sobre carbón activo). Se agitó la mezcla de reacción durante una noche (18 horas) bajo hidrógeno. Entonces se filtró la solución, se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna por desorción ultrarrápida usando metanol al 10%/cloroformo al 90%; se recogieron las fracciones con R_f = 0,6, se concentraron y se secaron para proporcionar el ácido monodispersado 27.

Activación del Oligómero (PEG₈)C₁₈. La activación en dos etapas del oligómero de estearato de PEG₈ monodispersado 27 se realizó según lo descrito para el estearato de PEG₆ en el Ejemplo 4 anterior para proporcionar el oligómero de (PEG₈)C₁₈ activado monodispersado 28.

Ejemplo 6

Síntesis de oligómeros de monometilo de trietilenglicol activados

Se enfrió una solución de tolueno que contenía fosgeno al 20% (100 ml; aproximadamente 18,7 g; 189 mmoles de fosgeno) hasta 0°C bajo una atmósfera de N₂. Se disolvió mTEG monodispersado (monometiléter de trietilenglicol, 7,8 g; 47,5 mmoles) en 25 ml de acetato de etilo anhidro, y se añadió a la solución de fosgeno enfriada. Se agitó la mezcla durante una hora a 0°C, luego se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante dos horas y media más. Se retiraron el fosgeno, el acetato de etilo y el tolueno restantes mediante destilación al vacío para dejar el cloroformiato de mTEG monodispersado como un residuo de aceite claro.

Se disolvió el cloroformiato de nTEG monodispersado en 50 ml de diclorometano seco al que se añadió TEA (trietilamina, 6,62 ml; 47,5 mmoles) y NHS (N-hidroxisuccinimida; 5,8 g; 50,4 mmoles). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente bajo una atmósfera seca durante veinte horas, tiempo durante el cual apareció una gran cantidad de precipitado blanco. Se filtró la mezcla para eliminar este precipitado y se concentró al vacío. Se elevó el aceite resultante en diclorometano y se lavó dos veces con agua desionizada fría, dos veces con HCl 1N y una vez con salmuera. Se secaron las partes orgánicas sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron para proporcionar el compuesto del título monodispersado como un aceite amarillo claro. En caso de que fuera necesario, se podría purificar más el éster de NHS mediante cromatografía por desorción ultrarrápida sobre gel de sílice usando EtOAc como eluyente.

Ejemplo 7

Síntesis de Oligómeros de palmitato de TEG activados

Se disolvió anhídrido palmítico monodispersado (5 g; 10 mmoles) en THF seco (20 ml) y se agitó a temperatura ambiente. A la solución en agitación, se añadió un exceso de 3 ml de piridina seguido de trietilenglicol monodispersado (1,4 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora (el progreso de la reacción fue controlado mediante CCF; acetato de etilo/cloroformo (3:7)). Al final de la reacción, se eliminó el THF y se mezcló el producto con ácido de H₂SO₄ al 10% y se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml). Se lavó el extracto combinado consecutivamente con agua, salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se evaporó para proporcionar oligómeros de palmitato de TEG monodispersados.

Se añade una solución de carbonato de N,N'-disuccinimidilo (3 mmoles) en DMF (~10 ml) a una solución de los oligómeros de palmitato de TEG monodispersados (1 mmol) en 10 ml de DMF anhidro con agitación. Se añadió hidruro de sodio (3 mmoles) lentamente a la mezcla de reacción. Se agita la mezcla de reacción durante varias horas (p. ej., 5 horas). Se añade dietiléter para precipitar el oligómero del título activado monodispersado. Se repite este procedimiento 3 veces y, finalmente, se seca el producto.

Ejemplo 8

Síntesis de oligómeros de monometilo de hexaetilenglicol activados

Se preparó el monometiléter de hexaetilenglicol activado monodispersado de manera análoga al trietilenglicol monodispersado del Ejemplo 14 anterior. Se enfrió una solución de fosgeno al 20% en tolueno (35 ml; 6,66 g; 67,4 mmoles de fosgeno) bajo una atmósfera de N₂ en un baño de hielo/agua salada. Se disolvió hexaetilenglicol monodispersado (1,85 ml; 2,0 g; 6,74 mmoles) en 5 ml de EtOAc anhidro y se añadió solución de fosgeno con una jeringa. Se mantuvo la mezcla de reacción en agitación en un baño de hielo durante una hora, se retiró y se agitó durante 2,5 horas más a temperatura ambiente. Se retiraron el fosgeno, el EtOAc y el tolueno mediante destilación al vacío, dejando el cloroformiato de hexaetilenglicol de metilo monodispersado como un residuo de aceite claro.

Se disolvió el cloroformiato monodispersado 20 ml de diclorometano seco y se colocó bajo una atmósfera inerte seca. Se añadieron trietilamina (0,94 ml; 0,68 g; 6,7 mmoles) y luego NHS (N-hidroxisuccinimida, 0,82 g; 7,1 mmoles), y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. Se filtró la mezcla a través de gel de sílice para eliminar el precipitado blanco y se concentró al vacío. Se elevó el residuo en diclorometano y se lavó dos veces con agua fría, dos veces con HCl 1N y una vez con salmuera. Se secaron las partes orgánicas sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. La purificación final se realizó mediante cromatografía por desorción ultrarrápida (gel de sílice, EtOAc) para obtener el monometiléter de hexaetileno monodispersado activado.

ES 2 333 781 T3

Ejemplo 9

Síntesis de monometiléter de heptaetilenglicol activado

5 8-Metoxi-1-(metilsulfonyl)oxi-3,6-dioxaoctano (29). Se enfrió una solución de moléculas de monometiléter de trietilenglicol monodispersado (4,00 ml; 4,19 g; 25,56 mmoles) en trietilamina (4,26 ml; 3,09 g; 30,6 mmoles) en diclorometano seco (50 ml) en un baño de hielo y se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió una solución de cloruro de metanosulfonyl (2,37 ml; 3,51 g; 30,6 mmoles) en diclorometano seco (20 ml) en gotas desde un embudo de adición. Diez minutos después de completarse la adición del cloruro, se retiró la mezcla de reacción del baño de
10 hielo y se dejó que llegara a la temperatura ambiente. Se agitó la mezcla durante una hora más, en cuyo momento una CCF (CHCl₃ con MeOH al 15% como eluyente) no mostró monometiléter de trietilenglicol restante.

15 Se diluyó la mezcla de reacción con otros 75 ml de diclorometano y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ saturado, agua y salmuera. Se secaron las partes orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar la mezcla monodispersada de compuestos 29 como un aceite claro (5,31 g; 86%).

20 *Monometiléter de heptaetilenglicol (30)*. A una solución agitada de tetraetilenglicol monodispersado (35,7 mmoles) en DMF seco (25,7 ml) bajo N₂, se añadió por partes una dispersión al 60% de NaH en aceite mineral, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. A la sal de sodio resultante del tetraetilenglicol se añadió una solución de mesilato monodispersado 29 (23,36) en DMF seco (4 ml) en una sola parte, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3,5 horas. El progreso de la reacción fue controlado mediante CCF (CH₃OH al 12%-CHCl₃). Se diluyó la mezcla de reacción con una parte igual de HCl 1N y se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 ml) y se desechó. La extracción de solución acuosa y el tratamiento final proporcionó monometiléter de heptaetilenglicol monodispersado 30 (rendimiento del 82-84%). Aceite; R_f = 0,46 (metanol:cloroformo = 3:22); EM *m/z* calculada para C₁₅H₃₂O₈ =
25 340,21 (M⁺+1), encontrada 341,2.

30 *Activación de monometiléter de heptaetilenglicol*. El monometiléter de heptaetilenglicol monodispersado 30 es activado mediante un procedimiento similar al usado en el Ejemplo 6 anterior para activar monometiléter de trietilenglicol para proporcionar el monometiléter de heptaetilenglicol activado.

30

Ejemplo 10

35 *Síntesis de 20-metoxi-1-(metilsulfonyl)oxi-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosano (31) de monometiléter de decaetilenglicol activado (33)*

40 El compuesto monodispersado 31 fue obtenido en un rendimiento cuantitativo a partir del compuesto 30 y cloruro de metanosulfonyl según lo descrito para 29 en el Ejemplo 9 anterior, como un aceite; R_f = 0,4 (acetato de etilo:acetonitrilo = 1:5); EM *m/z* calculada para C₁₇H₃₇O₁₀ = 433,21 (M⁺+1), encontrada 433,469.

45 *Monometiléter de decaetilenglicol (32)*. El compuesto monodispersado 32 fue preparado a partir del compuesto 31 y el trietilenglicol monodispersado usando el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 17. Aceite; R_f = 0,41 (metanol: cloroformo = 6:10); EM *m/z* calculada para C₂₁H₄₄O₁₁ = 472,29 (M⁺+1), encontrada = 472,29.

50 *Activación de monometiléter de decaetilenglicol*. El monometiléter de decaetilenglicol monodispersado 32 es activado mediante un procedimiento similar al usado en el Ejemplo 6 anterior para activar monometiléter de trietilenglicol para proporcionar el monometiléter de decaetilenglicol activado 33.

Ejemplo 11

Preparación de insulina conjugada con el oligómero en Lys^{B29}

55 *Conjugación de proinsulina I recombinante*. La proinsulina I recombinante (P.M.: 10,642 daltons) fue obtenida en Biobras de Belo Horizonte, Brasil. Se disolvió una parte de 2,32 x 10⁻³ mmoles de proinsulina I en 10 ml de DMSO. Se añadieron 324 μl de trietilamina a la solución. Se dejó agitar la solución resultante durante 5 minutos, y luego se añadió una solución de metilheptaetilenglicol activado (oligómero de (PEG₇)-hexilo) (9,30 x 10⁻³ mmoles) en acetonitrilo. El transcurso de la reacción de conjugación (acilación) fue controlado mediante CLAR. Cuando la reacción pareció estar completa, se detuvo mediante la adición de 3,54 ml de solución de ácido trifluoroacético acuoso al 5%. Entonces se
60 procesó la mezcla de reacción y se intercambió a tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. En la Figura 11, se muestra el perfil de CLAR de la mezcla de productos, la proinsulina I recombinante conjugada con oligómero.

65 (b) *Escisión mediante una mezcla enzimática de la proinsulina I recombinante conjugada con oligómero*

Se analizó una alícuota de la solución de Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 1(a) mediante CLAR para determinar la concentración de polipéptido. Se preparó una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se preparó una solución de carboxi-peptidasa B (de páncreas porcino)

ES 2 333 781 T3

en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Entonces se dejó reaccionar la mezcla de productos del Ejemplo 11(a) (0,424 μ moles/ml) con tripsina ($5,97 \times 10^{-4}$ μ moles/ml) y carboxi-peptidasa B ($1,93 \times 10^{-4}$ μ moles/ml). Tras 30 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de 1,58 ml de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. Los productos principales fueron identificados mediante el tiempo de retención de una CLAR (en comparación con los tiempos de retención de patrones de referencia conocidos) y un análisis espectral de masas. Así fueron obtenidas la insulina (10%) y la insulina conjugada con el oligómero de Hexil-PEG₇ en Lys^{B29} (Figuras 11-13).

Ejemplo 12

Aislamiento de los productos de la conjugación de proinsulina recombinante I con oligómero

Se usó una CLAR en fase inversa para aislar los productos principales de la mezcla de productos obtenida de la reacción de conjugación descrita en el Ejemplo 11(a). Se empaquetó una columna de CLAR (1,0 cm de d.i. x 25 cm de longitud) con una fase estacionaria de 18 C comercialmente disponible conocida por su utilidad para la separación de péptidos y proteínas, y luego fue incorporada en un sistema de CLAR. Se equilibró el sistema con tampón de elución, una mezcla que comprendía fase móvil A al 72% (H₂O con ácido trifluoroacético al 0,1%) y fase móvil B al 28% (acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1%), que fue administrado a un caudal de 5 ml/min. Se aplicó una solución de la mezcla de productos en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, a la columna en fase inversa, y se separaron los productos y se eluyeron usando un gradiente en el que el componente de acetonitrilo del tampón de elución (fase móvil B) fue aumentado como sigue:

Fase móvil B al 28%-30% durante 60 minutos, luego

fase móvil B al 30%-32% durante 30 minutos, luego

fase móvil B al 32%-36% durante 40 minutos.

Se recogieron las fracciones y se analizaron individualmente mediante CLAR para determinar la identidad y la pureza del producto contenido en las mismas. Entonces se mezclaron fracciones comunes que contenían uno de los cuatro productos (monoconjugado A ("monoconjugado A de proinsulina I"), monoconjugado B ("Monoconjugado B de proinsulina I"), diconjugado ("Diconjugado de proinsulina I") y triconjugado ("Triconjugado de proinsulina I"), y se eliminó el disolvente mediante evaporación giratoria. Se usaron una CLAR (Figura 14) y un análisis espectral de masas para determinar la identidad y la pureza de cada aislado.

Ejemplo 13

Escisión mediante una mezcla enzimática los conjugados aislados de proinsulina (I) recombinante

Se disolvió cada conjugado (Mono A, Mono B, Di o Tri de proinsulina I) que fue aislado usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 12 en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, y se usó una CLAR analítica para determinar la concentración de polipéptido de la solución resultante. Se preparó una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se preparó una solución de carboxi-peptidasa B (de páncreas porcino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Entonces se dejó reaccionar la mezcla cruda (1 mmol) con tripsina ($1,39 \times 10^{-3}$ mmoles) y carboxi-peptidasa B ($4,56 \times 10^{-4}$ mmoles). Tras 30 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. Se procesó la mezcla de productos de cada reacción y se analizó mediante CLAR. Se usaron el tiempo de retención de la CLAR en comparación con patrones de referencia y un análisis espectral de masas para determinar la identidad y la pureza de cada producto (Tabla 1).

TABLA 1

Conjugados de proinsulina I con oligómero y productos (o productos esperados) de la escisión mediante una mezcla enzimática de cada uno

Conjugado	Producto (productos esperados)	Figura
Mono A de proinsulina I	Insulina	16

5	Mono B de proinsulina I	(Péptido líder conjugado con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys)	–
	Di de proinsulina I	Insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys ^{B29}	15
10	Tri de proinsulina I	(Insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys ^{B29} y Péptido C conjugado con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys)	–

15

Ejemplo 14

Escisión mediante tripsina de los conjugados aislados de proinsulina I

20

Se disolvió cada conjugado (Mono A, Mono B, Di o Tri de proinsulina I) que fue aislado usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 12 en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, y se analizó mediante CLAR la solución resultante para determinar la concentración de polipéptido. Se preparó una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Entonces se dejó reaccionar cada conjugado (300 mmoles) con tripsina (1 mmol). Tras 20 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. Se aislaron los productos de la reacción y se analizaron mediante el tiempo de retención de una CLAR y un análisis espectral de masas para determinar la identidad. Los productos esperados son insulina (Arg³¹) o insulina (Arg³¹) conjugada con oligómero de hexil-PEG₇ en Lys^{B29} ilustradas en la Tabla 2.

25

TABLA 2

35	Conjugado	Productos esperados
	Mono A de proinsulina I	Insulina(Arg ³¹) y péptido C conjugado con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys
40	Mono B de proinsulina I	Insulina(Arg ³¹) conjugada con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys ^{B29} y péptido C
45	Di de proinsulina I	Insulina(Arg ³¹) conjugada con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys ^{B29} y péptido C conjugado con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys
50	Tri de proinsulina I	Insulina(Arg ³¹) conjugada con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys ^{B29} , péptido C conjugado con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys y péptido líder conjugado con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys

55

Ejemplo 15

Escisión con carboxi-peptidasa B de la mezcla de productos de la escisión con tripsina

60

Se retira una alícuota de la mezcla de reacción que contiene insulina(Arg³¹) conjugada con oligómero de hexil-PEG₇ en Lys^{B29} (300 mmoles) (del Ejemplo 14) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se prepara una solución de carboxi-peptidasa B (de páncreas porcino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se añade carboxi-peptidasa B (1 mmol) a la mezcla de reacción. Se deja continuar la reacción durante 15 horas, y luego se detiene con la adición de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. En la tabla 3, se ilustran los productos esperados de cada reacción.

65

TABLA 3

Conjugado	Productos esperados
Mono A de proinsulina I	Insulina y péptido C conjugado con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys
Mono B de proinsulina I	Insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys ^{B29} y péptido C
Di de proinsulina I	Insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys ^{B29} y péptido C conjugado con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys
Tri de proinsulina I	Insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys ^{B29} , péptido C conjugado con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys y péptido líder conjugado con oligómero de hexil-PEG ₇ en Lys

Ejemplo 16

Preparación de insulina conjugada con oligómero en Lys^{B29}

- (a) *Conjugación de proinsulina recombinante II.* La proinsulina II recombinante (P.M. = 11,133 daltons) se obtiene de Itoham Foods, Inc. de Ibaraki Pref, Japón. La proinsulina II recombinante tenía un péptido líder y un péptido C que carecían ambos de residuos de lisina. Se disolvió una parte de $2,55 \times 10^{-3}$ mmoles de proinsulina II recombinante en 10 ml de DMSO. Se añadieron 355 μ l de trietilamina a la solución. Se dejó agitar la solución resultante durante 5 minutos, y luego se añadió una solución de metilpolietilenglicol activado (oligómero de ((PEG_n)-hexilo) ($n = 7 \pm 3$ o $n = 7$) ($5,10 \times 10^{-3}$ mmoles) en acetonitrilo. El transcurso de la reacción fue controlado mediante CLAR. Cuando la reacción pareció estar completa, se detuvo mediante la adición de 3,7 ml de solución de ácido trifluoroacético acuoso al 5%. Entonces se procesó la mezcla de reacción y se intercambió en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. En la Figura 2, se muestra el perfil de CLAR de la mezcla de productos de la proinsulina I recombinante conjugada con oligómero.
- (b) *Escisión mediante una mezcla enzimática de la proinsulina II recombinante conjugada con oligómero.* Se analizó la solución de Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 16(a) mediante CLAR para determinar la concentración de polipéptido de la misma. Se preparó una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se preparó una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Entonces se dejó reaccionar la mezcla de productos ($0,399 \mu$ moles/ml) con tripsina ($5,57 \times 10^{-4} \mu$ moles/ml) y carboxi-peptidasa B ($1,82 \times 10^{-4} \mu$ moles/ml). Tras 30 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de 550 μ l de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. Los productos principales fueron identificados mediante el tiempo de retención de una CLAR (en comparación con el de patrones de referencia conocidos) y un análisis espectral de masas. Así fueron obtenidas la insulina (23%) y la insulina conjugada con el oligómero de Hexil-PEG_n en Lys^{B29} y otra (17%) (Figuras 9-10).

Ejemplo 17

Aislamiento de los productos de la conjugación de proinsulina II recombinante con oligómero

Se aisló cada producto principal de la reacción de conjugación descrita en el Ejemplo 16(a) usando CLAR de fase inversa. Se empaquetó una columna de CLAR (1,0 cm de d.i. x 25 cm de longitud) con una fase estacionaria de 18 C comercialmente disponible conocida por su utilidad para la resolución de polipéptidos y proteínas, y luego fue incorporada en un sistema de CLAR. Se equilibró el sistema con tampón de elución que era una mezcla de fase móvil A al 75% (H₂O con ácido trifluoroacético al 0,1%) y fase móvil B al 25% (acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1%) que fue administrada a un caudal de 5 ml/min. Se aplicó la solución de Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 16(a) a la columna, y se separaron los productos principales y se eluyeron usando un gradiente de elución en el que la composición del tampón de elución se cambió de la fase B móvil al 25% a la fase B móvil al 35% durante 120 minutos. Se analizaron cada una de las fracciones recogidas mediante CLAR para determinar la identidad y la pureza del producto contenido en las mismas. Entonces se mezclaron fracciones comunes de cada producto ("monoconjugado de proinsulina II" "Mono de proinsulina II") y diconjugado ("Di de proinsulina I"), y se eliminó el disolvente mediante evaporación giratoria. La identidad y la pureza de cada producto fueron determinadas mediante CLAR y análisis espectrométricos (Figuras 2-4).

Ejemplo 18

Escisión mediante una mezcla enzimática los conjugados aislados de proinsulina II recombinante

5 Se disolvió cada conjugado de proinsulina II (Mono, Di o Tri de proinsulina II) que fue aislado usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 17 en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, y se analizó mediante CLAR una alícuota de la solución para determinar la concentración de polipéptido de la misma. Se preparó una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se preparó una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se dejó reaccionar el conjugado (0,127 μ moles/ml) con tripsina ($1,77 \times 10^{-4}$ μ moles/ml) y carboxi-peptidasa B ($5,77 \times 10^{-5}$ μ moles/ml). Tras 30 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de 250 μ l de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. El aislamiento de los productos principales seguido por la identificación mediante el tiempo de retención de CLAR frente a patrones estándar y un análisis espectral de masas demostraron la producción de insulina o insulina acilada en B-29-hexil-PEG₇ en la reacción. En la tabla 4, se ilustran los productos y los rendimientos de cada reacción.

TABLA 4

Conjugado	Productos esperados	Rendimiento
Mono de proinsulina II	Insulina	15%
	Insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG _n en Lys ^{B29}	85%
Di de proinsulina II	Insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG _n en Lys ^{B29}	92%

Ejemplo 19

Escisión mediante tripsina de los conjugados aislados de proinsulina II

35 Se disolvió cada conjugado (Mono, Di o Tri de proinsulina II) del Ejemplo 17 en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, y se analizó la solución resultante mediante CLAR para determinar la concentración de polipéptido de la misma. Se preparó una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Entonces se dejó reaccionar cada conjugado (0,127 μ moles/ml) con tripsina ($4,23 \times 10^{-4}$ μ mol/ml). Tras 20 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de 250 μ l de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. El aislamiento de los productos principales seguido de la identificación mediante el tiempo de retención de CLAR y un análisis espectral de masas demostraron la producción de insulina(Arg³¹) o insulina(Arg³¹) conjugada con oligómero de hexil-PEG_n en Lys^{B29} en la reacción. En la tabla 5, se ilustran los productos y los rendimientos de cada reacción.

TABLA 5

Conjugado	Productos (productos esperados)	Rendimiento
Mono de proinsulina II	Insulina(Arg ³¹)	10%
	Insulina(Arg ³¹) conjugada con oligómero de hexil-PEG _n en Lys ^{B29}	80%
Di de proinsulina II	(Insulina(Arg ³¹) conjugada con oligómero de hexil-PEG _n en Lys ^{B29})	90%

Ejemplo 20

Escisión con carboxi-peptidasa B de la mezcla de la escisión con tripsina

65 Se retiró una alícuota de la mezcla de reacción de Insulina(Arg³¹) conjugada con oligómero de hexil-PEG_n en Lys^{B29} ($3,10 \times 10^{-5}$ mmoles) del Ejemplo 19. Se preparó una solución de carboxi-peptidasa B (de páncreas porcino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se añadió carboxi-peptidasa B ($1,03 \times 10^{-7}$) a la mezcla de reacción. Se dejó continuar la reacción durante 15 horas, y luego se detuvo con la adición de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. Tras el procesamiento, se analizaron los productos de la reacción mediante CLAR. Se usaron el tiempo de retención y un análisis espectral para determinar la identidad. Se produjeron insulina (23%) e Insulina conjugada con oligómero

ES 2 333 781 T3

de hexil-PEG_n en Lys^{B29} (60%) (Figuras 5, 7-8) a partir de la reacción de monoconjugado de proinsulina II. En la tabla 6, se ilustran los productos esperados de la reacción del diconjugado de proinsulina II.

TABLA 6

Conjugado	Productos (productos esperados)	Rendimiento
Mono de proinsulina II	Insulina y	23%
	Insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG _n en Lys ^{B29}	60%
Di de proinsulina II	(Insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG _n en Lys ^{B29})	

Ejemplo 21

Preparación de insulina conjugada con oligómero en Lys^{B29}

- (a) *Conjugación de proinsulina humana natural.* Se disolvió la proinsulina humana natural (Sigma Chemical Co.) ($3,20 \times 10^{-4}$ mmoles) en 5 ml de DMSO. Se añadieron $45 \mu\text{l}$ de trietilamina a la solución. Se dejó agitar la solución durante 5 minutos antes de la adición de una solución de oligómero de PEG₇-hexilo activado ($6,4 \times 10^{-4}$ mmoles) en acetonitrilo. Cuando la reacción hubo progresado tal que el análisis de CLAR indicaba que la proinsulina se había consumido (o que la concentración de proinsulina ya no seguía disminuyendo), se detuvo la reacción mediante la adición de 0,5 ml de solución de ácido trifluoroacético acuoso al 5%. Entonces se procesó la mezcla de reacción y se intercambió en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6.
- (b) *Escisión mediante una mezcla enzimática de la proinsulina natural conjugada con oligómero.* Se analiza una alícuota de la solución de Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 21(a) mediante CLAR para determinar la concentración del polipéptido de la misma. Se prepara una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se prepara una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Entonces se deja reaccionar la mezcla cruda (1 equiv. molar) con tripsina ($1,39 \times 10^{-3}$ equiv. molares) y carboxi-peptidasa B ($4,56 \times 10^{-4}$ equiv. molares). Tras 30 minutos, se detiene la reacción mediante la adición de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. Se procesa la mezcla de productos de la reacción y se analiza mediante CLAR. Se usan el tiempo de retención (en comparación con el de patrones de referencia) y un análisis espectral de masas para determinar la identidad. Los productos esperados de la reacción son insulina e insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG₇ en Lys^{B29}.

Ejemplo 22

Aislamiento de los productos de la conjugación de proinsulina humana natural

Se aísla cada producto principal obtenido de la reacción de conjugación descrita en el ejemplo 11(a) usando CLAR de fase inversa. Se empaqueta una columna (1,0 cm de d.i. x 25 cm de longitud) con una fase estacionaria de 18 C comercialmente disponible conocida por su utilidad para la resolución de polipéptidos y proteínas, y luego se incorpora en un sistema de CLAR. Se equilibra el sistema con tampón de elución que comprende una mezcla de fase móvil A al 75% (H₂O con ácido trifluoroacético al 0,1%) y fase móvil B al 25% (acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1%). Se aplica la solución de Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 21(a) a la columna, y se separan los productos principales y se eluyen usando un gradiente de elución en el que el porcentaje del componente de acetonitrilo es aumentado del 25%-35% durante 120 minutos. Se recogen las fracciones y se analizan mediante CLAR para determinar la identidad y la pureza del producto en las mismas. Se mezclan las fracciones comunes de cada producto y se elimina el disolvente mediante evaporación giratoria. Se determinan la identidad y la pureza de cada máximo de producto mediante CLAR y espectrometría de masas. Los productos esperados constan de 2 monoconjugados de proinsulina humana, 1 diconjugado de proinsulina humana y 1 triconjugado de proinsulina humana.

Ejemplo 23

Escisión mediante una mezcla enzimática de los conjugados aislados de proinsulina humana natural

Se disuelve cada conjugado que es obtenido usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 22 en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, y se analiza mediante CLAR la solución resultante para determinar la concentración de polipéptido de la misma. Se prepara una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se prepara una solución de carboxi-peptidasa B (de páncreas porcino) en tampón de

ES 2 333 781 T3

Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Entonces de deja reaccionar la mezcla cruda (1 equiv. molar) con tripsina ($1,39 \times 10^{-3}$ equiv. molares) y carboxi-peptidasa B ($4,56 \times 10^{-4}$ equiv. molares). Tras 30 minutos, se detiene la reacción mediante la adición de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. Se procesan los productos y se analizan mediante CLAR. Se usan el tiempo de retención (en comparación con el de patrones de referencia) y un análisis espectral de masas para determinar la identidad. Los productos esperados de la reacción son insulina e insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG₇ en Lys^{B29}.

Ejemplo 24

10 *Escisión con tripsina de los conjugados aislados de proinsulina humana natural*

Se disuelve cada conjugado que es obtenido según lo descrito en el Ejemplo 22 en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, y se analiza mediante CLAR la solución resultante para determinar la concentración de polipéptido de la misma. Se prepara una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Entonces de deja reaccionar cada conjugado (300 equiv. molares) con tripsina (1 equiv. molar). Tras 20 minutos, se detiene la reacción mediante la adición de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. Se procesan los productos y se analizan mediante CLAR. Se usan el tiempo de retención y una espectrometría de masas para determinar la identidad. Los productos esperados de la reacción son insulina(Arg³¹) e insulina(Arg³¹) conjugada con oligómero de hexil-PEG₇ en Lys^{B29}.

Ejemplo 25

Escisión con carboxi-peptidasa B de la mezcla de la escisión con tripsina

Se retira una alícuota de la mezcla de reacción de insulina(Arg³¹) conjugada con oligómero de hexil-PEG₇ en Lys^{B29} (300 mmoles) del Ejemplo 24. Se prepara una solución de carboxi-peptidasa B (de páncreas porcino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se añade carboxi-peptidasa B (1 mmol) a la mezcla de reacción. Se deja continuar la reacción durante 15 horas, y luego se detiene con la adición de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. Se procesan los productos y se analizan mediante CLAR. Se usan el tiempo de retención y un análisis espectral de masas para determinar la identidad. Los productos esperados son insulina e insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG₇ en Lys^{B29}.

Ejemplo 26

35 *Preparación optimizada de insulina conjugada con oligómero en Lys^{B29}*

El análisis de los datos experimentales del Ejemplo 11 indicó que se podrían obtener insulina conjugada con oligómero de hexil-PEG₇ en Lys^{B29} y péptido C conjugado con oligómero de hexil-PEG₇ en Lysen un alto rendimiento y pureza mediante (a) la acilación del grupo ϵ -amino de todos los residuos de lisina que están presentes en la materia prima de proinsulina y (b) la escisión de la proinsulina completamente conjugada con oligómero resultante con una mezcla enzimática formada por tripsina y carboxi-peptidasa B. La confirmación experimental de esta hipótesis fue obtenida como se explica a continuación.

(a) *Conjugación de proinsulina I recombinante.* La proinsulina I recombinante (P.M.: 10,642 daltons) es obtenida en Biobras de Belo Horizonte, Brasil. Se disuelve una parte de $2,32 \times 10^{-3}$ mmoles de proinsulina I en 10 ml de DMSO. Se añaden 324 μ l de trietilamina a la solución. Se deja agitar la solución resultante durante 5 minutos, y luego se añade una solución de oligómero de metilheptaetilenglicol(PEG₇)-hexilo activado (4-6 equiv. molares; suficiente para convertir toda la proinsulina I en triconjugado) en acetonitrilo. El transcurso de la reacción de conjugación (acilación) es controlado mediante CLAR. Cuando la reacción parece estar completa (i.e., no se observa nada de proinsulina I sin conjugar mediante CLAR), se detiene mediante la adición de 3,54 ml de solución de ácido trifluoroacético acuoso al 5%. Entonces se procesa la mezcla de reacción y se intercambia en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se espera que el perfil de CLAR de la mezcla de productos, la proinsulina I recombinante conjugada con oligómero, muestre máximos correspondientes al triconjugado (todas las Lys y terminal N conjugados) y sólo diconjugado.

(b) *Escisión mediante una mezcla enzimática de la proinsulina I recombinante conjugada con oligómero.* Se analiza una alícuota de la solución de Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 16(a) mediante CLAR para determinar la concentración del polipéptido. Se prepara una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se prepara una solución de carboxi-peptidasa B (de páncreas porcino) en tampón de Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Entonces de deja reaccionar la mezcla de productos del Ejemplo 16(a) ($0,424 \mu$ moles/ml) con tripsina ($5,97 \times 10^{-4} \mu$ moles/ml) y carboxi-peptidasa B ($1,93 \times 10^{-4} \mu$ moles/ml). Tras 30 minutos, se detiene la reacción mediante la adición de 1,58 ml de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo. Los productos principales son identificados mediante el tiempo de retención de CLAR (en comparación con los tiempos de retención de patrones de referencia conocidos) y un análisis espectral de masas. Se espera que la insulina conjugada con oligómero de Hexil-PEG₇ en Lys^{B29}, el único conjugado de insulina que está presente, se obtenga en un rendimiento de casi el 95%. El péptido C conjugado con oligómero de hexil-PEG₇ en Lys¹ también se obtiene en un rendimiento casi cuantitativo.

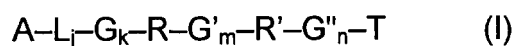
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para sintetizar un monoconjugado de insulina-oligómero que comprende:
- 5 (i) poner en contacto una proinsulina con un oligómero,
- en el que la proinsulina comprende una insulina que tiene una cadena A y una cadena B, y un péptido C conector acoplado en un primer extremo con el terminal C de la cadena B y acoplado en un segundo extremo con el terminal N de la cadena A mediante enlaces peptídicos, y un péptido líder acoplado al terminal N de la cadena B mediante un enlace peptídico, en el que los enlaces peptídicos son capaces de ser escindidos enzimáticamente para producir el monoconjugado de insulina-oligómero, y
- 10 en el que el oligómero comprende un resto hidrófilo y un resto lipófilo, y
- 15 en el que la proinsulina y el oligómero son puestos en contacto en condiciones suficientes para acoplar el oligómero al residuo de lisina de la parte de insulina de la proinsulina y proporcionar un monoconjugado de proinsulina-oligómero; y
- 20 (ii) escindir enzimáticamente el péptido C y el péptido líder del monoconjugado de proinsulina-oligómero para proporcionar el monoconjugado de insulina-oligómero.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la puesta en contacto de la proinsulina con el oligómero comprende:
- 25 poner en contacto el oligómero con un agente de activación en condiciones suficientes para proporcionar un oligómero activado capaz de acoplarse a una funcionalidad nucleófila de la proinsulina; y
- 30 poner en contacto el oligómero activado con la proinsulina en condiciones suficientes para proporcionar el monoconjugado de proinsulina-oligómero.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la puesta en contacto del oligómero con el agente de activación y la puesta en contacto del oligómero activado con la proinsulina se realiza *in situ*.
- 35 4. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la proporción molar entre el oligómero activado y la proinsulina es mayor de aproximadamente 4:1.
- 40 5. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el péptido C carece de residuos de lisina.
6. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el péptido C tiene un residuo de aminoácido terminal en el primer extremo y en el que la escisión del péptido C del monoconjugado de proinsulina-oligómero comprende:
- 45 poner en contacto el monoconjugado de proinsulina-oligómero con una primera enzima en condiciones suficientes para proporcionar un monoconjugado de residuo de aminoácido terminal-polipéptido insulina-oligómero; y
- poner en contacto el monoconjugado de residuo de aminoácido terminal-insulina-oligómero con una segunda enzima en condiciones suficientes para proporcionar el monoconjugado de insulina-oligómero.
- 50 7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que el residuo de aminoácido terminal es un residuo de arginina.
8. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que la puesta en contacto del monoconjugado de proinsulina-oligómero con una primera enzima y la puesta en contacto del monoconjugado de residuo de aminoácido terminal-insulina-oligómero con una segunda enzima tienen lugar de manera sustancialmente simultánea.
- 55 9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que la primera enzima y la segunda enzima son proporcionadas en una mezcla que comprende la primera enzima y la segunda enzima.
- 60 10. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que la primera enzima es tripsina y en el que la segunda enzima es carboxi-peptidasa B.
11. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el péptido líder carece de residuos de lisina.
- 65 12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la escisión del péptido C del monoconjugado de proinsulina-oligómero comprende poner en contacto el monoconjugado de proinsulina-oligómero con una o más enzimas que sean capaces de escindir el o los enlaces entre el péptido C y la cadena A y B de la insulina en condiciones suficientes para escindir el péptido C del monoconjugado de proinsulina-oligómero.

ES 2 333 781 T3

13. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que la una o más enzimas se seleccionan del grupo constituido por tripsina, carboxi-peptidasa B y mezclas de las mismas.

14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el oligómero comprende la estructura de fórmula I:



10

en la que:

A es un resto activable seleccionado del grupo constituido por -C(O)-OH, C(S)-OH, -C(S)-SH, -OH, -SH y NH₂;

15

L es un resto ligador seleccionado del grupo constituido por restos de alquilo y restos de ácido graso;

G, G' y G'' son cada uno restos espaciadores, y se seleccionan individualmente del grupo constituido por restos de azúcar, colesterol y restos de glicerina;

20

R es un resto lipófilo y R' es un resto de polialquilenglicol, o R' es el resto lipófilo y R es el resto de polialquilenglicol;

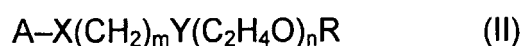
T es un resto de terminación seleccionado del grupo constituido por un resto de alquilo, un resto de azúcar, colesterol, adamantano, un resto de alcohol o un resto de ácido graso; y

25

j, k, m y n son individualmente 0 ó 1.

15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el oligómero comprende la estructura de fórmula II:

30



35

en la que:

A es -C(O)-OH, C(S)-OH, -C(S)-SH, -OH, -SH o NH₂;

40

X es un átomo de oxígeno o un enlace covalente con la condición de que X no sea un átomo de oxígeno cuando A sea -OH;

Y es un resto de unión de éster, de éter, de carbamato, de carbonato o de amida;

45

m es entre 1 y 30;

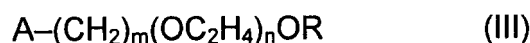
n es entre 1 y 50; y

R es un resto de alquilo, un resto de azúcar, colesterol, adamantano, un resto de alcohol o un resto de ácido graso.

50

16. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el oligómero comprende la estructura de fórmula III:

55



en la que:

60

A es -C(O)-OH, C(S)-OH, -C(S)-SH, -OH, -SH o NH₂;

m es entre 1 y 25;

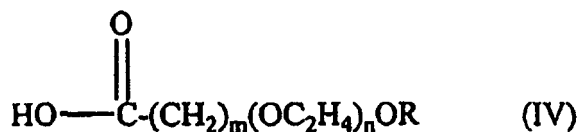
n es entre 1 y 25; y

65

R es alquilo.

ES 2 333 781 T3

17. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el oligómero comprende la estructura de fórmula IV:



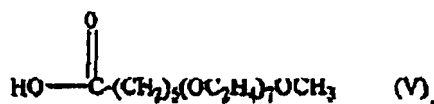
en la que:

m es entre 1 y 30;

m es entre 1 y 50; y

R es alquilo.

18. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el oligómero comprende la estructura de fórmula V:



19. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la insulina es insulina humana.

20. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que el oligómero está acoplado a la lisina en la posición B29 de la insulina.

21. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el monoconjugado de insulina-oligómero está anfifílicamente equilibrado.

22. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el oligómero está presente como una mezcla sustancialmente monodispersada.

23. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el rendimiento del monoconjugado de insulina-oligómero es mayor del 75%.

24. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la insulina se selecciona entre insulina Gly^{A21}, humana; insulina Gly^{A21} Gln^{B3}, humana; insulina Ala^{A21}, humana; insulina Ala^{A21} Gln^{B3}, humana; insulina Gln^{B3}, humana; insulina Gln^{B30}, humana; insulina Gly^{A21} Glu^{B30}, humana; insulina Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30}, humana; insulina Gln^{B3} Glu^{B30}, humana; insulina Asp^{B28}, humana; insulina Lys^{B28}, humana; insulina Leu^{B28}, humana; insulina Val^{B28}, humana; insulina Ala^{B28}, humana; insulina Asp^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Lys^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Leu^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Val^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Ala^{B28} Pro^{B29}, humana.

25. Un monoconjugado de proinsulina-oligómero que comprende una proinsulina y un oligómero,

en el que la proinsulina comprende una insulina que tiene una cadena A y una cadena B; un péptido C conector acoplado en un primer extremo con el terminal C de la cadena B y acoplado en un segundo extremo con el terminal N del polipéptido de la cadena A mediante enlaces peptídicos; y un péptido líder acoplado al terminal N del polipéptido de la cadena B mediante un enlace peptídico, y

en el que el oligómero comprende un resto hidrófilo y un resto lipófilo, resto hidrófilo que comprende al menos un resto de polialquilenglicol, y

en el que el oligómero está acoplado al residuo de lisina de la parte de insulina de la proinsulina.

26. El monoconjugado según la reivindicación 25, en el que el péptido C carece de residuos de lisina.

27. El monoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 25 ó 26, en el que la insulina es insulina humana.

28. El monoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 25 ó 26, en el que la insulina es insulina humana y en el que el residuo de lisina está en la posición B29 de la insulina.

ES 2 333 781 T3

29. El monoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 25 ó 26, en el que la insulina se selecciona entre insulina Gly^{A21}, humana; insulina Gly^{A21} Gln^{B3}, humana; insulina Ala^{A21}, humana; insulina Ala^{A21} Gln^{B3}, humana; insulina Gln^{B3}, humana; insulina Gln^{B30}, humana; insulina Gly^{A21} Glu^{B30}, humana; insulina Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30}, humana; insulina Gln^{B3} Glu^{B30}, humana; insulina Asp^{B28}, humana; insulina Lys^{B28}, humana; insulina Leu^{B28}, humana; insulina Val^{B28}, humana; insulina Ala^{B28}, humana; insulina Asp^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Lys^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Leu^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Val^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Ala^{B28} Pro^{B29}, humana.

30. Monoconjugado de insulina-oligómero que comprende una insulina acoplada en una función amino de la posición B29 de la lisina a un resto oligomérico que tiene la siguiente estructura:



en la que:

m es entre 1 y 30;

n es entre 1 y 50; y

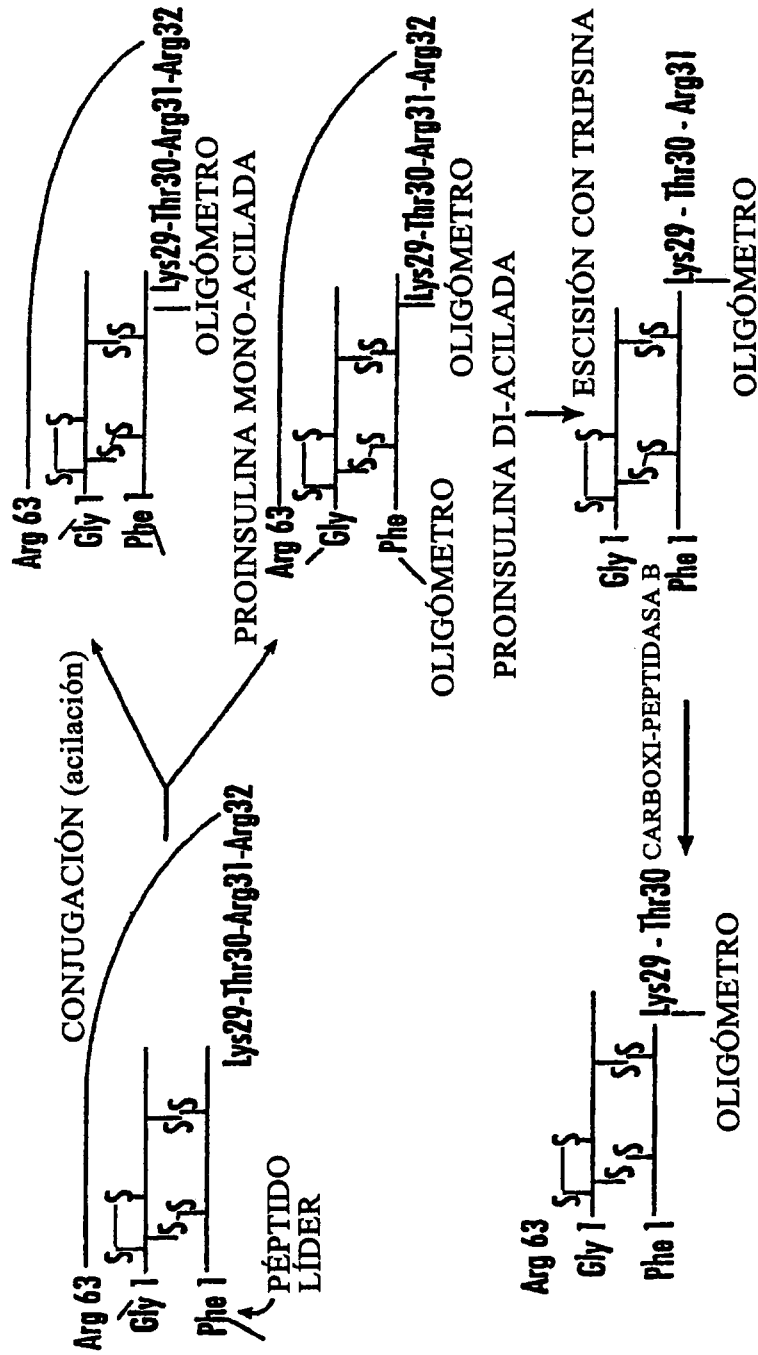
R es alquilo.

31. El monoconjugado según la reivindicación 30, en el que el oligómero tiene la siguiente estructura:



32. El monoconjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 30 ó 31, en el que la insulina se selecciona entre insulina Gly^{A21}, humana; insulina Gly^{A21} Gln^{B3}, humana; insulina Ala^{A21}, humana; insulina Ala^{A21} Gln^{B3}, humana; insulina Gln^{B3}, humana; insulina Gln^{B30}, humana; insulina Gly^{A21} Glu^{B30}, humana; insulina Gly^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30}, humana; insulina Gln^{B3} Glu^{B30}, humana; insulina Asp^{B28}, humana; insulina Lys^{B28}, humana; insulina Leu^{B28}, humana; insulina Val^{B28}, humana; insulina Ala^{B28}, humana; insulina Asp^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Lys^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Leu^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Val^{B28} Pro^{B29}, humana; insulina Ala^{B28} Pro^{B29}, humana.

PREPARACIÓN DE INSULINA MODIFICADA EN Lys de B-29 USANDO PROINSULINAS



INSULINA ACILADA EN Lys DE B-29 (HIM2)

INSULINA ACILADA EN Lys DE B-29-Arg³¹ (HIM2-Arg³¹)

FIG. 1.

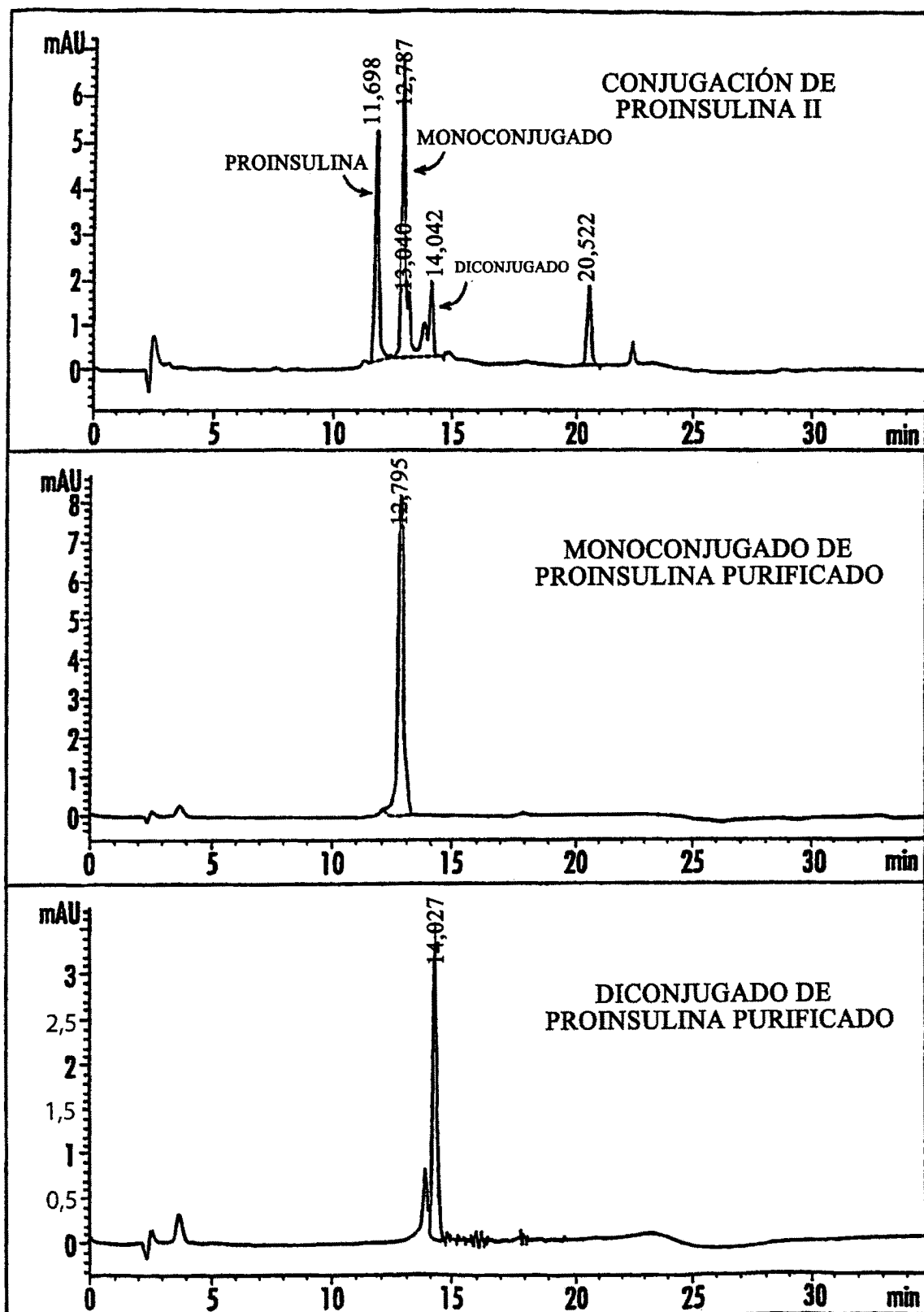


FIG. 2.

MONOCONJUGADO DE PROINSULINA II PURIFICADO

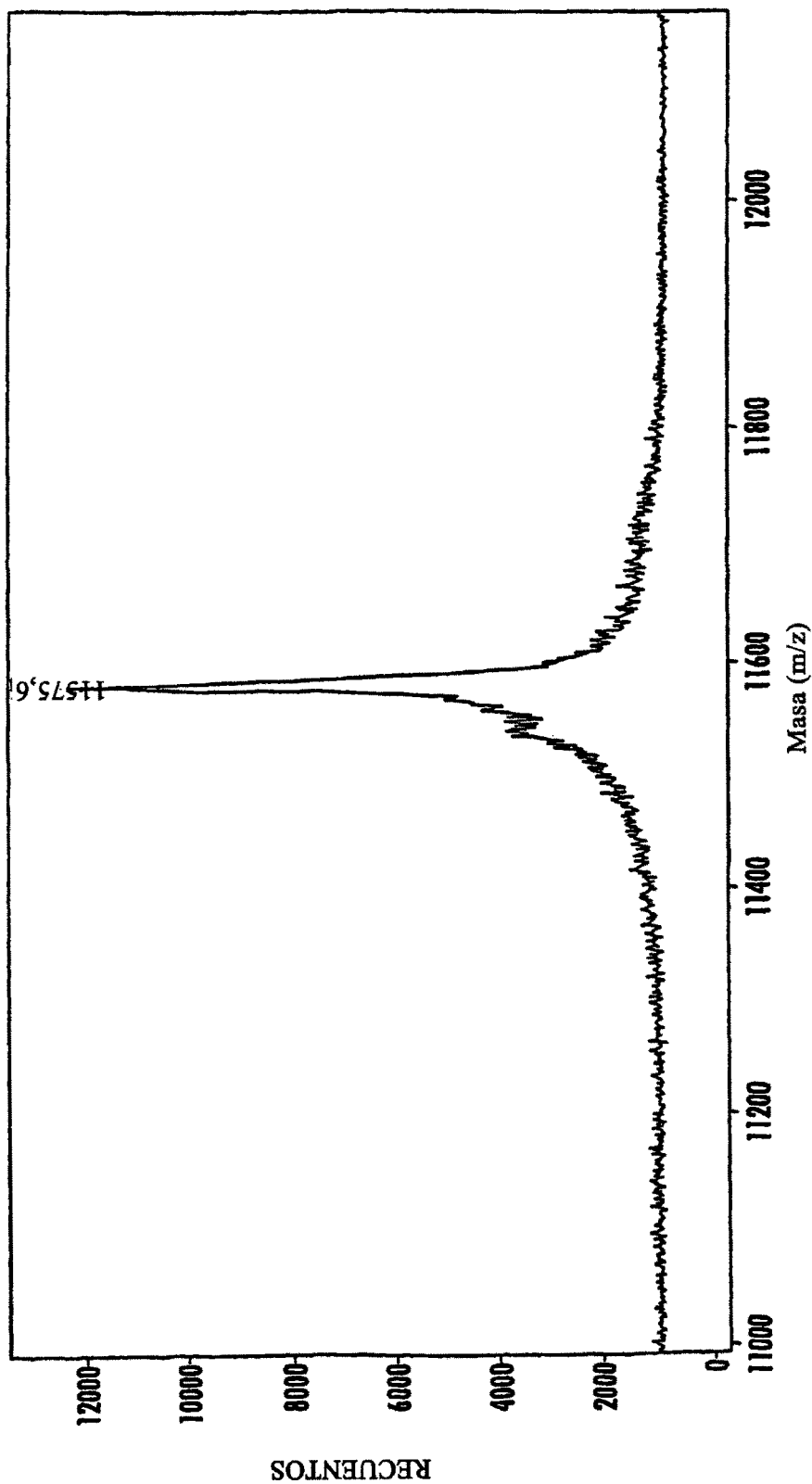


FIG. 3.

DOCONJUGADO DE PROINSULINA II PURIFICADO

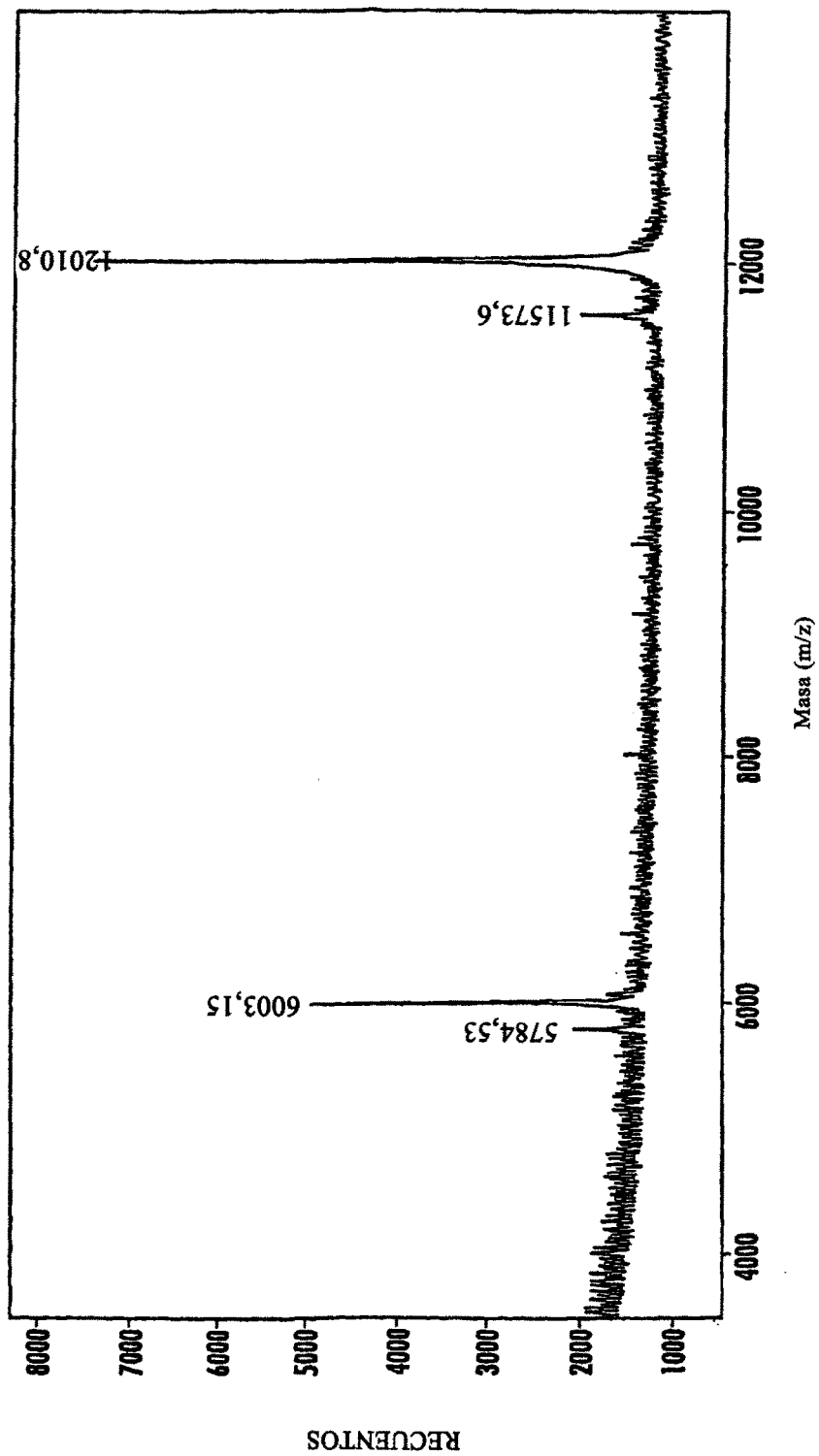


FIG. 4.

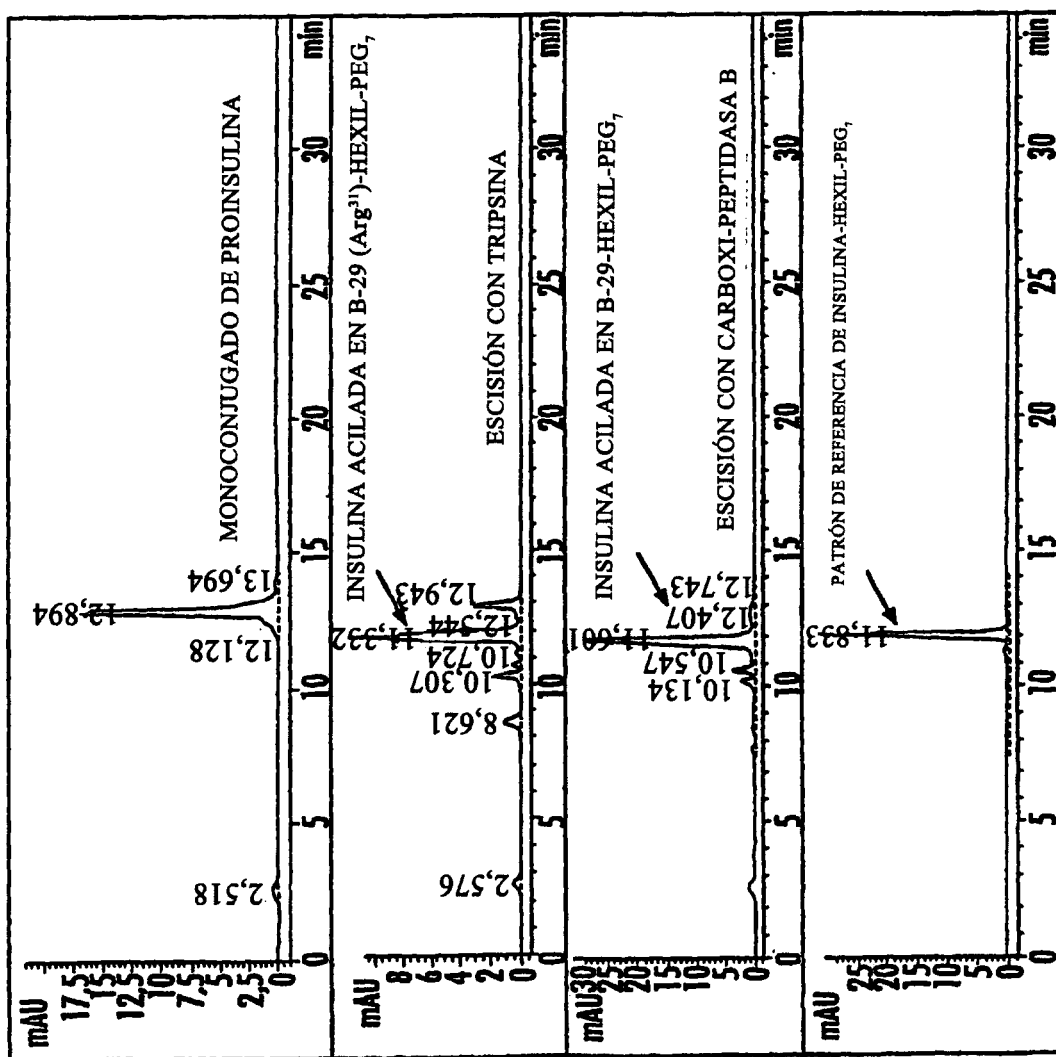


FIG. 5.

PRODUCTO DE LA ESCISIÓN CON TRIPSINA DEL
MONOCONJUGADO DE PROINSULINA II

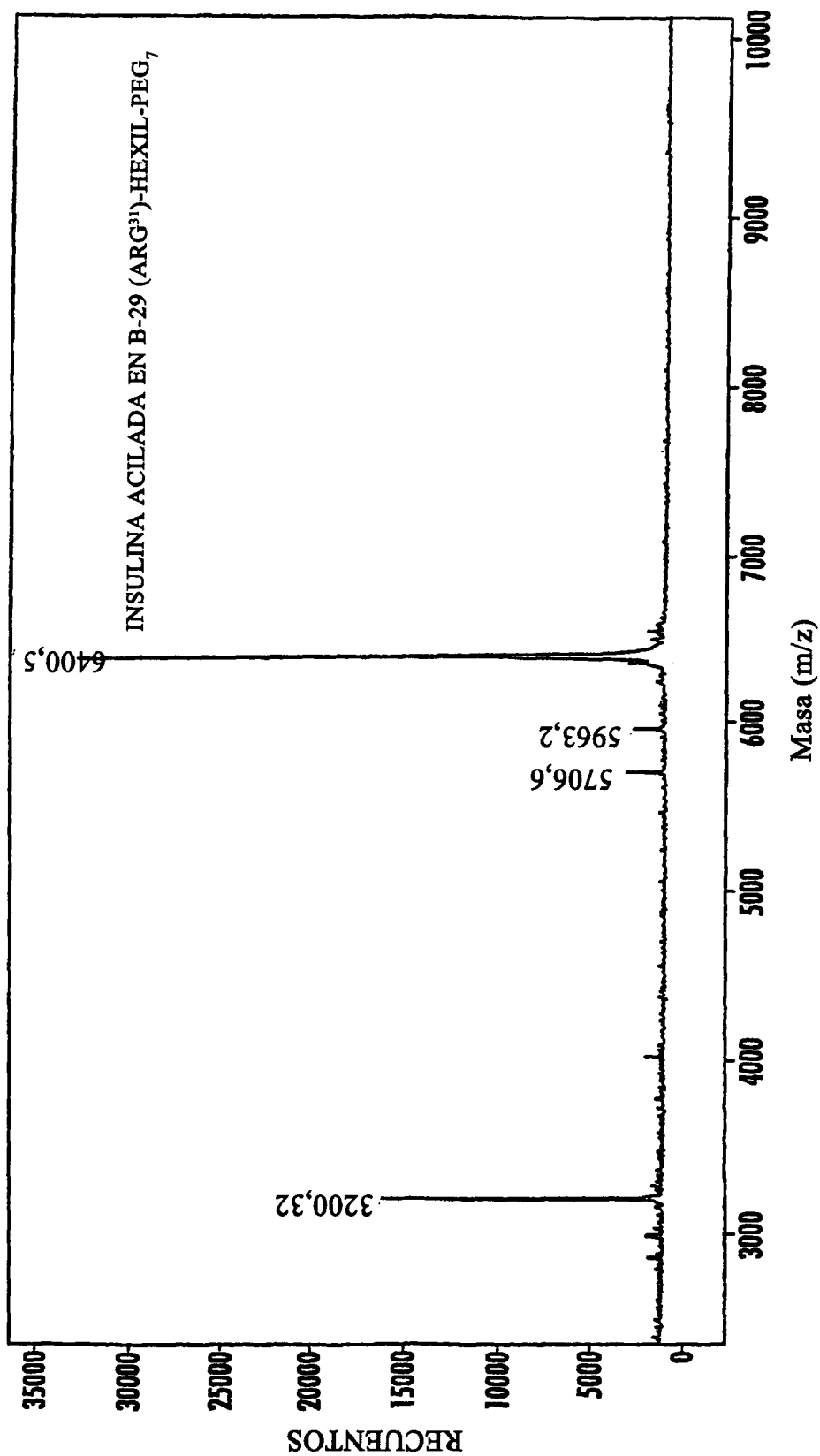


FIG. 6.

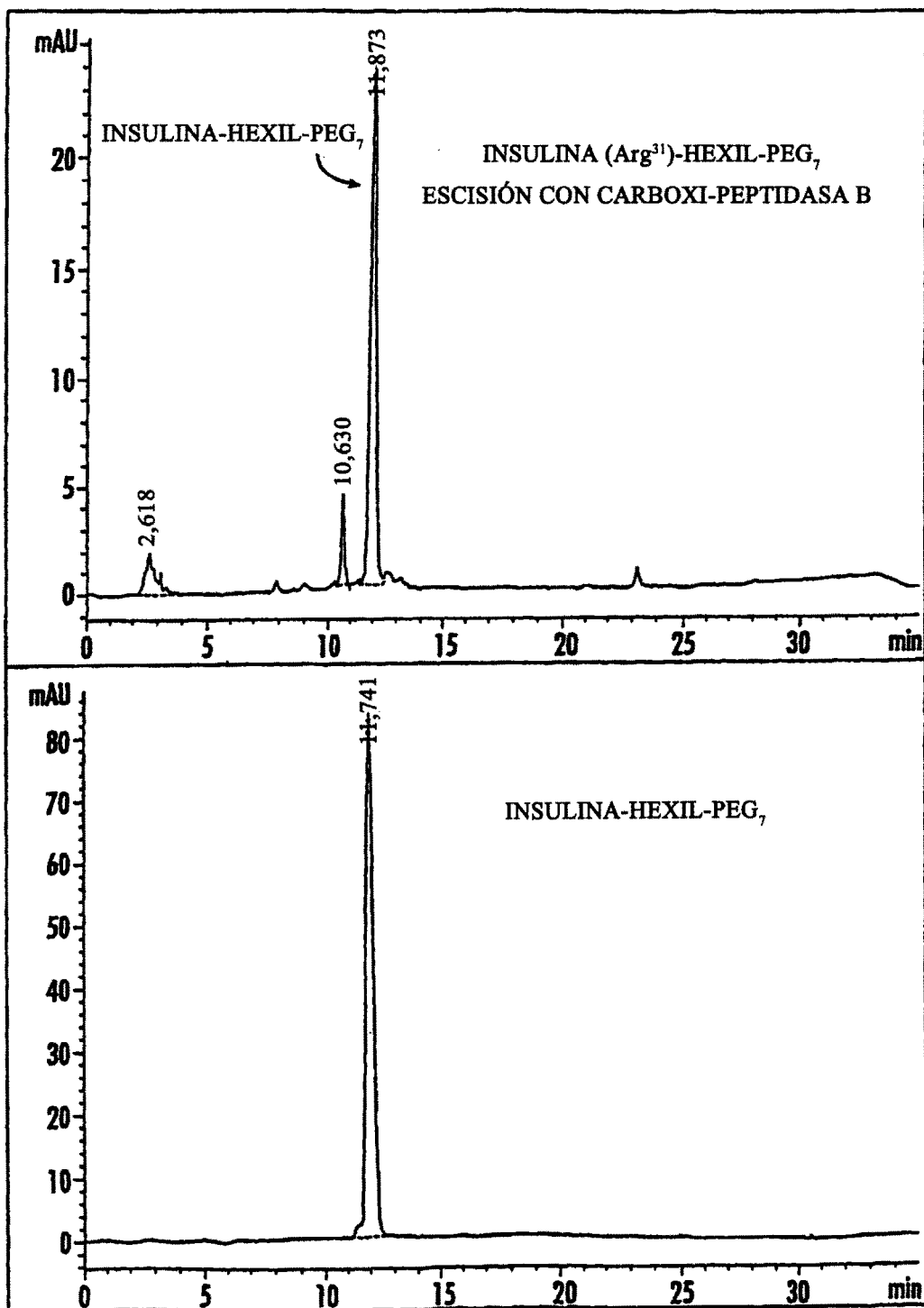


FIG. 7.

PRODUCTO DE LA ESCISIÓN CON CARBOXI-PEPTIDASA B DE
INSULINA ACILADA EN B-29 (Arg³¹)-HEXIL-PEG₇

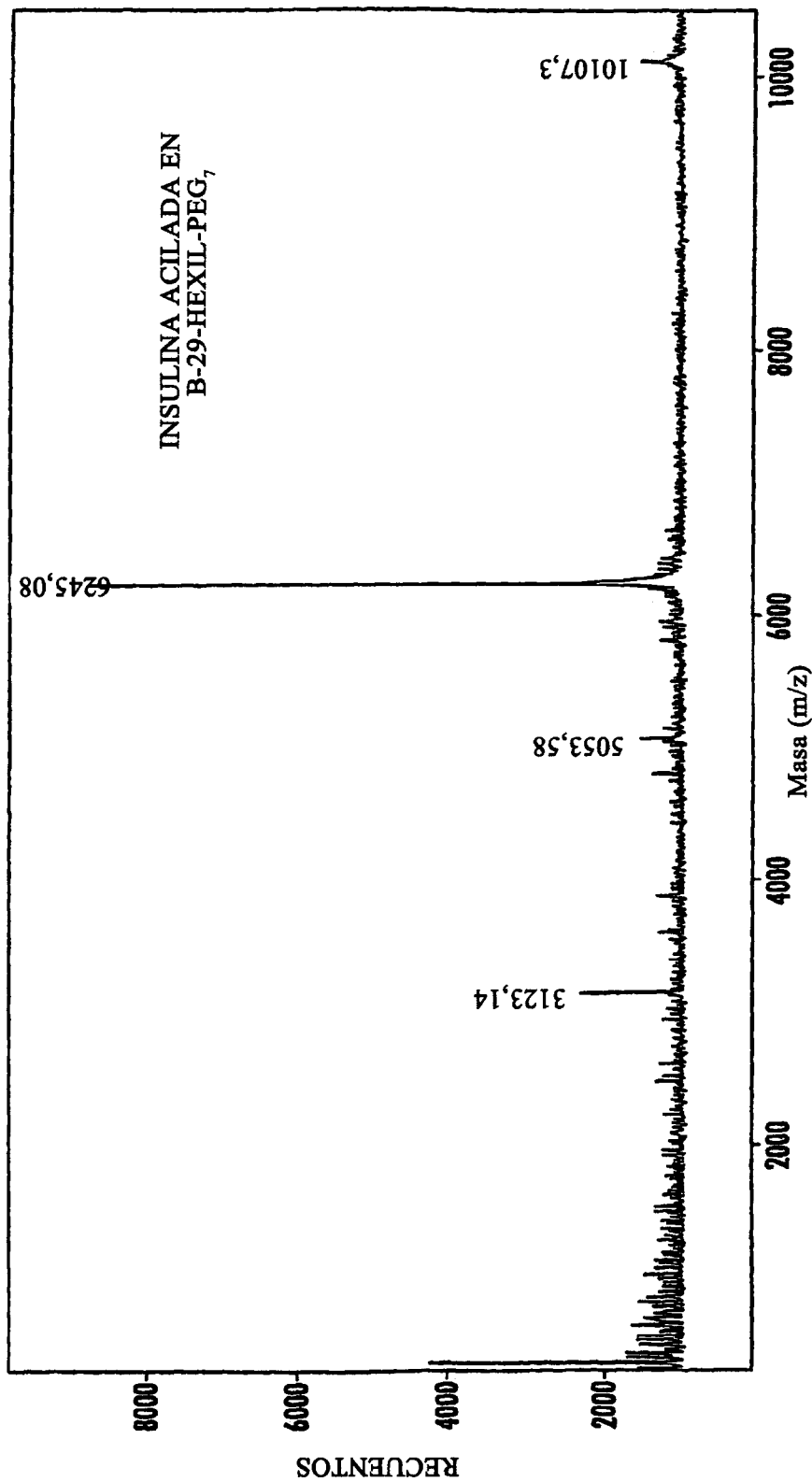


FIG. 8.

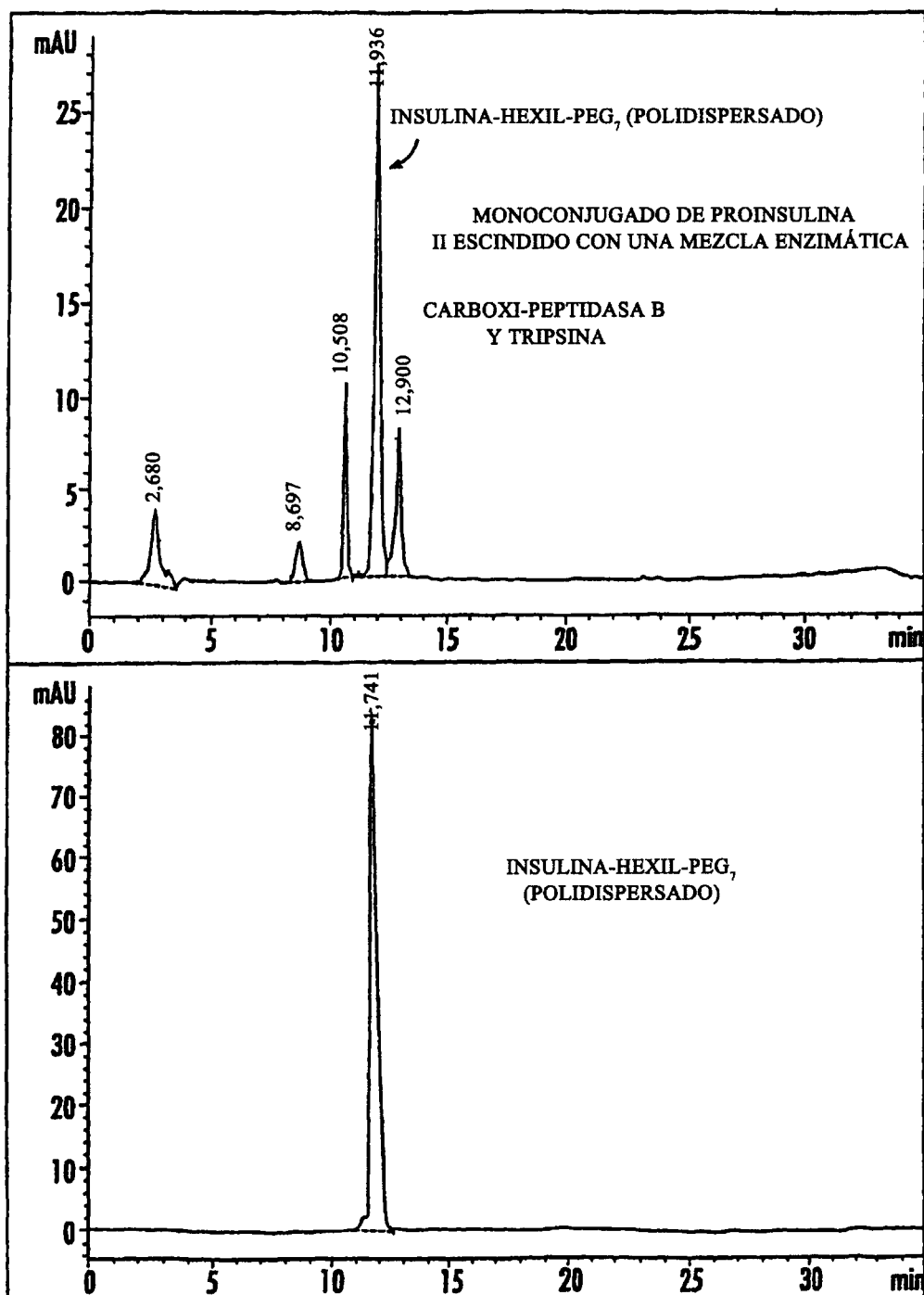


FIG. 9.

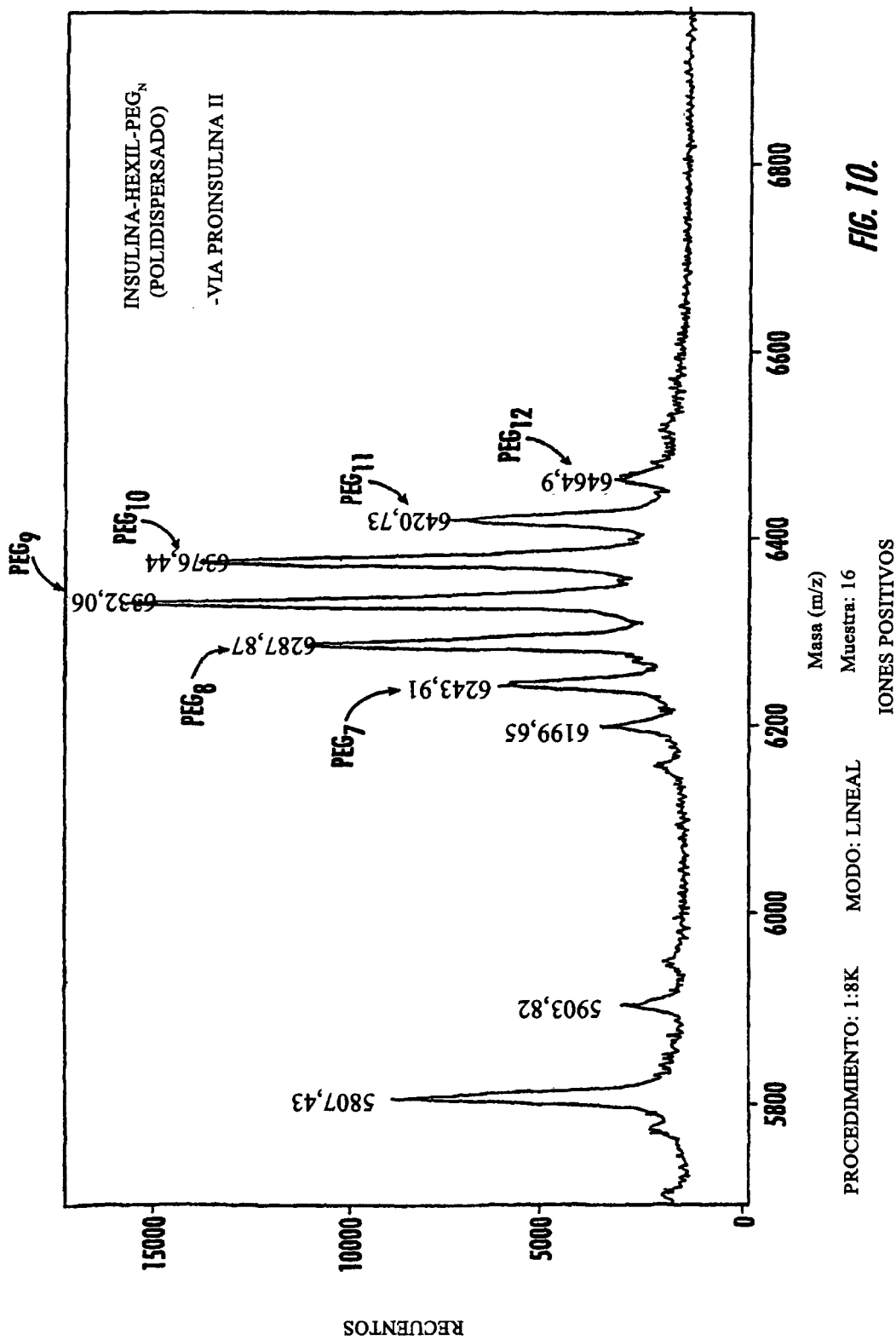


FIG. 10.

PERFIL DE CLAR DE LA PRODUCCIÓN DE INSULINA ACILADA EN B-29-HEXIL-PEG, MEDIANTE PROINSULINA I

CROMATOGRAMA(S) ACTUAL(ES)

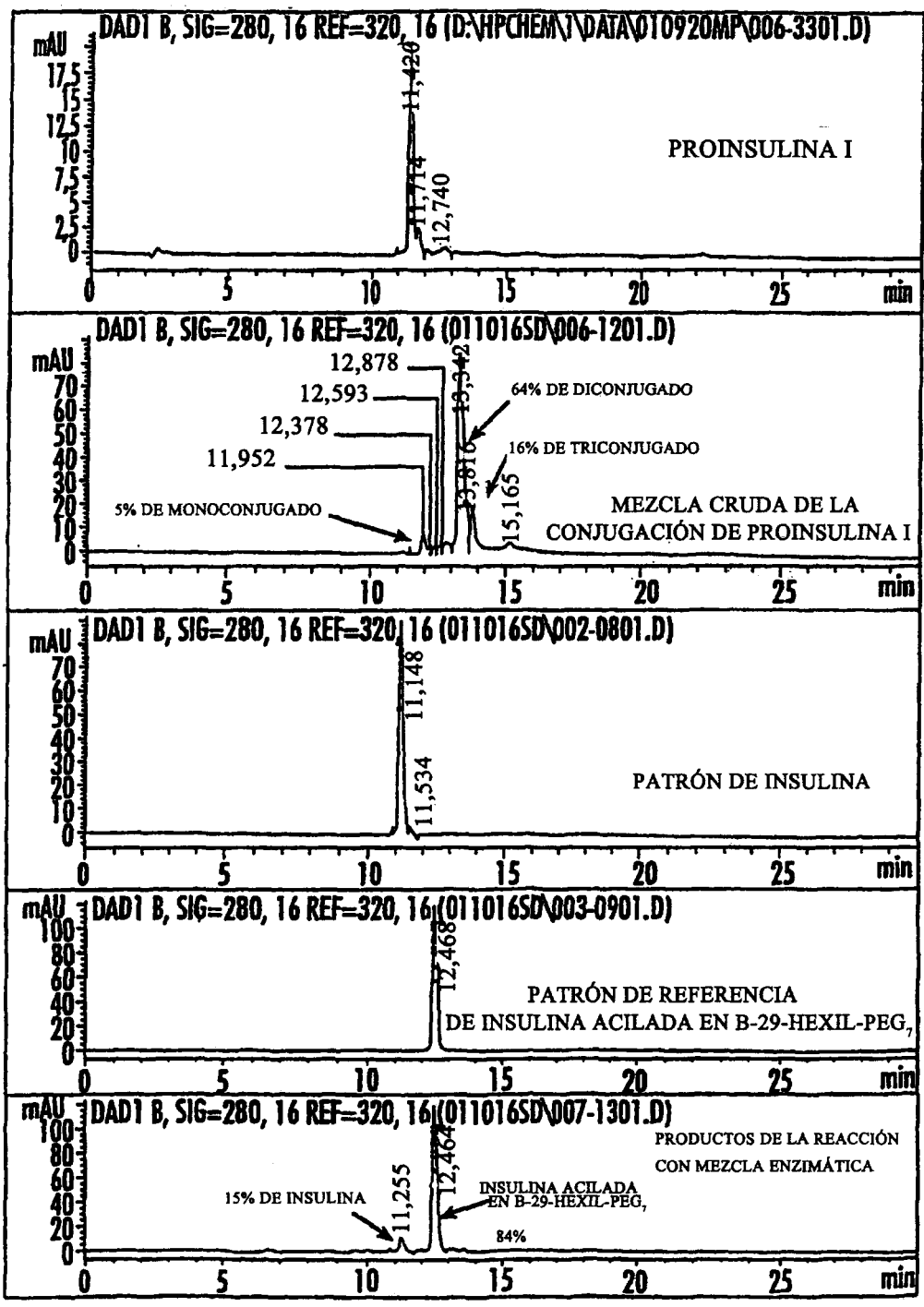


FIG. 11.

ESPECTRO DE MASAS DE INSULINA ACILADA
EN B-29-HEXIL-PEG₇ MEDIANTE PROINSULINAI

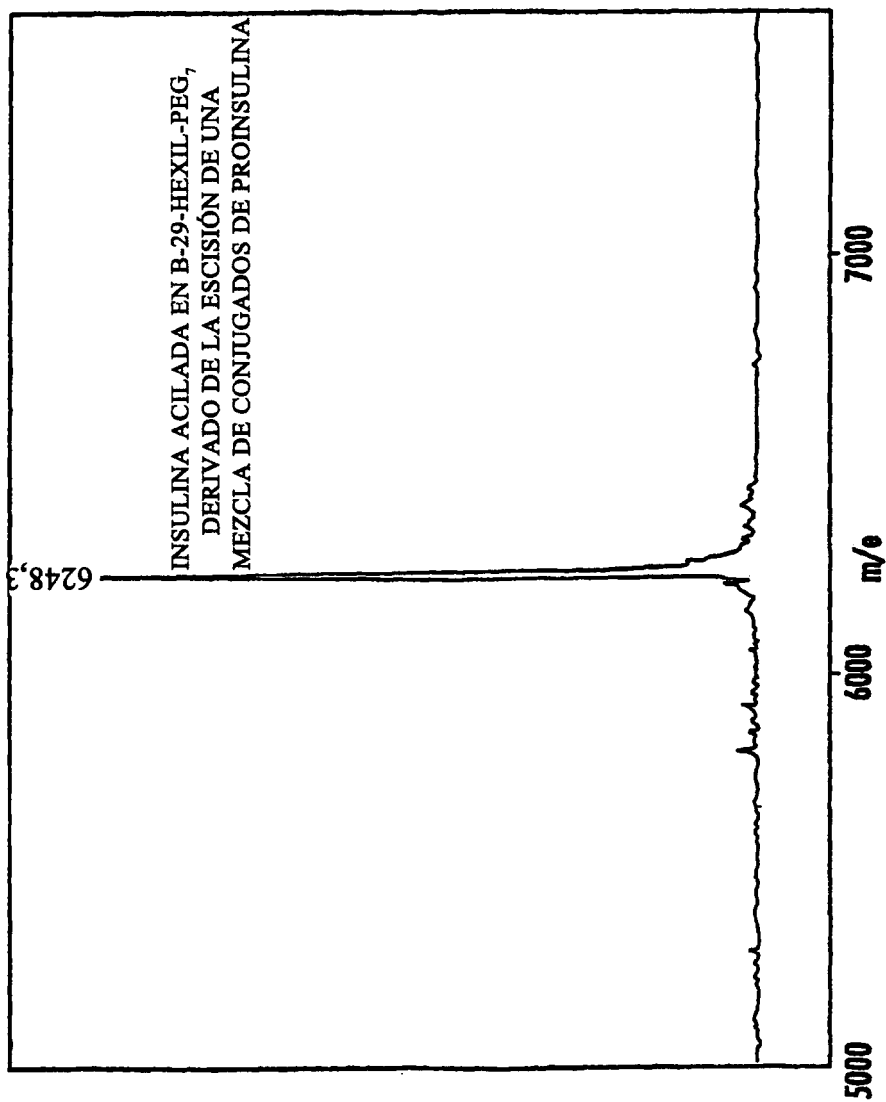


FIG. 12.

ELECTROSCOPIA DE MASAS MALDI

ESPECTRO DE MASAS DE INSULINA MEDIANTE PROINSULINA I

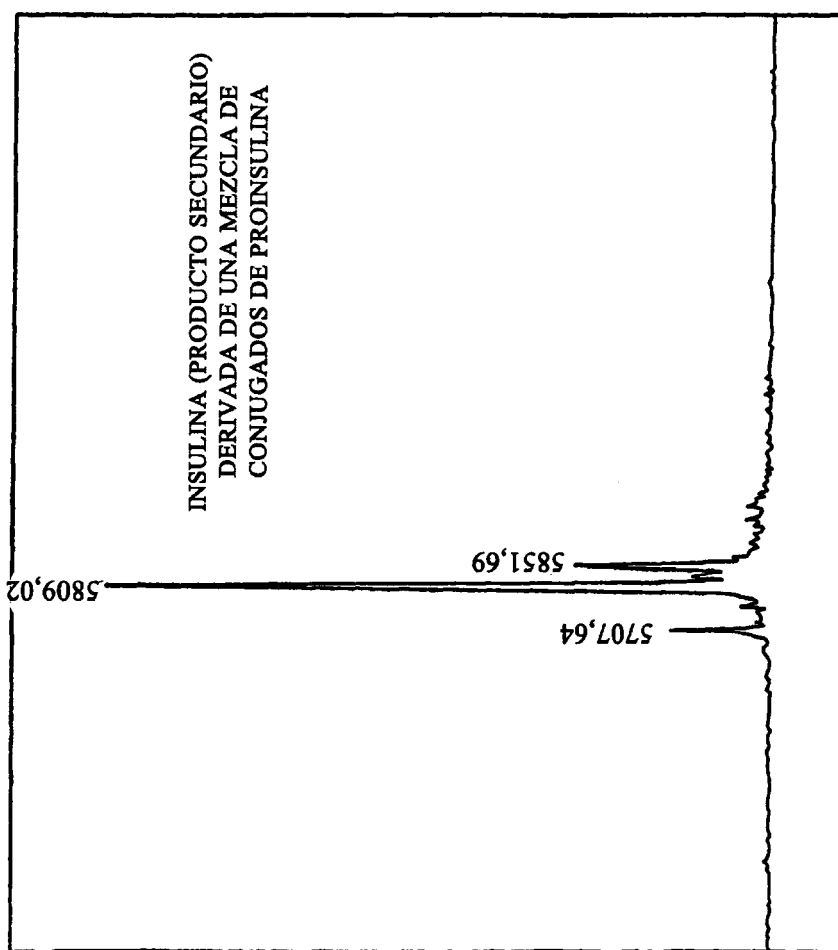


FIG. 13.

ESPECTROSCOPIA DE MASAS MALDI

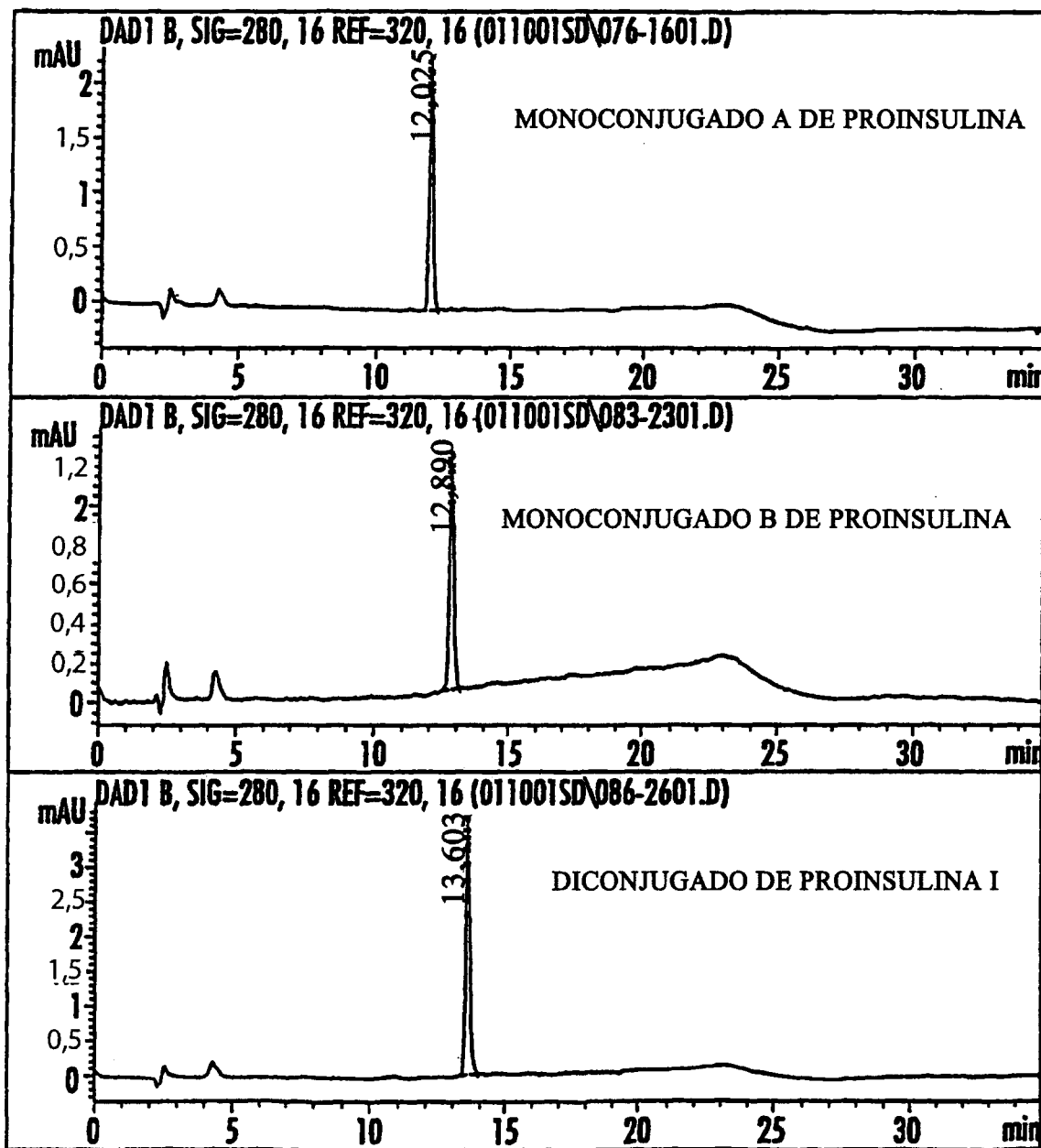


FIG. 14.

CRONOMATOGRAMA(S) ACTUAL(ES)

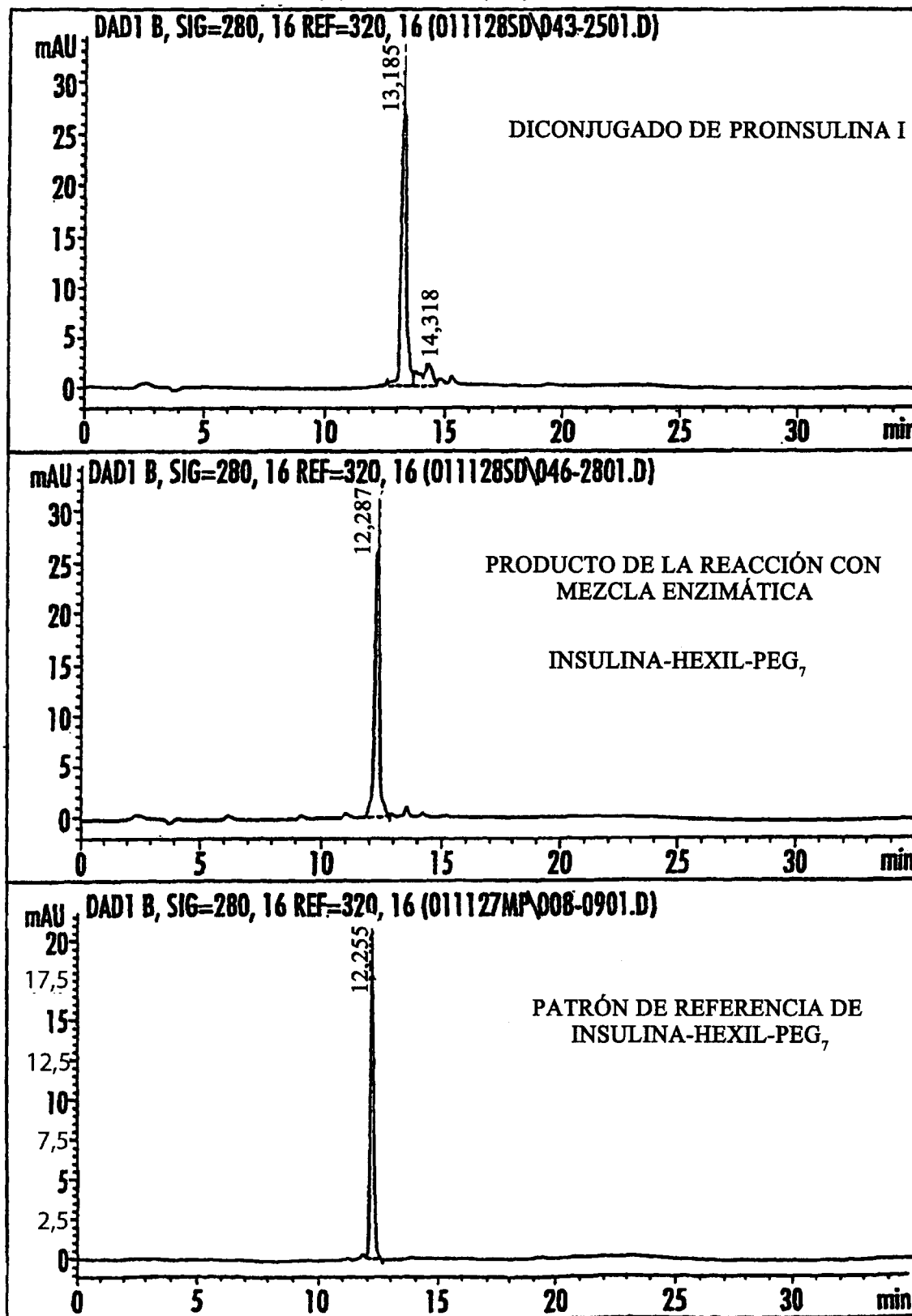


FIG. 15.

CRONOGRAMA(S) ACTUAL(ES)

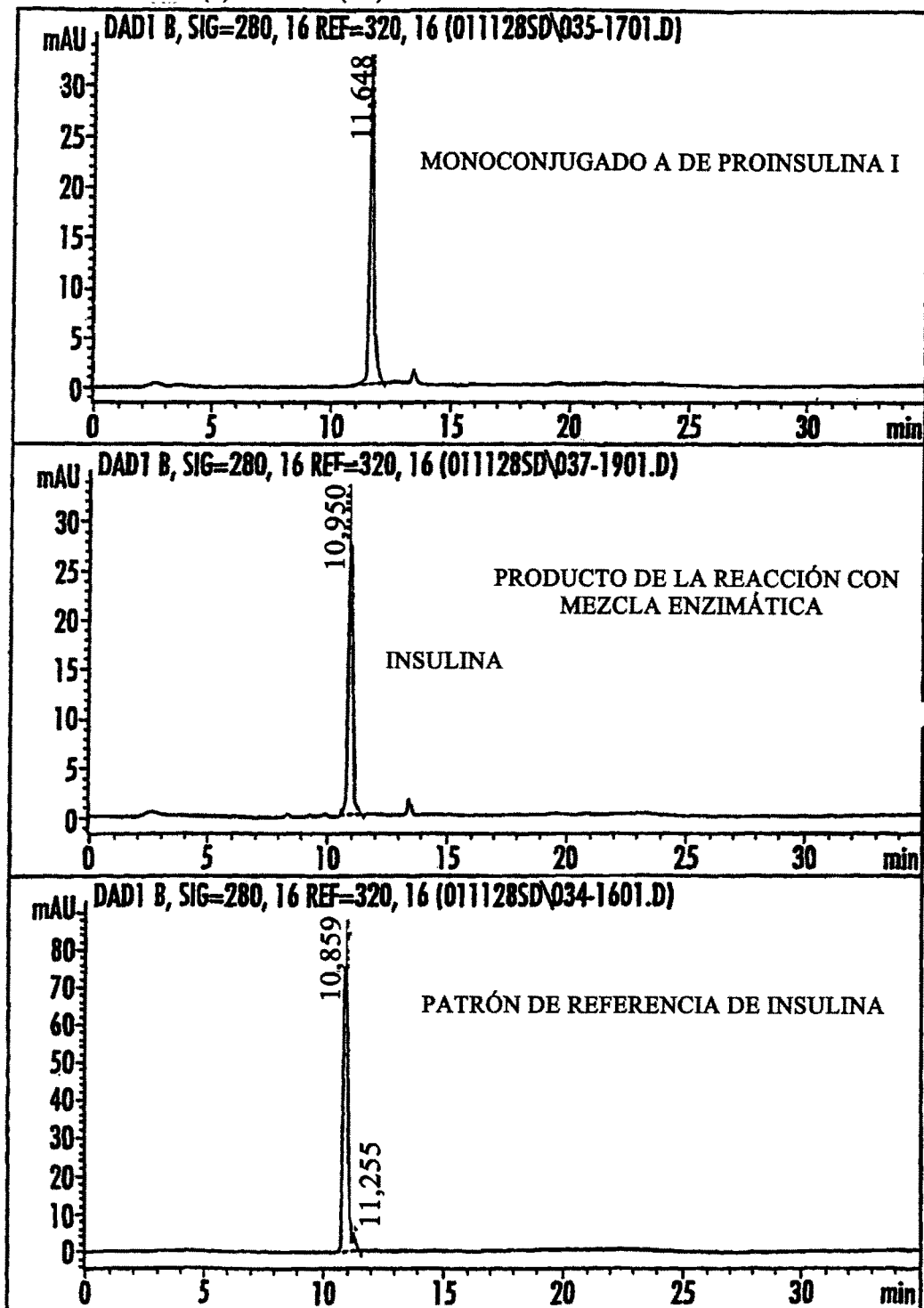


FIG. 16.