



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 166**

51 Int. Cl.:
C07K 14/62 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05784019 .1**
96 Fecha de presentación : **08.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1907419**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **Conjugados de insulina.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.06.2011

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

72 Inventor/es: **Dave, Nitesh;**
Krishnan, Gautam;
Suryanarayan, Shrikumar;
Hazra, Partha;
Manjunath, H.S.;
Khedkar, Anand y
Iyer, Harish

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 361 166 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

Conjugados de insulina

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para elaborar un conjugado de insulina-oligómero como una reacción en un solo reactor mediante la conjugación de un éster de insulina con un oligómero activado en la que se llevan a cabo desbloqueo y conjugación simultáneos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Las células β de los islotes pancreáticos secretan un precursor monocatenario de insulina, conocido como proinsulina, que durante la proteólisis da como resultado el polipéptido biológicamente activo insulina. La molécula de insulina está altamente conservada a través de las especies y consiste generalmente en dos cadenas de aminoácidos conectadas por enlaces disulfuro. La molécula de insulina humana natural (pm 5.807 daltons) tiene una cadena A de 21 residuos de aminoácido con glicina en el extremo amino; y una cadena B de 30 residuos de aminoácido con fenilalanina en el extremo amino. La insulina puede existir como un monómero o puede agregarse en un dímero o un hexámero formado por tres de los dímeros. El monómero tiene la capacidad de unirse a receptores y es la forma biológicamente activa.

- 15 El polipéptido de insulina es la principal hormona responsable de controlar el transporte, la utilización y el almacenamiento de glucosa en el cuerpo. Un defecto en el metabolismo de los carbohidratos como resultado de la producción insuficiente de insulina o la sensibilidad reducida del receptor a insulina conduce al trastorno biológico diabetes. La diabetes impide la capacidad normal para usar la glucosa y como resultado incrementa los niveles de azúcar en sangre (hiperglucemia). A medida que la glucosa se acumula en la sangre, niveles excesivos de azúcar se secretan en la orina (glicosuria). Otros síntomas de la diabetes incluyen volumen y frecuencia urinarios incrementados, sed, picazón, hambre, pérdida de peso y debilidad. La diabetes, cuando no se trata, conduce a cetosis, seguida por acidosis con náuseas y vómitos. A medida que los productos tóxicos continúan acumulándose, el paciente entra en coma diabético, lo que conduce a la muerte del paciente. Existen dos tipos de diabetes - la Tipo I es la diabetes mellitus insulino dependiente o IDDM: la IDDM se denominó primeramente "diabetes de comienzo juvenil". En la IDDM, la insulina no es secretada por el páncreas y debe proporcionarse a partir de una fuente externa. La diabetes Tipo II o de comienzo adulto puede controlarse normalmente mediante la dieta, aunque en algunos casos avanzados se requiere insulina.

- 20 Banting et ál divulgan el uso de insulina para el tratamiento de la diabetes usando un extracto activo procedente del páncreas de perros diabéticos "Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus" (Can. Med. Assoc. J., 12:141-146 (1922)). En el mismo año, el tratamiento de un paciente diabético con extractos pancreáticos dio como resultado una drástica mejora clínica que salva vidas.

- 25 Tradicionalmente, se usaron casi exclusivamente insulina bovina y porcina para tratar la diabetes en seres humanos. Con el desarrollo de la tecnología recombinante, la fabricación a escala comercial de insulina humana se hizo posible mediante fermentación. Por otra parte, análogos de insulina genéticamente manipulados que tenían una actividad biológica comparable a la de la insulina humana natural se desarrollaron para combatir la enfermedad.

- 30 Sin embargo, el tratamiento de la diabetes requiere típicamente inyecciones regulares de insulina. Debido a la incomodidad de las inyecciones de insulina, se han probado diversos sistemas para formular insulina para la administración mediante rutas no inyectables. Una lista de tales divulgaciones incluye: US 4.338.306 (Kitao et ál.) divulga composiciones farmacéuticas de insulina y ácidos grasos que tienen de 8 a 14 átomos de carbono y sales atóxicas de los mismos para administración rectal de insulina; US 4.579.730 (Kidron et ál.) divulga composiciones de insulina revestidas entéricamente con un ácido biliar o una sal de metal alcalino del mismo para la administración oral de insulina; US 5.283.236 (Chiou et ál.) divulga una composición de insulina con un agente que mejora la penetración para ayudar a la absorción sistémica de polipéptidos de peso molecular superior, así como inhibidores de peptidasa para el aporte sistémico de insulina a través de los ojos, en donde el fármaco pasa al conducto nasolacrimal y se absorbe en la circulación; US 5.658.878 (Backstrom et ál.) divulga una insulina y sal sódica de un ácido graso saturado de una longitud de la cadena de carbonos 10 (es decir, caprato sódico), 12 (laurato sódico) o 14 (miristato sódico) que mejora la absorción de insulina en el tracto respiratorio inferior; US 5.853.748 (New et ál.) divulga una composición revestida entéricamente de insulina, una sal biliar o un ácido biliar e iones carbonato o bicarbonato, usados para ajustar el pH del intestino hasta un pH de 7,5 a 9, para la administración oral de insulina. US 6.200.602 (Watts et ál) divulga una composición de aporte de fármacos de insulina para el aporte colónico de insulina con un promotor de la absorción que incluye una mezcla de ácidos grasos que tienen de 6 a 16 átomos de carbono y sus sales o una mezcla de mono/diglicéridos de ácidos grasos de cadena media junto con un agente

dispersante, en un revestimiento para prevenir la liberación de insulina y el promotor de la absorción hasta que el comprimido, la cápsula o la pella alcance el colon proximal.

Se han realizado intentos de aportar insulina mediante administración oral. Los problemas asociados con la administración oral de insulina para alcanzar euglucemia en pacientes diabéticos están bien documentados en la bibliografía farmacéutica y médica. Las enzimas digestivas del tracto GI degradan rápidamente la insulina, dando como resultado productos de descomposición biológicamente inactivos. En el estómago, por ejemplo, la insulina administrada oralmente sufre proteólisis enzimática y degradación ácida. La supervivencia en el intestino está impedida por una proteólisis excesiva. En la luz, la insulina es detenida por una variedad de enzimas, incluyendo enzimas gástricas y pancreáticas, exo- y endopeptidasas y peptidasas de borde en cepillo. Incluso si la insulina sobrevive a este ataque enzimático, las barreras biológicas que deben atravesarse antes de que la insulina pueda alcanzar sus receptores in vivo pueden limitar la administración oral de insulina. Por ejemplo, la insulina puede poseer baja permeabilidad de membranas, limitando su capacidad para pasar de la luz a la corriente sanguínea.

Polipéptidos farmacéuticamente activos tales como insulina se han conjugado con mezclas polidispersadas de polietilenglicol o mezclas polidispersadas de polímeros que contienen polietilenglicol, para proporcionar mezclas polidispersadas de conjugados de fármaco-oligómero; US 4.179.337 (Davis et ál) divulga conjugar polipéptidos tales como insulina con diversos polietilenglicoles tales como MPEG-1900 y MPEG-5000 suministrados por Union Carbide. US 5.567.422 (Greenwald) divulga la conjugación de nucleófilos biológicamente activos con polietilenglicoles tales como m-PEG-OH (Union Carbide), que tiene un peso molecular medio en número de 5.000 daltons.

La conjugación de polipéptidos tales como insulina con polímeros glicolipídicos modificados con polietilenglicol y polímeros de ácido graso modificados con polietilenglicol se divulgan en US 5.359.030 (Ekwuribe et ál).

US 6.011.008 (Domb et ál.) divulga un método para producir un conjugado con polisacárido soluble en agua de una sustancia sensible a la oxidación que comprende activar el polisacárido hasta un dialdehído mediante oxidación con peryodato; (b) purificar el dialdehído de iones y subproductos interferentes; y (c) acoplar la sustancia al dialdehído purificado mediante formación de una base de Schiff para formar el conjugado. Opcionalmente, el conjugado de la etapa (c) se reduce hasta un conjugado de amina mediante una sustancia reductora. La insulina se conjugó a AG (arabinogalactano) oxidado a través de un enlace amínico o imínico al hacer reaccionar una solución de AG (arabinogalactano) oxidado puro en solución tamponadora de borato a pH 8,9 con insulina a 4°C durante la noche. La solución transparente se dializó a través de una diálisis con celulosa y la solución se liofilizó para dar 115 mg de un sólido blanco.

US 6.022.524 (Maisano et ál): Gd-DTPA se conjugó con insulina porcina en una solución de DTPA y dimetilsulfóxido (DMSO) y se prepara calentando y agitando, a continuación se enfría a temperatura ambiente y se añade una solución de 11,73 g de NHS (0,102 mol) en 300 ml de DMSO, a continuación, gota a gota, una solución de 19,6 g de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (0,097 mol) en 400 ml de DMSO. La mezcla se agita durante 16 horas, a continuación se filtra y el filtrado se concentra mediante evaporación a 50 grados C y 5 Pa hasta un aceite espeso de un volumen de aproximadamente 160 ml.

US 6.309.633 (Ekwuribe et ál.) divulga el uso de insulina sólida para la conjugación de insulina con laurato de PEG₅ en presencia de trietilamina y DMSO a temperatura ambiente. La reacción se verificó a través de HPLC cada 30 min. El conjugado se purificó usando una HPLC preparativa.

US 6.828.297 (Ekwuribe et ál.) divulga métodos para elaborar PEG7-hexil-insulina usando zinc o insulina humana libre de zinc para la conjugación con oligómero activado y la purificación de PEG7-hexil-insulina modificado con B29. Insulina en dimetilsulfóxido y trietilamina se hizo reaccionar con oligómero activado a 22 +/- 4°C. La mezcla de reacción en bruto se dializa o diafiltra para retirar disolventes orgánicos e impurezas de pequeño peso molecular, se intercambia contra tampón de acetato amónico y se liofiliza; lo que se somete además a RP-HPLC equilibrada con tampón de trietilamina al 0,5%/ácido fosfórico al 0,5% (TEAP A). La columna se eluyó con un flujo de gradiente usando un sistema disolvente de TEAP A y TEAP B (acetronitrilo al 80% y TEAP A al 20%). Fracciones que contenían el conjugado se reunieron y el tampón de elución y el disolvente se retiraron mediante diálisis o diafiltración contra tampón de acetato amónico y se liofilizaron para producir polvo blanco de PEG7-hexil-insulina, monoconjugado con B29 (pureza > 97%).

Actualmente, la técnica anterior existente muestra el uso de polvo o cristales de insulina pura como el material de partida para elaborar insulina conjugada, en donde la insulina usada es una forma biológicamente activa.

La presente invención facilita la conjugación de insulina en su forma de éster inactivo con un oligómero, en donde el éster de insulina se desbloquea y se conjuga al oligómero simultáneamente como una reacción en un solo reactor.

La presente invención es más simplificada y económica en la elaboración de un conjugado de insulina en la que se

evitan varias etapas de purificación para obtener insulina pura en forma biológicamente activa. El material de partida es el caldo fermentado que contiene precursor de insulina. El caldo que contiene el precursor de insulina se somete a una etapa de combinación de purificación por intercambio catiónico, cristalización con fenol y $ZnCl_2$, liofilización y transpeptidación para obtener éster de insulina. El éster de insulina se somete a conjugación con un oligómero que tiene la fórmula general $-OC-(CH_2)_n-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ y más preferiblemente un oligómero activado de fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO_8$ (nº CAS 622405-78-1), para obtener insulina conjugada. El conjugado de insulina-oligómero más preferido es insulina- $OC-CH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_3-OCH_3$, denominado también en la presente memoria IN 105. El coste global de la producción de insulina conjugada se minimiza como resultado de este procedimiento.

SUMARIO DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, las ventajas citadas anteriormente se alcanzan con un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1. La presente invención se refiere a un procedimiento para elaborar un conjugado de insulina-oligómero en una reacción en un solo reactor mediante la conjugación de éster de insulina con un oligómero activado, en el que el desbloqueo y la conjugación simultáneos se realizan en tampón de borato. El oligómero activado solubilizado en acetonitrilo se añade a una solución que contiene éster de insulina y el pH de la mezcla se eleva hasta aproximadamente 11.

DESCRIPCION DETALLADA

La presente invención divulga un procedimiento de reacción en un solo reactor para la preparación de conjugados de insulina-oligómero que comprende el desbloqueo y la conjugación simultáneos de un éster de insulina.

El conjugado de insulina-oligómero adicionalmente se purifica y se liofiliza hasta un polvo seco.

El procedimiento para elaborar un conjugado de insulina-oligómero en un solo reactor comprende:

- (i) transpeptidación de un precursor de insulina,
- (ii) desbloqueo del éster de insulina y conjugación con un oligómero simultáneamente en un solo reactor,
- (iii) proporcionar el conjugado de insulina-oligómero.

El procedimiento comprende además:

- (i) purificación del precursor de insulina mediante cromatografía y precipitación,
- (ii) transpeptidación para proporcionar un éster de insulina,
- (iii) purificación del éster de insulina usando RP-HPLC,
- (iv) tratamiento del éster de insulina con un oligómero en tampón de borato, para efectuar el desbloqueo y la conjugación simultáneamente,
- (v) purificación opcional del conjugado,
- (vi) proporcionar el conjugado de insulina-oligómero.

El procedimiento para elaborar un conjugado de insulina-oligómero comprende la adición simultánea de un oligómero solubilizado en acetonitrilo a una solución que contiene éster de insulina en tampón de borato e incrementar el pH de la mezcla.

El procedimiento en el que el pH se incrementa hasta aproximadamente 11.

El procedimiento en el que el precursor de insulina es proinsulina o miniproinsulina.

El procedimiento en el que el oligómero es un alquil-PEG o un derivado del mismo.

El procedimiento en el que el oligómero se activa antes de la conjugación.

El procedimiento en el que el oligómero activado usado para la conjugación es $C_{14}H_{23}NO_8$.

El procedimiento en el que el alquil-PEG tiene la fórmula general $-\text{OC}-(\text{CH}_2)_n-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{OCH}_3$.

El procedimiento en el que el conjugado de insulina-oligómero es conjugado de insulina B29 N ϵ -oligómero.

El procedimiento en el que el conjugado de insulina-alquil-PEG es conjugado de insulina B29 N ϵ -alquil-PEG.

El procedimiento en el que el conjugado es insulina- $\text{OC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{OCH}_3$.

5 Fermentación de levadura recombinante que contiene el gen de insulina.

Se prepara inóculo de levadura recombinante que contiene el gen de insulina al añadir 100 microlitros de cultivo de reserva de glicerol a 50 ml de medio de glicerol mínimo (MGY) en matraces agitados de 250 ml. El medio MGY contiene base nitrogenada de levadura (YNB), glicerol, tampón de fosfato y D-biotina. Los matraces sembrados se incubaron a 30 grados C, 240+/-10 hasta que se alcanza 15+/-5 OD (densidad óptica a 600 nm).

- 10 El medio de fermentación contiene ácido ortofosfórico, sulfato cálcico dihidratado, sulfato potásico, sulfato magnésico heptahidratado, hidróxido potásico, glicerol, sales traza y D-biotina. El fermentador se prepara al añadir todos los componentes anteriores excepto las sales traza y la D-biotina y se trata en autoclave a 121 - 124°C durante una hora. La solución de sales traza se prepara al esterilizar por filtración una solución de sulfato cúprico pentahidratado, yoduro sódico, sulfato magnésico monohidratado, molibdato sódico dihidratado, ácido bórico, cloruro de cobalto hexahidratado, cloruro de zinc, sulfato ferroso heptahidratado. La solución de biotina también se esteriliza por filtración. El fermentador se inocula y se pone en marcha a una temperatura de 30°C, pH 5,5, flujo de aire 0,5 lpm y DO 30. Después de la fase discontinua, la alimentación de glicerol (50% p/p con agua) se inicia para aumentar la biomasa. Se prepara glicerol al 50% p/p y se trata en autoclave durante 30 min a 121-124 grados C y a continuación las soluciones de sales traza y biotina se añaden a la velocidad de 12 ml/l. La velocidad de alimentación de glicerol se incrementa gradualmente hasta 20+/- 5 g/h. Una vez se alcanza la biomasa de 300 - 400 g/l, la temperatura se reduce hasta 20 - 25°C, el pH se cambia a 3,5 - 6,5 y se inicia la alimentación de metanol. El metanol se esteriliza por filtración y las soluciones de sales traza y biotina se añaden a la velocidad de 12 g/l. La alimentación de metanol se incrementa basándose en el consumo de hasta 25 +/-5 g/h. Durante la alimentación de metanol se añade alimentación de extracto de levadura y peptona a la velocidad de 0,2 - 0,5 g/h. La fermentación se continúa hasta 12 días.

Purificación de proinsulina de caldo

- 30 900 mg de caldo que contiene precursor de insulina se ajustaron hasta pH 4,0 mediante ácido acético y se hizo pasar a través de las resinas de intercambio catiónico, preequilibradas con ácido acético 50 mM. La columna se lavó con ácido acético 50 mM y se eluyó con ácido acético 50 mM con NaCl 1 M. Se obtenían 855 mg de producto que se diluyeron 1:3 con agua y la concentración se llevó hasta 6 mg/ml. Se añadió fenol (1,25 mg/l) y ZnCl₂ al 5% (v/v) de una reserva al 5% (p/v) se añadió a la solución. El pH de la solución se ajustó hasta 5,2 con NaOH 1 N. La solución se mantuvo durante la noche a 4°C. La suspensión de sólidos se centrifugó y la pella formada se liofilizó hasta sequedad. La recuperación en la etapa era 90%.

Transpeptidación y esterificación de la proinsulina

- 35 400 mg de polvo de precursor seco se solubilizaron en 30 ml de DMF que contenían 30-70% de N,N-dimetilformamida. Se añadieron a la solución 724 mg de éster butílico de treonina, el pH de la solución se ajustó hasta 6,5 con ácido acético 3 N. La reacción se inició con la adición de 55 mg de tripsina. La reacción se verificó cada hora y se detuvo con 5 ml de ácido acético 3 N después de 4 h, cuando la conversión de precursor de insulina en insulina era 74%. El rendimiento de esta etapa era 68% en términos de conversión en producto.
- 40 El producto obtenido se precipitó como anteriormente, a pH 6,0, y se recuperaron 228 mg de éster de insulina. La pella cristalina de éster de insulina se solubilizó en ácido acético 250 mM. El material filtrado se hizo pasar a través de una matriz C8 Kromasil y se recuperó del gradiente de acetonitrilo el éster de insulina puro al 95%. Al final de la RPHPLC, se recuperaron 149 mg de producto.
- 45 El éster de insulina así obtenido se usa para la preparación del conjugado de insulina que se divulga en los siguiente ejemplos; que no deben considerarse limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

5 ml de la fracción de elución reunida de RP se toman como material de partida y 1,2 ml de tampón de borato 1 M se

añaden a la mezcla de reacción; el pH de la mezcla de reacción se elevó hasta 11 y la mezcla de reacción se agitó durante 3 h a 24°C. El desbloqueo se verificó y, cuando era completo, 0,5 mg del oligómero activado ($C_{14}H_{23}NO_8$) solubilizado en 300 μ l de acetonitrilo se añadieron a la mezcla de reacción en el mismo reactor. La reacción se detuvo llevando el pH de la reacción hasta 7,5. El rendimiento es 44%, con una pureza cromatográfica de 28%. La mayoría del producto quedaba sin convertir.

Ejemplo 2

5 ml de la fracción de elución reunida de RP se toman como material de partida y 1,2 ml de tampón de borato 1 M se añaden a la mezcla de reacción; el pH de la mezcla de reacción se elevó hasta 11 y la mezcla de reacción se agitó durante 3 h a 24°C. El desbloqueo se verificó y, cuando era completo, 2,5 mg del oligómero activado ($C_{14}H_{23}NO_8$) solubilizado en 300 μ l de acetonitrilo se añadieron a la mezcla de reacción en el mismo reactor. La reacción se detuvo llevando el pH de la reacción hasta 7,5. El rendimiento es 63%, con una pureza cromatográfica de 56%.

Ejemplo 3

5 ml de la fracción de elución reunida de RP se toman como material de partida y 1,2 ml de tampón de borato 1 M se añaden a la mezcla de reacción; el pH de la mezcla de reacción se elevó hasta 11 y la mezcla de reacción se agitó durante 3 h a 24°C. El desbloqueo se verificó y, cuando era completo, 10 mg del oligómero activado ($C_{14}H_{23}NO_8$) solubilizado en 300 μ l de acetonitrilo se añadieron a la mezcla de reacción en el mismo reactor. La muestra se analizó de todos los grupos a los 10 min y 1 h. El rendimiento es 18% con una pureza cromatográfica del producto de 11%. Se observaba principalmente el producto diconjugado.

Ejemplo 4

5 ml de la fracción de elución reunida de RP se toman como material de partida y 1,2 ml de tampón de borato 1 M se añaden a la mezcla de reacción; el pH se ajusta hasta 10,5 y se mantiene durante 5 h. 2,5 mg del oligómero activado ($C_{14}H_{23}NO_8$) disuelto en 300 μ l de acetonitrilo se añadieron una vez que el desbloqueo era completo en el mismo reactor de la mezcla de reacción. Una parte alícuota se tomó y se analizó. El rendimiento era 58% con una pureza cromatográfica de 51%.

Ejemplo 5

5 ml de la fracción de elución reunida de RP se toman como material de partida y 1,2 ml de tampón de borato 1 M se añaden a la mezcla de reacción; el pH se ajusta hasta 10,75 y se mantiene durante 4 h. 2,5 mg del oligómero activado ($C_{14}H_{23}NO_8$) disuelto en 300 μ l de acetonitrilo se añadieron una vez que el desbloqueo se completara en el mismo reactor de la mezcla de reacción. Una parte alícuota se tomó y se analizó. El rendimiento era 61% con una pureza cromatográfica de 53%.

Ejemplo 6 (Desbloqueo y conjugación simultáneos)

5 ml de la fracción de elución reunida de RP se toman como material de partida y 1,2 ml de tampón de borato 1 M se añaden a la mezcla de reacción; el pH se ajusta hasta 11 y se añaden 4 mg del oligómero activado ($C_{14}H_{23}NO_8$) disuelto en 300 μ l de acetonitrilo. La muestra se analizó a los 10 min., 1 h, 2 h, 3 h después de que tuviera lugar en el mismo reactor el desbloqueo simultáneo con conjugación. El rendimiento era 64% con una pureza cromatográfica de 58%.

Ejemplo 7 (Desbloqueo y conjugación simultáneos)

5 ml de la fracción de elución reunida de RP se toman como material de partida y 1,2 ml de tampón de borato 1 M se añaden a la mezcla de reacción; el pH se ajusta hasta 11 y se añaden 2,5 mg del oligómero activado ($C_{14}H_{23}NO_8$) disuelto en 300 μ l de acetonitrilo. La muestra se analizó a los 10 min., 1 h, 2 h, 3 h después de que tuviera lugar en el mismo reactor de la mezcla de reacción el desbloqueo simultáneo con conjugación. El rendimiento después de 3 h era 75% con una pureza del producto de 73,4%. El desbloqueo continuó durante 1 h, 2 h y 3 h y la conjugación se inició en cada punto temporal y se dejó continuar hasta que terminaba tanto el desbloqueo como la conjugación para cada caso. Se toman 5 ml de cada fracción de elución reunida de RP en cada uno de 4 tubos. 1,2 ml de tampón de borato 1 M se añadieron a la mezcla de reacción, el pH se ajustó hasta 11. Al 1º tubo se añadieron 2,5 mg de oligómero ($C_{14}H_{23}NO_8$) a las 0 h. Se dejó que el desbloqueo continuara durante 1 h en el 2º tubo y la misma cantidad de oligómero activado ($C_{14}H_{23}NO_8$) se añadió a la mezcla de reacción. Se dejó que el desbloqueo continuara durante 2 h en el 3º tubo y 2,5 mg de oligómero activado ($C_{14}H_{23}NO_8$) se añadieron después de 2 h. En el 4º tubo, el desbloqueo se continuó durante 3 h antes de que se añadiera la misma cantidad de oligómero activado ($C_{14}H_{23}NO_8$). Se dejó que la conjugación continuara para cada tubo hasta que parece ser completa según se confirma por el cromatograma analítico. El rendimiento de la etapa así como el porcentaje de pureza del conjugado de insulina se verificaron mediante cromatogramas analíticos.

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

Ejemplo 8

5 150 ml de fracción de elución reunida de RPHPLC en 36 ml de tampón de borato se tomaron a pH 8,7. El pH se elevó hasta 11 al añadir 10 ml de NaOH 10 N y la mezcla de reacción se mantuvo a 25°C durante 3 h. 135 mg de oligómero activado (C₁₄H₂₃NO₈) solubilizado en 9 ml de acetonitrilo se añadieron a la mezcla de reacción para iniciar la reacción de conjugación en el mismo reactor. Después de 1 h, la reacción de conjugación se detuvo al llevar el pH de la mezcla de reacción hasta 7,5 al añadir ácido acético glacial. Se encontró que el rendimiento del desbloqueo y la conjugación era 61% en esta reacción y la pureza del producto era 62%.

10 Ejemplo 9

15 Se toman 975 ml de la fracción de elución de RP que tenía una concentración de 8,4 mg/ml y se añaden 234 ml de tampón de borato 1 M a pH 8,2. El pH se ajusta hasta 11 con NaOH 10 N. 975 mg de oligómero activado (C₁₄H₂₃NO₈) disueltos en 58,5 ml de acetonitrilo se añadieron a la mezcla de reacción y los procesos de desbloqueo así como conjugación se iniciaron conjuntamente en el mismo reactor. Se tomó una parte alícuota a las 2 y 3 h, se analizó en la HPLC para verificar el perfil de la reacción. La conjugación se detuvo después de 3 h al llevar el pH de la mezcla de reacción hasta 7,5 mediante la adición de ácido acético glacial. Se encontró que el rendimiento era de 68% con una pureza del producto de 69%.

Ejemplo 10 (Recuperación del Producto)

20 El producto conjugado final se diluye con ácido acético 250 mM para dar la concentración de 2,5 mg/ml. El material se carga en una columna de RP HPLC Kromasil C8 y se eluye con gradiente de acetonitrilo. La fracción eluida reunida tiene el IN 105 con una pureza de 96,7% y con la recuperación en la etapa de 72%.

El IN 105 purificado, eluido de la columna de RPHPLC, se cristaliza con fenol y ZnCl₂ a pH 5,2 en una condición fría. La pella cristalizada final se recogía mediante centrifugación. La pella cristalina recogida se liofilizó y se recogió como cristales purificados de IN 105 seco.

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para elaborar un conjugado de insulina-oligómero en una reacción en un solo reactor que comprende las etapas de
- 5 a) transeptidación de un precursor de insulina para producir un éster de insulina,
- b) mezclar dicho éster de insulina en tampón de borato con un oligómero solubilizado en acetonitrilo, para alcanzar simultáneamente el desbloqueo de dicho éster de insulina y la conjugación de disco éster de insulina a dicho oligómero en un solo reactor,
- c) obtener un conjugado de insulina-oligómero.
- 10 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además purificar dicho precursor de insulina mediante cromatografía y precipitación, antes de someter a dicho precursor a transeptidación.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se incrementa el pH de la mezcla.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pH se incrementa hasta aproximadamente 11.
- 15 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el precursor de insulina es proinsulina o miniproinsulina.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligómero es un alquil-PEG o un derivado del mismo.
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el alquil-PEG tiene la fórmula general $-\text{OC}-(\text{CH}_2)_n-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{OCH}_3$.
- 20 8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligómero se activa antes de la conjugación.
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el oligómero activado usado para la conjugación es $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_8$.
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el conjugado de insulina-oligómero es conjugado de insulina B29 N ϵ -oligómero.
- 25 11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que the conjugado de insulina-alkil-PEG es conjugado de insulina B29 N ϵ -alkil-PEG.
12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el conjugado es insulina B29 N ϵ -OC-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃.