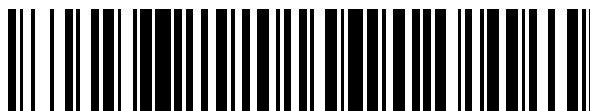


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 491**

51 Int. Cl.:

A61K 38/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2009** **E 09155775 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013** **EP 2133091**

54 Título: **Composiciones que comprenden montajes supramoleculares de insulina útiles para el tratamiento de la diabetes**

30 Prioridad:

07.04.2008 IN DE09142008

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

15.10.2013

73 Titular/es:

NATIONAL INSTITUTE OF IMMUNOLOGY (50.0%)

Aruna Asaf Ali Marg

New Delhi 110067, IN y

INDIAN INSTITUTE OF SCIENCE (50.0%)

72 Inventor/es:

SURIOLA, AVADHESHA;

GUPTA, SARIKA;

SINGH, MAHENDRA PAL y

CHATTOPADHYAY, TANDRIKA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 425 491 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

Composiciones que comprenden montajes supramoleculares de insulina útiles para el tratamiento de la diabetes.

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente india nº 914/DEL/2008 presentada el 7 de abril de 2008.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a proteínas terapéuticas para el tratamiento de la diabetes y otras enfermedades crónicas.

Antecedentes de la invención

- 10 Los medicamentos de proteínas son la clase de fármacos que se expanden más rápidamente, que sirven a los pacientes con diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, renales, gastrointestinales, reumatológicas y neurológicas, entre muchas otras. El valor terapéutico y comercial de las proteínas como fármacos, incluyendo la insulina, eritropoyetina, G-CSF, activador del plasminógeno, y los interferones es indiscutible. Las proteínas mejoradas o sus formulaciones han mejorado la eficacia terapéutica de estos productos precursores, aumentando su potencia, el tiempo de acción, y otras propiedades.

- 15 La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por la incapacidad del cuerpo para producir insulina (Tipo I) o por la falta de respuesta a ella (Tipo II) (<http://www.who.int/diabetes/en>, King, H., Aubert. R.E. & Herman, W.H., Global burden of diabetes, 1995-2025: Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21, 1414-1431 (1998)). Hay una epidemia global emergente de diabetes tanto de las formas de tipo I como de tipo II. Casi 1,1 millones de diabéticos perecieron en 2005 (Dunstan, D. W., Zimmet, P. Z., Welborn, T. A., De Courten, M. P., Cameron, A. J., et al. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance: The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care* 25, 829-834 (2002)). Sus consecuencias económicas son aún más asombrosas ya que la gente puede vivir durante años con diabetes, su causa de muerte a menudo se registra como cardiopatías e insuficiencias renales, presentándose ambas como una consecuencia secundaria de la diabetes. El restablecimiento del medio metabólico normal mediante la administración de insulina desde el exterior y minimizando de este modo el riesgo de complicaciones secundarias se ha convertido en una característica esencial de tratamiento de la diabetes. La terapia actual implica múltiples inyecciones subcutáneas (SC)/intramusculares (IM) de la insulina diariamente, lo que conduce a una pesada carga de observancia médica de los pacientes. Esto a su vez ha dado lugar a las rutas alternativas, menos invasivas de administración. Los intentos para aprovechar las vías nasal, oral, gastrointestinal y transdérmica, hasta la fecha han sido en su mayoría sin éxito. Aunque un régimen de insulina convencional para la diabetes de tipo I con dos inyecciones diarias de insulina es eficaz en el control de la glucemia posprandial, este tratamiento tiene un valor limitado debido a su insuficiencia para controlar la hiperglucemia en ayunas. Los pacientes con diabetes mellitus necesitan terapia de insulina para reforzar el suministro intrínseco de insulina una vez o dos veces al día. Además, homeostasis posprandial de la glucosa se mantiene mediante inyecciones regulares de insulina antes de cada comida. La terapia intensiva con insulina retrasa el inicio y o ralentiza el avance de las complicaciones secundarias, sin embargo los pacientes permanecen en un alto riesgo de hipoglucemia en ayunas. Una formulación de insulina que libera insulina de manera controlada durante largos períodos de tiempo liberaría a los pacientes de la necesidad de administrar múltiples dosis de insulina a diario. La presente invención proporciona una composición para una liberación prolongada de insulina para tratar la diabetes, tanto de tipo I como II.

Sumario de la invención

- 40 La presente invención da a conocer proteínas terapéuticas para el tratamiento de la diabetes y otras enfermedades crónicas. La presente invención da a conocer particularmente el montaje supramolecular de insulina, en el que el montaje supramolecular de insulina comprende la forma oligomérica insoluble y agregada de insulina y/o exendina-4. La presente invención también da a conocer el montaje supramolecular de exendina-4 (por sus siglas en inglés, SEA).
- 45 Un aspecto de la presente invención se refiere a un montaje supramolecular de insulina (SIA) para su utilización en el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones, comprendiendo dicho montaje una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA I, SIA II, SIA III o combinación de las mismas, en la que SIA I consiste en grupos alargados con disposición parecida a una perla del monómero de insulina, SIA II consiste en una asociación lineal de grupos alargados con disposición parecida a una perla de los monómeros de insulina y SIA III consiste en aproximadamente el 90% de SIA-II y una asociación densa, lineal de oligómeros de insulina.
- 50

- Otro aspecto de la presente invención proporciona un montaje supramolecular de insulina (SIA) útil como fármaco proteico para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones, en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA I, en la que SIA I consiste en grupos alargados con una disposición parecida a una perla de monómeros de insulina.
- 55

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a un montaje supramolecular de insulina (SIA) útil como fármaco proteico para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones, en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA I, en la que SIA I consiste en grupos alargados con una disposición parecida a una perla de monómeros de insulina.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a un montaje supramolecular de insulina (SIA) útil como fármaco proteico para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones, en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA III, en la que SIA III consiste en una asociación densa, lineal de oligómeros de insulina.

Un aspecto más de la presente descripción se refiere a un montaje supramolecular de extendina-4 (SEA) útil como fármaco proteico para el tratamiento de la diabetes, en el que dicho montaje comprende la forma oligomérica insoluble y agregada de extendina-4.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones, comprendiendo la composición una cantidad terapéuticamente eficaz del montaje supramolecular de insulina (SIA) dado a conocer en la presente invención.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones, comprendiendo la composición una cantidad terapéuticamente eficaz del montaje supramolecular de insulina-II (SIA-II) dado a conocer en el presente invención.

Todavía otro aspecto de la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones, comprendiendo la composición una cantidad terapéuticamente eficaz del montaje supramolecular de insulina (SIA) y del montaje supramolecular de extendina-4 (SEA) dado a conocer en la presente memoria.

Aún otro aspecto de la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones, comprendiendo la composición una cantidad terapéuticamente eficaz del montaje supramolecular de extendina-4 (SEA) dado a conocer en la presente memoria.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación del montaje supramolecular de insulina (SIA) dado a conocer en la presente invención, comprendiendo el proceso: la disolución de insulina a una temperatura de alrededor de 25 a 60°C en una solución que tiene un pH comprendido en el intervalo de 1,5 a 7,8, y la incubación de la anterior durante un periodo de 6 a 48 horas con agitación constante para obtener el montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que SIA comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina.

Aún otro aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento de preparación del montaje supramolecular de extendina-4 dado a conocer en la presente memoria, en el que el procedimiento comprende disolver la extendina-4 a una temperatura de aproximadamente 25°C a 60°C en una solución que tiene un pH comprendido en el intervalo de aproximadamente 2,0 a 7,6; e incubar la anterior durante un periodo de 6a 192 horas con agitación constante para obtener montaje supramolecular de extendina-4 (SEA), en el que SEA comprende forma oligomérica insoluble y agregada de extendina-4.

Otro aspecto de, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones, en el que el procedimiento comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende el montaje supramolecular de insulina dado a conocer en la presente invención, que es eficaz para el alivio del trastorno.

Aún otro aspecto de, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones, en el que el procedimiento comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende el montaje supramolecular de insulina-II (SIA-II) dado a conocer en la presente invención, que es eficaz para el alivio del trastorno.

Todavía otro aspecto de, la presente descripción se refiere a un procedimiento para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones, en el que el procedimiento comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende el montaje supramolecular de extendina-4 dado a conocer en la presente memoria, que es eficaz para el alivio de dicho trastorno.

Todavía otro aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento para el tratamiento de trastornos

metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones, en el que el procedimiento comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende el montaje supramolecular de insulina y el montaje supramolecular de exendina-4 dado a conocer en la presente memoria, que es eficaz para el alivio de dicho trastorno.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización del montaje supramolecular de insulina dado a conocer en la presente invención para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones.

Todavía sin embargo otro aspecto de la presente descripción se refiere a la utilización del montaje supramolecular de exendina-4 dado a conocer en la presente memoria para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones.

Todavía sin embargo otro aspecto de la presente descripción se refiere a la utilización del montaje supramolecular de insulina en combinación con el montaje supramolecular de exendina-4 dado a conocer en la presente memoria para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo formado por diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2 y sus complicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la cinética de la formación de fibrillas a pH 2,0 y 7,0 controlados con fluorescencia Th-T 50 μ M de insulina humana recombinante (rH) y bovina.

La figura 2

(a) Muestra la liberación *in vitro* de la insulina de la insulina del montaje supramolecular II (también denominado intermedio preamiloide de insulina II) de insulina bovina y rH controlada por absorbancia a 280 nm y la fluorescencia intrínseca de tirosina. También se proporciona la intensidad de Th-T de la solución dentro de la membrana de diálisis a las 0 h y a los 15 días.

(b) muestra la cinética de liberación del monómero *in vitro* de los diversos productos intermedios del montaje supramolecular de insulina de insulina bovina.

(c) muestra la cinética de liberación *in vitro* de monómero de los diversos productos intermedios del montaje supramolecular de insulina de insulina rH.

(d) muestra la cinética de liberación *in vitro* de SIA II (alternativamente preamiloide) formada a pH 7,0 controlado en 1 ml de solución de PBS constante.

La figura 3 muestra los estudios de fijación con rojo Congo con insulina natural, montaje supramolecular II de insulina (alternativamente insulina II preamiloide), montaje supramolecular III de insulina (alternativamente insulina III preamiloide) y la insulina amiloide (bovina y humana).

La figura 4 muestra la caracterización espectroscópica infrarroja de la transformada de Fourier (FTIR) de la insulina r-humana y bovina.

La figura 5 muestra morfologías de montaje supramolecular de insulina (alternativamente insulina preamiloide) de productos intermedios y fibrillas de insulina estudiadas por Microscopia de Fuerza Atómica (MFA):

(a) monómero de insulina

(b) producto intermedio del montaje supramolecular I de insulina (alternativamente insulina I preamiloide), pH 7,0 de insulina bovina,

(c) montaje supramolecular II de insulina (alternativamente insulina II preamiloide), pH 7,0 de insulina bovina,

(d) producto intermedio del montaje supramolecular III de insulina (alternativamente insulina III preamiloide), pH 7,0 de insulina bovina,

(e) montaje supramolecular de insulina-I, pH 7,0 de insulina rH,

(f) montaje supramolecular de insulina-II, pH 7,0 de insulina rH,

(g) montaje supramolecular de insulina-III, pH 7,0 de insulina rH,

(h) fibrillas completamente formadas a pH 7,0,

(i) muestra del producto intermedio del montaje supramolecular de insulina (alternativamente insulina

preamiloide) formado en 6 horas, pH 2,0 a 37°C,

(j) fibrilla amiloide formada a pH 2,0.

La figura 6 muestra microfotografías de MET de la tinción negativa de fibrillas de insulina y de los productos intermedios durante la formación del montaje supramolecular de insulina.

- 5 (i) montaje supramolecular I de insulina (alternativamente insulina preamiloide I), pH 7,0,
(ii) montaje supramolecular II de insulina (alternativamente insulina preamiloide II), pH 7,0,
(iii) montaje supramolecular III de insulina (alternativamente insulina preamiloide III), pH 7,0,
(iv) fibras maduras a pH 7,0,
(v) fibra formada a pH 2,0, 37°C.

10 La figura 7 muestra la eficacia *in vivo* del montaje supramolecular de insulina (alternativamente insulina preamiloide) en la homeostasis de la glucosa.

(a) Concentración de glucosa en sangre en respuesta a varias dosis de montaje supramolecular de insulina-II (bovina), administrado tanto por vía subcutánea como intramuscular.

15 (b) Concentración de glucosa en sangre en respuesta a varias dosis de montaje supramolecular de insulina-II (r-humana), administrado tanto por vía subcutánea como intramuscular.

La figura 8 muestra glucemias posprandiales controladas durante un periodo de 135 días después de la administración de SIA-II bovina

(a) Insulina bovina

(b) Insulina rH.

20 La figura 9 muestra glucemias posprandiales controladas durante un periodo de 160 días después de la administración de SIA-II humana

(a) Insulina bovina

(b) Insulina rH.

25 La figura 10 muestra la glucemia controlada después de la administración de insulina amiloide formada a pH 2,0 y 7,0.

La figura 11 muestra el perfil del peso corporal de ratas diabéticas tratadas con SIA-II, ratas con control diabético y con control no diabético.

La figura 12 muestra el perfil de glucosa en sangre durante la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (por sus siglas en inglés, IPGTT).

30 La figura 13 muestra

(a) el análisis cuantitativo de insulina rH y bovina sérica liberada de la correspondiente SIA-II utilizando ELISA de estado sólido en las ratas tratadas con STZ en respuesta al montaje supramolecular de insulina (alternativamente insulina preamiloide) inyectada por vía SC o IM.

(b) el análisis cuantitativo de la insulina bovina sérica durante el experimento IPGTT.

35 (c) ELISA de insulina sérica de rata realizado para IPGTT para determinar la concentración endógena de insulina en respuesta a glucosa infundida.

La figura 14 muestra el tratamiento de ratas diabéticas STZ insulina bovina SIA II marcada con ¹²⁵I

(a) Perfil de CPM/ml en el suero de los animales tratados con 100 µg de montaje supramolecular de insulina marcado hasta 25 días. El perfil de 24 h se da en el recuadro.

40 (b) Perfil *in vivo* de glucosa en sangre (mg/dl) e insulina bovina (ng/ml) liberadas durante 36 días. El perfil de 24 h se muestra en el recuadro.

La figura 15 muestra Tricina-SDS-PAGE de suero de animales tratados con tinción Coomassie de SIA II marcada (izquierda) e imágenes de fósforo (resto después del sobrante) de suero de 1 a 28 días después del tratamiento por vía subcutánea (panel superior) o intramuscular (panel central). El panel inferior muestra monómeros

liberados *in vitro* de SIA II.

La figura 16 muestra los estudios de pinzamiento hiperglucémico después del tratamiento con el montaje supramolecular II de insulina, ritmo de infusión de GIR-glucosa (mg/kg/min).

- 5 La figura 17 muestra análisis de inmunotransferencia Western (WB) análisis de los adipocitos cultivados para la cascada de señalización de insulina. Los adipocitos tratados con (a) PBS, insulina, SIA-II, insulina liberada de SIA-II, (b) suero tal como se indica, y analizados para la señalización de insulina.

La figura 18 muestra ratas Wistar macho que se volvieron diabéticas con STZ y tratadas por vía subcutánea con montaje supramolecular II de insulina (alternativamente insulina preamiloide II) y comprobada la presencia de montaje supramolecular de insulina residual utilizando rojo Congo y la aparición de la inflamación, respectivamente.

- 10 (a) secciones (i-v) teñidas con rojo Congo subcutáneo, birrefringencia de rojo Congo (vi-x), secciones teñidas con H & E (xi-xv) y sección inmunoteñida (xvi-xx) desde la 1ª semana hasta la 12ª semana.

(b) Secciones intramusculares teñidas con rojo Congo (i-v), birrefringencia de rojo Congo (vi-x), secciones teñidas con H & E (xi-xv) y sección inmunoteñida (xvi-xx) desde la 1ª semana 1 hasta la 12ª semana.

La figura 19 muestra

- 15 (a) LPS de *E. coli* se inyectó a a los tejidos subcutáneos y musculares como referencia positiva para la infiltración de células inflamatorias. Secciones SC (i) y e IM (ii) inmunoteñidas, y secciones SC (iii) e IM (iv) teñidas con H & E.

(b) Fibras amiloides de insulina formadas a pH 2,0 inyectadas por vía SC se controlaron durante la 1ª, 4ª, 8ª y 12ª semanas utilizando secciones teñidas con rojo Congo (i-iv) y birrefringencia de rojo Congo (v-viii).

- 20 La figura 20 muestra el perfil de glucosa en sangre del tratamiento con SIA-II de insulina rH de ratas que se volvieron diabéticas con Aloxano.

(a) Ayuno

(b) Sangre sin ayuno

(c) Cuantificación de la insulina humana en el suero mediante ELISA de estado sólido según el protocolo del fabricante.

- 25 La figura 21 muestra el seguimiento de la formación de cataratas en

(a) ratas tratadas con STZ.

(b) Rata de referencia.

(c)-(d) Ratas tratadas con insulina.

(e) Ratas tratadas con el montaje supramolecular de insulina.

- 30 La figura 22 muestra el tejido cardíaco, del riñón y hepático seccionados y examinada la deposición de amiloides mediante la tinción con CR. La morfología celular también se evaluó utilizando tinción H & E, birrefringencia rojo Congo de corazón, riñón e hígado (i-iii), secciones teñidas con rojo Congo (iv-vi), tinción H & E de corazón, riñón e hígado (vii-ix).

- 35 La figura 23 muestra la detección de la enzima degradante de insulina de rata (EDI) después del tratamiento con SIA-II.

La figura 24 muestra la detección de anticuerpo anti-insulina sérica de rata tratado con SIA-II.

- 40 La figura 25 muestra ensayo de MTT para la proliferación celular: las células MCF-7 se ensayaron para determinar su cinética de crecimiento mediante la administración de PBS, pH 7,4, insulina humana/bovina (20 nM), SIA II (insulina humana/bovina), monómeros liberados de insulina procedente de SIA II (20 nM), factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-1) (6 ng/ml).

La figura 26 muestra la glucemia a varias dosis de montaje supramolecular de insulina administrada tanto por vía subcutánea como intramuscular en ratones que se han vuelto diabéticos utilizando STZ. SIA-II humana inyectada(a) por vía subcutánea, (b) por vía intramuscular y (c) SIA-II bovina por vía subcutánea a la dosis indicada.

- 45 La figura 27 muestra la concentración de glucosa en la sangre en respuesta al montaje supramolecular de insulina administrada por vía subcutánea en conejo que se ha vuelto diabético utilizando STZ.

La figura 28 muestra el perfil de la glucemia de ratas diabéticas de tipo II dadas diversas tratamiento como se indica

en la figura, durante un período de 35 días.

La figura 29 muestra el seguimiento de la insulina frente a la respuesta reguladora utilizando estudios de pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico / hipoglucémico

(a) Concentración de glucosa en sangre

5 (b) Concentración de glucagón

(c) Concentración de epinefrina.

La figura 30 muestra gel teñido con Coomassie al 20% mostrando el modelo de escisión de (i) insulina rH, (ii) SIA-I, (iii) SIA-II y (iv) SIA-III con diferentes diluciones de 2 mg/ml de tripsina y proteinasa K.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención proporciona fármaco proteicos para el tratamiento de la diabetes y otras enfermedades/trastornos crónicos. La presente invención proporciona particularmente montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que el SIA comprende la forma oligomérica insoluble y agregada de insulina. La presente descripción también proporciona el montaje supramolecular de exendina-4 (SEA), en el que el SEA una forma
15 oligomérica insoluble y agregada de exendina-4. La presente descripción también proporciona las composiciones farmacéuticas que comprenden el montaje supramolecular de insulina.

La presente invención también proporciona la posibilidad de tratamiento de la diabetes de tipo II.

La expresión "montaje supramolecular de insulina" o "SIA" utilizado en la presente memoria se refiere a la forma oligomérica insoluble y agregada de insulina.

20 La expresión "montaje supramolecular de insulina" o "SIA" utilizado en la presente memoria se refiere a la forma oligomérica insoluble y agregada de insulina, en la que la forma oligomérica de orden superior de SIA-II y III, impide que las proteasas las escindan. La resistencia de SIA-I y SIA-II a la escisión por tripsina y proteinasa K demuestra además la diferencia en la organización estructural de estos oligómeros. La insulina rH y SIA-I son más sensibles a la escisión por las proteasas en comparación con SIA-II y SIA-III, que adoptan una forma oligomérica de orden superior resistente a la acción de las proteasas.

25 La expresión "montaje supramolecular de insulina" o "SIA" utilizado en la presente memoria se refiere al montaje supramolecular I, II y III de insulina, que son la forma oligomérica insoluble y agregada de insulina.

El término "SIA I" utilizado en la presente memoria se refiere al "montaje supramolecular de insulina" en la etapa I, en la que "SIA que" comprende la forma oligomérica insoluble y agregada de la insulina, en el que los oligómeros consiste en grupos alargados que tienen configuración de tipo perla de monómero de insulina.

30 El término "SIA II" utilizado en la presente memoria se refiere a "montaje supramolecular de insulina" en la etapa II, en el que "SIA II" comprende la forma oligomérica insoluble y agregada de la insulina, en el que los oligómeros de la insulina están dispuestos en forma de una asociación lineal de las grupos alargados mencionadas anteriormente, que tienen una única entidad con una organización estructural supraoligomérica.

35 El término "SIA III" utilizado en la presente memoria, se refiere al "montaje supramolecular de insulina" en la fase III, en el que "SIA III" consiste en una densa asociación lineal de forma oligomérica de la insulina.

SIA en la fase III es decir, SIA III consisten en aproximadamente el 90% de SIA-II.

40 Según la presente invención, una realización proporciona un montaje supramolecular de insulina (SIA) para su utilización en el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1 y 2 y sus complicaciones, comprendiendo dicho montaje una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA I, SIA II, SIA III o combinaciones de los mismos, en el que SIA I consiste en grupos alargados que tienen una configuración similar a una perla de monómero de insulina, SIA II consiste en una asociación lineal de grupos alargados que tienen una configuración similar a una perla de monómeros de insulina y SIA III consiste en aproximadamente 90% de SIA-II, y es una densa asociación, lineal de oligómeros de insulina.

45 En otra realización de la presente invención, se proporciona un montaje supramolecular de insulina (SIA) útil como medicamento de proteínas para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1 y 2 y sus complicaciones, en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA I, en el que SIA I consiste en grupos alargados que tienen una configuración similar a una perla de monómeros de insulina.

50 Todavía en otra realización de la presente invención, se proporciona un montaje supramolecular de insulina (SIA) útil como medicamento de proteínas para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1 y 2 y sus complicaciones, en el que el montaje comprende una forma oligomérica

insoluble y agregada de insulina como SIA II, en el que SIA II consiste en una asociación lineal de grupos alargados que tienen una configuración similar a una perla de monómeros de insulina.

5 Todavía no obstante en otra realización de la presente invención, se proporciona un montaje supramolecular de insulina (SIA) útil como medicamento de proteínas para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1 y 2 y sus complicaciones, en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA III, en el que SIA III consiste en una asociación lineal de oligómeros de insulina.

Una realización proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que la insulina es insulina humana, bovina o porcina o mutantes/análogos de insulina.

10 Una realización de la presente invención proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina a un ritmo que va desde aproximadamente 0,2 a 0,6 UI por hora *in vitro*.

15 Una realización de la presente invención proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA I, SIA II, SIA III o combinaciones de los mismos, en el que SIA I consiste en grupos alargados que tienen una configuración similar a una perla de monómeros de insulina, SIA II consiste en una asociación lineal de grupos alargados que tienen una configuración similar a una perla de monómeros de insulina y SIA III consiste en aproximadamente 90% de SIA-II, y es una densa asociación, lineal de oligómeros de insulina, en el que el montaje libera insulina a un ritmo que va desde aproximadamente 0,2 a 0,6 UI por hora *in vitro*.

20 Una realización de la presente invención proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina, en el que el montaje libera insulina a un ritmo que va desde 0,1 a 5,4 ng/ml, en el que el ritmo de liberación de insulina está comprendido en el intervalo que va de durante aproximadamente 7 a 180 días, *in vivo*.

25 Una realización de la presente invención proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA I, SIA II, SIA III o combinaciones de los mismos, en el que SIA I consiste en grupos alargados que tienen una configuración similar a una perla de monómeros de insulina, SIA II consiste en una asociación lineal de grupos alargados que tienen una configuración similar a una perla de monómeros de insulina y SIA III consiste en aproximadamente 90% de SIA-II, y es una densa asociación, lineal de oligómeros de insulina, en el que el montaje libera insulina a un ritmo que va desde aproximadamente 0,1 a 0,54 ng/ml, en el que el ritmo de liberación de insulina está comprendido en el intervalo que va de durante aproximadamente 7 a 180 días, *in vivo*.

30 Una realización de la presente invención proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina, en el que el montaje libera insulina a un ritmo que va desde aproximadamente 0,2 a 0,6 UI por hora *in vitro*, en el que el ritmo de liberación de insulina está comprendido en el intervalo que va de 4 a 5,4 ng/ml, durante al menos 7 a 10 días.

35 Una realización de la presente invención proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA I, SIA II, SIA III o combinaciones de los mismos, en el que SIA I consiste en grupos alargados que tienen una configuración similar a una perla de monómero de insulina, SIA II consiste en una asociación lineal de grupos alargados que tienen una configuración similar a una perla de monómero de insulina y SIA III consiste en aproximadamente 90% de SIA-II, y es una densa asociación, lineal de oligómeros de insulina, en el que el montaje libera insulina a un ritmo que va desde aproximadamente 0,2 a 0,6 UI por hora *in vitro*, en el que el ritmo de liberación de insulina está comprendido en el intervalo que va de 4 a 5,4 ng/ml durante al menos 7 a 10 días.

40 Todavía en otra realización de la presente invención, se proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA) útil como medicamento de proteínas para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1 y 2 y sus complicaciones, en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA II, en el que SIA II consiste en una asociación lineal de grupos alargados que tienen una configuración similar a una perla de monómero de insulina, en el que el ritmo de liberación de insulina está comprendido en el intervalo que va de 0,5 a 1,8 ng/ml durante al menos 160 días.

45 Todavía no obstante en otra realización de la presente invención, se proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA) útil como medicamento de proteínas para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1 y 2 y sus complicaciones, en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA III, en el que SIA III consiste en una densa asociación lineal de oligómeros de insulina, en el que el ritmo de liberación de insulina está comprendido en el intervalo de 0,1 a 0,7 ng/ml durante al menos 180 días.

Todavía en otra realización de la presente invención, se proporciona un montaje supramolecular de insulina (SIA) útil como medicamento de proteínas para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste

- 5 en diabetes mellitus de tipo 1 y 2 y sus complicaciones, en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA II, en el que SIA II consiste en una asociación lineal de grupos alargados que tienen una configuración similar a una perla de monómero de insulina, en el que el montaje en el momento de la administración a pacientes diabéticos se mantiene cerca del nivel normoglucémico (120 ± 30 mg/dl) durante al menos 160 días en un paciente que lo necesita.
- El montaje supramolecular de insulina (SIA) descrito en la presente invención, en el que una sola dosis del montaje en el momento de la administración se mantiene cerca del nivel normoglucémico (120 ± 30 mg/dl) durante al menos 7 a 180 días en un paciente que lo necesita, en el que la concentración del montaje en la dosis está comprendida en el intervalo de 25 a 70 μ g.
- 10 El montaje supramolecular de insulina (SIA) descrito en la presente invención, en el que una sola dosis del montaje en el momento de la administración se mantiene cerca del nivel normoglucémico (120 ± 30 mg/dl) durante al menos 160 días en un paciente que lo necesita, en el que la concentración del montaje en la dosis está comprendida en el intervalo de 150 a 250 μ g.
- 15 Una realización de la presente descripción proporciona un montaje supramolecular de exendina-4 (SEA) útil como medicamento de proteínas para el tratamiento de la diabetes, en el que el montaje comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de exendina-4.
- Otra realización de la presente invención proporciona el montaje supramolecular de insulina, en el que el montaje es un profármaco no citotóxico, no inmunógeno, no apoptótico y no mitógeno.
- 20 Una realización de la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones, comprendiendo la composición una cantidad terapéuticamente eficaz del montaje supramolecular de insulina (SIA) descrito en la presente invención.
- 25 Otra realización de la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones, comprendiendo la composición una cantidad terapéuticamente eficaz del montaje supramolecular de insulina-II (SIA-II).
- 30 Aún otra realización de la presente descripción proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones, comprendiendo la composición una cantidad terapéuticamente eficaz del montaje supramolecular de insulina (SIA) y del montaje supramolecular de exendina-4 (SEA).
- Una realización adicional de la presente descripción proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones, comprendiendo la composición una cantidad terapéuticamente eficaz del montaje supramolecular de exendina-4 (SEA).
- 35 La composición o composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención se administra(n) por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea.
- La composición o composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención se administra(n) mediante un dispositivo capaz de liberar dicha composición, en el que dicho dispositivo se selecciona de un grupo que consiste en bombas, catéteres, parches e implantes.
- 40 En una realización, se proporciona un procedimiento de preparación del montaje supramolecular de insulina (SIA), comprendiendo el procedimiento disolver insulina a una temperatura de aproximadamente 25 a 60°C en una solución que tiene un pH comprendido en el intervalo de 1,5 a 7,8, e incubar la anterior durante un periodo de 6 a 48 horas con agitación constante para obtener un montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que SIA comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina.
- 45 El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de insulina (SIA) descrito en la presente invención, en el que el procedimiento comprende además lavar el SIA con PBS; y volver a poner en suspensión el SIA lavado en PBS.
- El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de insulina (SIA) descrito en la presente invención, en el que el periodo de incubación es de 10 horas.
- 50 En otra realización de la presente descripción se proporciona un procedimiento de preparación del montaje supramolecular de exendina-4 (SEA), comprendiendo el procedimiento disolver exendina-4 a una temperatura de aproximadamente 25 a 60°C en una solución que tiene un pH comprendido en el intervalo de 2,0 a 7,6; e incubar la anterior durante un periodo de 6 a 192 horas con agitación constante para obtener un montaje supramolecular de exendina-4 (SEA), en el que SEA comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de exendina-4.

El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de exendina-4 (SEA) descrito en la presente memoria comprende además lavar el SEA con PBS; y volver a poner en suspensión el SEA lavado en PBS.

El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de exendina-4 (SEA) descrito en la presente memoria, en el que el periodo de incubación es de 148 horas.

- 5 El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de insulina (SIA) descrito en la presente invención, en el que la solución se selecciona de un grupo que consiste en ácido clorhídrico o acético en agua que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 1,5 a 2,5; tampón de acetato de sodio que tiene un pH en el intervalo de 3,5 a 5,5; tampón de fosfato (PBS) con un pH de 6 a 7,5, y tampón de citrato que tiene un pH en el intervalo de 4 a 6.

- 10 El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de exendina-4 (SEA) descrito en la presente memoria, en el que la solución se selecciona de un grupo que consiste en ácido clorhídrico o acético en agua que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 1,5 a 2,5; tampón de acetato de sodio que tiene un pH en el intervalo de 3,5 a 5,5; tampón de fosfato (PBS) con un pH de 6 a 7,5, y tampón de citrato que tiene un pH en el intervalo de 4 a 6.

El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de insulina (SIA) descrito en la presente invención, en el que la temperatura es 37°C.

- 15 El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de exendina-4 (SEA) descrito en la presente memoria, en el que la temperatura es 37°C.

El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de insulina (SIA) descrito en la presente invención, en el que el pH de dicha solución es 7,2.

- 20 El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de exendina-4 (SEA) descrito en la presente memoria, en el que el pH de dicha solución es 7,2.

El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de insulina (SIA) descrito en la presente invención, en el que dicho periodo es de 6 a 192 horas.

El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de exendina-4 (SEA) descrito en la presente memoria, en el que dicho periodo es de 6 a 192 horas.

- 25 Una realización de la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones, en el que el procedimiento comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende el montaje supramolecular de insulina, que es eficaz para el alivio del trastorno.

- 30 Aún otra realización de la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones, en el que el procedimiento comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende el montaje supramolecular de insulina-II (SIA-II), que es eficaz para el alivio del trastorno.

- 35 Aún otra realización de la presente descripción proporciona un procedimiento para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones, en el que el procedimiento comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende el montaje supramolecular de exendina-4, que es eficaz para el alivio del trastorno.

- 40 Aún otra realización de la presente descripción proporciona un procedimiento para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones, en el que el procedimiento comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende el montaje supramolecular de exendina-4, que es eficaz para el alivio del trastorno.

- 45 En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona la utilización del montaje supramolecular de insulina para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones.

- 50 En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona la utilización del montaje supramolecular de exendina-4 para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones.

Aún en otra realización adicional de la presente descripción, se proporciona la utilización del montaje supramolecular de exendina-4 para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones.

Todavía en otra realización de la presente descripción, se proporciona la utilización del montaje supramolecular de insulina en combinación con el montaje supramolecular de exendina-4 para el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones.

- 5 En una realización adicional, se proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que el montaje presenta un pico agudo a 1647-1645 cm⁻¹ en espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR).

En una realización, la presente invención proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que la insulina es insulina recombinante humana.

- 10 En otra realización, la presente invención proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que la insulina es insulina humana, bovina o porcina.

Todavía en otra realización de la presente descripción se proporciona el montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que el montaje en el momento de la administración libera monómeros de insulina.

Además la presente invención proporciona el montaje supramolecular de proteínas, en el que el péptido en el montaje está acoplado a una pequeña molécula de fármaco.

- 15 Una realización de la presente invención proporciona el montaje supramolecular de proteínas descrito en la presente invención que actúa como un profármaco.

La composición farmacéutica descrita en la presente invención comprende vehículos, aditivos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica descrita en la presente invención se administra por vía intramuscular o subcutánea.

- 20 La composición farmacéutica descrita en la presente invención se administra mediante un dispositivo capaz de liberar dicha composición, en la que el dispositivo se selecciona de un grupo que consiste en bombas, catéteres e implantes.

La composición farmacéutica descrita en la presente invención, en la que una sola dosis de la composición en el momento de la administración libera dicha proteína durante un periodo prolongado.

- 25 El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de proteína descrito en la presente invención comprende la incubación de la insulina en la solución durante 10 horas.

El procedimiento de preparación del montaje supramolecular de proteína descrito en la presente invención comprende la incubación de la proteína en la solución durante 6 a 192 horas.

- 30 El procedimiento para el tratamiento que utiliza la composición farmacéutica descrita en la presente invención, en el que la composición se administra por vía intramuscular, intraperitoneal o subcutánea.

Todavía en otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende el montaje supramolecular de insulina (SIA) que es estable, resistente a proteasas y tiene vida útil prolongada.

Todavía en otra realización, la presente descripción proporciona una composición que comprende el montaje de exendina-4 (SEA) que es estable, resistente a proteasas y tiene vida útil prolongada.

- 35 Todavía en otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende el montaje supramolecular de insulina (SIA) que es estable, resistente a proteasas y tiene vida útil prolongada que va desde aproximadamente 10 días a 150 días o más.

Todavía en otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende el montaje supramolecular de exendina-4 (SEA) que es estable, resistente a proteasas y tiene vida útil prolongada que va desde aproximadamente 10 días a 150 días o más.

- 40

Como reconocerán los expertos en la materia pueden utilizarse varias soluciones tales como los tampones conocidos para la resuspensión y el lavado del montaje supramolecular de proteína descrito en la presente invención.

- 45 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" utilizada en la presente memoria se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o dolencia, o para presentar un efecto terapéutico o preventivo detectable. La cantidad eficaz exacta para un paciente dependerá de la talla y salud del paciente, de la naturaleza y extensión de la dolencia y del medicamento o combinación de medicamentos seleccionados para su administración. La cantidad eficaz para una situación dada se determina por experimentación rutinaria y está dentro del criterio del médico.

- 50 Para los propósitos de la presente invención, una dosis eficaz de SIA será generalmente de aproximadamente

0,1 mg/kg a aproximadamente 1,0 mg/kg, o aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 2,0 mg/kg o aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 3,0 mg/kg de las composiciones de la presente invención en el paciente al que se administra.

Una composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico, tal como anticuerpos o un polipéptido, genes, y otros agentes terapéuticos. La expresión se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, y que pueda administrarse sin toxicidad indebida. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y partículas de virus inactivos. Dichos vehículos son bien conocidos por cualquier experto en la materia. Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden incluir líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Las sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH, y similares, también pueden estar presentes en tales vehículos. Por lo general, las composiciones terapéuticas se preparan como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. Los liposomas y los neosomas se incluyen dentro de la definición de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden estar presentes en la composición farmacéutica, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar en diversas formas, tales como gránulos, comprimidos, píldoras, supositorios, cápsulas, suspensiones, pomadas, lociones y similares. Pueden utilizarse vehículos y/o diluyentes orgánicos o inorgánicos de calidad farmacéutica adecuados para uso oral y tópico para compensar las composiciones que contienen los compuestos terapéuticamente activos. Los diluyentes conocidos en la técnica incluyen medios acuosos y aceites y grasas vegetales y animales. Como agentes auxiliares pueden utilizarse agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la presión osmótica o tampones para asegurar un valor de pH adecuado y potenciadores de penetración en la piel.

Las composiciones descritas en la presente invención comprenden montajes supramoleculares de proteínas de las proteínas terapéuticas relevantes/aplicables y son aplicables para el tratamiento de una serie de enfermedades crónicas y síntomas agudos.

Las composiciones descritas en la presente invención comprende oligómeros de proteínas terapéuticas en particular el montaje supramolecular de una proteína para la liberación lenta de la proteína.

Algunas sustancias biofarmacéuticas ampliamente utilizadas, como la insulina, el glucagón y la calcitonina y pueden ser inducidas a formar amiloides. En comparación con las proteínas precursoras solubles, los agregados amorfs formados como un preludio de la formación de amiloide, adquieren nuevas propiedades tales como una mayor estabilidad, resistencia a las proteasas, autopropagación, vida útil más larga, estructura muy organizada y puede servir como una fuente compacta concentrada de moléculas puras.

Los montajes supramoleculares de insulina descritos en la presente invención existen en una estructura definida que tiene tanto componentes α -helicoidales como hoja β . La adopción de la estructura única anteriormente mencionada produce un cambio en su solubilidad y su estructura a partir de las moléculas de insulina natural en solución. Significativamente, la liberación de monómeros de insulina de esta estructura supramolecular son biológicamente activos y por lo tanto se asemejan a la estructura de la insulina natural. Se confieren nuevas propiedades de disolución a esta estructura supramolecular formada, que actúa como profármaco, en concreto como por sí misma. En su forma de profármaco se descubrió que no tiene ninguna acción o efecto sobre los eventos de señalización o la homeostasis de la glucosa de las células de grasa sensibles a la insulina. Se transforma en un fármaco por la liberación de monómeros de insulina procedente del medicamento de liberación lenta o del punto de inyección *in vivo*. Tanto *in vitro* como *in vivo* los resultados demuestran la singularidad de la formulación para liberar moléculas de insulina bioactivas que presentan un efecto sobre la homeostasis de la glucosa y otros parámetros clínicos generalmente evaluados para la diabetes de tipo I y II.

La presente invención proporciona una composición que comprende el montaje supramolecular de insulina útil en el tratamiento de la diabetes mellitus. La insulina supramolecular es un híbrido de oligómeros fibrilares amorfs y nacientes de insulina y sirve como una formulación de liberación lenta para la liberación de insulina bioactiva. La hormona insulina reguladora de la glucosa es un polipéptido de 51 restos que existe en equilibrio como una mezcla de diferentes estados oligoméricos, incluyendo hexámeros, dímeros y monómeros, dependiendo del medio ambiente. En vesículas de secreción pancreáticas, la insulina se almacena como un hexámero a pH fisiológico, mientras que interactúa con su receptor como un monómero. En condiciones desnaturalizantes, tales como pH bajo o en presencia de desnaturalizantes fuertes, la insulina se aglomera para formar fibrillas de amiloide (Paul Bevan Insulin signalling. *J. Cell Sci.*, 114, 1429-1430 (2001)).

Los oligómeros supramoleculares de insulina descritos en la presente invención se preparan a un pH que va desde

6,8 hasta 7,8 preferiblemente 7,2.

La presente invención proporciona una composición que comprende un montaje supramolecular de insulina capaz de liberación lenta de monómeros de insulina. La composición que comprende un montaje supramolecular de insulina dado (concretamente, SIA I, II, III o una combinación de los mismos) es útil para conseguir un mejor control de glucémico.

La presente invención proporciona oligómeros de insulina, el montaje supramolecular II de insulina que es útil para conseguir el control glucémico estricto al conseguir una liberación lenta de la insulina. Cuando se administra por vía subcutánea o por vía intramuscular el montaje supramolecular II de insulina mantiene un nivel basal de insulina en rata diabética provocada por STZ durante un período prolongado que oscila desde aproximadamente 10 días hasta 180 días o más, mientras que mantiene al mismo tiempo un control glucémico estricto, proporcionando de este modo un tratamiento de larga duración contra la diabetes mellitus.

Según la presente invención, una realización proporciona una composición que comprende un montaje supramolecular II de insulina que produce una liberación lenta de los monómeros de insulina que oscila entre 0,5-1,5 ng/ml y dura alrededor de por lo menos 180 días cuando se administran por vía intramuscular o por vía subcutánea.

Otra realización de la presente invención proporciona una composición que comprende el montaje supramolecular II de insulina en la que la cantidad de monómero de insulina liberada del montaje supramolecular II de insulina está comprendida en el intervalo de 0,5-1,5 ng/ml en el suero.

En una realización de la presente invención, el efecto *in vivo* de la composición que comprende oligómeros supramoleculares de la insulina en el control de la glucemia en sangre se ha verificado utilizando ratas diabéticas provocadas con STZ.

Otra realización de la presente invención proporciona la dosificación de la composición que comprende un montaje supramolecular de insulina en el que la dosis que varía desde aproximadamente 50 µg a aproximadamente 400 µg de insulina se controló durante el período de tiempo experimental.

Otra realización de la presente invención proporciona la dosificación de la composición que comprende un montaje supramolecular de insulina en el que la dosis es de 200 µg de la insulina.

Otra realización de la presente invención proporciona la dosificación de la composición que comprende un montaje supramolecular de insulina en el que la dosis es de 100 µg de la insulina.

Todavía en otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende el montaje supramolecular de insulina, en donde la composición no provoca actividad de la enzima degradante de insulina (EDI) en el punto de la inyección y alrededor del mismo durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 10 días a 180 días o más.

Aún en otra realización de la presente invención, no hay anticuerpos anti-insulina sérica del paciente durante un periodo de tiempo que va de aproximadamente 10 días a 150 días o más.

Todavía en otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende el montaje supramolecular de insulina que es estable, resistencia a las proteasas y tiene vida útil más larga que va de aproximadamente 10 días a 150 días o más.

Aún en otra realización de la presente invención, se proporciona una composición que comprende el montaje supramolecular de insulina que es capaz de liberar monómeros de insulina de manera controlada durante un largo periodo de tiempo sin ninguna irrupción de liberación rápida. La cinética de transformación se puede controlar tanto *in vivo* como *in vitro*.

Además, una composición que comprende el montaje supramolecular de insulina descrito en la presente invención se puede utilizar como una sola dosis con efecto de larga duración que libera a los pacientes de la necesidad de administrar múltiples dosis de insulina cada día.

La composición que comprende el montaje supramolecular de insulina descrito en la presente invención no presenta una gran liberación brusca de insulina que impide la etapa hipoglucémica en los pacientes diabéticos.

La composición que comprende el montaje supramolecular de insulina descrito en la presente invención es capaz de liberar monómeros de insulina a una velocidad constante, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Todavía en otra realización de la presente invención, la etapa oligomérica superior del montaje supramolecular de insulina consigue un control glucémico estrictamente regulado y sin hipoglucemia en ayunas en un paciente diabético.

Todavía en otra realización de la presente invención, la etapa de oligomérica superior del montaje supramolecular de insulina consigue un control glucémico estrictamente regulado sin hipoglucemia en ayunas en un paciente diabético

de tipo 1.

Todavía en otra realización de la presente invención, la etapa de oligomérica superior del montaje supramolecular de insulina consigue un control glucémico estrictamente regulado y sin hipoglucemia en ayunas en un paciente diabético de tipo 2.

- 5 Aún en otra realización de la presente invención, no hay un aumento repentino de peso corporal de los pacientes cuando son tratados con el montaje supramolecular de insulina o la composición que comprende el montaje supramolecular de insulina de la presente invención.

- 10 Todavía en otra realización de la presente invención, no se encuentra ninguna fase de latencia en la liberación de monómeros bioactivos de insulina procedentes del montaje supramolecular II de insulina en el perfil de glucemia de la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (por sus siglas en inglés, IPGTT) del paciente, similar a la administración de insulina libre.

Aún en otra realización de la presente invención, se observa cinética de orden cero o liberación lenta para la liberación *in vivo* de monómeros de insulina procedentes del montaje supramolecular II de insulina.

- 15 Todavía en otra realización de la presente invención, la insulina liberada del montaje supramolecular II de insulina es equivalente en función biológica a la insulina soluble.

- 20 Además, en otra realización de la presente invención, la toxicidad del montaje supramolecular de insulina se regula mediante la realización de ensayos biológicos para glutamato oxalo-acetato transaminasa sérica (por sus siglas en inglés, SGOT), glutamato piruvato transaminasa sérica (por sus siglas en inglés, SGPT), bilirrubina total, bilirrubina, fosfatasa alcalina, proteínas totales en el suero, albúmina sérica, globulina sérica, relación A/G en el suero, pruebas de función renal (por sus siglas en inglés, KFT), formación de cataratas, peso de tejido adiposo, peso corporal y aspecto.

Aún en otra realización, la tasa de infusión de glucosa sigue siendo la misma en los animales tratados. De esto se llega a la conclusión que los monómeros liberados desde el medicamento de liberación lenta en el punto de inyección son biológicamente activos y estimulan los músculos y en el hígado para absorber la glucosa.

- 25 Todavía en otra realización, el ensayo de MTT se realizó en células MCF 7 para validar las dinámicas estructural y de fijación inalteradas de los monómeros de insulina, liberados de SIA II.

Además, en otra realización de la presente invención, ratas Wistar macho se volvieron diabéticas utilizando otro compuesto químico, Aloxano. Estas ratas diabéticas se trataron además con SIA II y presentaron resultados similares al de la rata diabética provocada por STZ. Se observó un control estricto de la glucemia.

- 30 Todavía en otra realización de la presente invención, los ratones C57BL/6 se volvieron diabéticos utilizando estreptozotocina, después se trataron con SIA II, también mostraron niveles normoglucémicos.

Otra realización de la presente invención es que el montaje supramolecular de insulina es un medicamento de liberación lenta estable, útil para la liberación controlada de fármacos de péptidos activos a partir de los terminales del montaje supramolecular de insulina.

- 35 Según una realización de la presente invención, el montaje supramolecular II de insulina es capaz de proporcionar un tratamiento de larga duración contra la diabetes.

En otra realización, la insulina que se utiliza para la preparación de montaje supramolecular de insulina es preferiblemente insulina humana, insulina bovina y porcina recombinantes.

- 40 Todavía en otra realización, la composición que comprende la montaje supramolecular I y II de insulina (SIA I y II) o una combinación de los mismos, descrito en la presente invención es capaz de reducir la glucemia en pacientes animales tratados con estreptozotocina para provocar la diabetes de tipo II.

Todavía en otra realización, SIA I, que libera monómeros de insulina a un ritmo más rápido se administró a las ratas que padecen diabetes mellitus de tipo II (DM II).

Según una realización de la presente invención, SIA II también se administró a ratas DM II para el tratamiento.

- 45 Aún en otra realización, las ratas diabéticas tratadas con tanto SIA I y II presentaron concentraciones casi normoglucémicas limítrofes en el lado superior, tanto en el estado preprandial como posprandial (180 ± 15 mg/dl).

Aún en otra realización de la presente invención, la dosis de SIA II inyectada fue de 150 μ g en dos lugares, tanto por vía subcutánea como intramuscular.

- 50 Otra realización de la presente invención demuestra la capacidad de SIA I y II para mantener las concentraciones casi normoglucémicas de hasta 30 días.

Todavía en otra realización, la administración de exendina 4 junto con la terapia de insulina fue capaz de mantener concentraciones casi normoglucémicas (135 ± 10 mg/dl) durante hasta 45 días, y fue una formulación mejor para el tratamiento de DM II.

- 5 Además, en otra realización, SIA III, que libera monómeros de insulina, pero a un ritmo muy lento (0,05-0,3 ng/ml) que puede ser útil en el tratamiento de pacientes diabéticos dudosos, a saber prediabéticos o pacientes con mal pronóstico en las pruebas de tolerancia a la glucosa) quienes requieren muy poca cantidad de la insulina como terapia.

Aún en otra realización de la presente invención, la concentración de insulina humana detectada en el suero de ratas diabéticas es de aproximadamente 0,7 a 0,85 ng/ml.

- 10 Todavía en otra realización de la presente invención, se estimaron diversos parámetros séricos, tales como los triglicéridos (TAG), ácidos grasos libres (AGL), para demostrar la eficacia del tratamiento.

Aún en otra realización, la concentración sérica de TAG estaba en el intervalo de 0,45 a 0,6 mmol/l para las ratas tratadas con exendina-4, que es casi igual a la de referencia.

- 15 Además, en otra realización, las concentraciones séricas de AGL se estimaron en alrededor de 0,85 a 0,9 mmol/l para ratas tratadas con exendina 4, que es casi igual a la de referencia.

Todavía en otra realización de la presente invención, el aumento en el peso corporal de los animales tratados fue casi igual que el de las ratas de referencia.

Aún en otra realización, la metodología actual se puede extender a aquellas enfermedades crónicas e inflamatorias donde se requiere una terapia prolongada y continua utilizando péptidos, proteínas o moléculas pequeñas.

- 20 Los ejemplos 1 y 2 de la presente invención proporcionan un procedimiento para la preparación del montaje supramolecular II de insulina. La figura proporciona detalles de la formación de fibrillas por la insulina (tanto humana como bovina) controlados utilizando fluorescencia de tioflavina T (Th-T) (Le Vine, H. Quantification of β -Sheet Amyloid Fibril Structures with Thioflavin T. *Methods Enzymol.* 309, 274-284 (1999)). La formación de fibrillas por la insulina bovina se observó por adquisición de fluorescencia de Th-T, cuando la insulina se agitaba a 180 rpm a 37°C, tanto a pH 7,0 (PBS 50 mM) como a pH 2,0 (ácido clorhídrico en agua) (Fig. 1). El aumento de la fluorescencia de Th-T se produjo debido a su fijación a fibrillas de insulina que alcanza un valor máximo a las 48 horas para la insulina incubada a pH 7,0, mientras que a pH 2,0 la formación de fibrillas es rápida y por lo tanto, la fluorescencia de Th-T alcanzó un valor máximo en 20 h. La Fig. 1 compara la formación de fibrillas tanto por tanto insulina bovina como humana.

- 30 El ejemplo 3 de la presente invención proporciona la cinética de la liberación de monómeros de insulina del montaje supramolecular de insulina-II. La forma del montaje supramolecular de insulina de la insulina actúa como un depósito para la liberación lenta de monómero de insulina durante un largo tiempo (Fig. 2a). La liberación de monómeros de insulina a partir de su amiloide y diversos montajes supramoleculares de insulina se observó y se representa en la Fig. 2b y c. Las fibras amiloides completamente formadas liberan insulina insignificante independientemente del pH. A pH 2,0, los intermedios del montaje supramolecular de insulina, en particular, del montaje supramolecular II de insulina, liberan insulina a un ritmo muy lento, lo que sugiere que estos oligómeros son robustos y están estrictamente asociados. Sin embargo, el intermedio de pH 7,0 (denominado montaje supramolecular II de insulina), que presenta una turbidez de 0,9 a 1,3 a 600 nm, libera insulina a un ritmo apreciable. Se observa un aumento lineal en la liberación de monómeros de insulina a la absorbancia de 280 nm durante un período de 15 ± 5 días. Cuando se observó la liberación de insulina procedente del SIA a volumen constante del 1 ml, se observó una curva en forma de campana (Fig. 2d). Esto demuestra la reversibilidad del procedimiento de formación de oligómeros y la existencia de un equilibrio entre la insulina libre y SIA. La fluorescencia de la tirosina de la muestra liberada corroboró estas observaciones como se proporciona en la Fig. 2a. El intermedio amiloide de insulina, montaje supramolecular II de insulina (alternativamente denominada insulina preamiloide II) cumple con el requisito de una liberación lenta de 2-4 μ M (0,4-0,6 UI) de monómeros de insulina por hora *in vitro*, con lo que se consigue una constante pero lenta liberación *in vivo* para el mantenimiento de las concentraciones basales de insulina en el cuerpo.

- El ejemplo 4 proporciona la caracterización del montaje supramolecular de insulina utilizando fijación con rojo Congo (RC) (Klunk, W.E., Jacob, R.F. y Mason, R.P. Quantifying amyloid by Congo red spectral shift assay. *Methods Enzymol.* 309, 285-305 (1999)). Como Th-T, CR también se fija específicamente a las estructuras ricas en hoja β de amiloide y se ha utilizado de forma rutinaria para su detección. La fijación con RC a muestras incubadas con RC 50 mM en PBS durante 1 h a 37°C se controló por el desplazamiento hacia el rojo en su máximo de absorción mediante el escaneo de las regiones de 400-600 nm. La figura 3 estipula que el montaje supramolecular de insulina (rH y bovino) presenta una fijación débil a RC, mientras que las fibras completamente desarrolladas a pH 2,0 y 7,0 mostraron una fijación significativa.

- 55 El ejemplo 5 proporciona estudios de fluorescencia de tirosina. El ejemplo 6 proporciona estudios de espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier. Se caracterizaron también los montajes supramoleculares de insulina I, II y III utilizando ATR-FTIR. Se observó el correspondiente espectro distinto en cada etapa (Fig. 4). Se observa un

desplazamiento de la banda IR hacia frecuencias más bajas. El montaje supramolecular II de insulina presenta un pico agudo a $1647\text{-}1645\text{ cm}^{-1}$, mientras que la fibrilla de insulina (amiloide) completamente formada presenta un pico a $1630\text{-}1628\text{ cm}^{-1}$ para la insulina bovina y HR, respectivamente. Los espectros FTIR del montaje supramolecular II de insulina están de acuerdo con los datos de CR demostrando que la proteína es todavía en gran parte helicoidal, aunque con un aumento en el contenido de la estructura de espiral aleatoria.

Las morfologías de las fibras formadas a pH 2,0 y 7,0 se evaluaron por Microscopia de Fuerza Atómica (MFA) y Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) según lo dispuesto en los ejemplos 7 y 8, respectivamente. Moléculas de insulina natural (tanto bovina como rH) a pH 7,0 y pH 2,0 muestran distribución al azar con una altura de $1,3 \pm 0,21\text{ nm}$, que se correlaciona con la dimensión de monómeros de insulina ($1,11\text{ nm}$) y dímeros ($1,49\text{ nm}$) (Fig. 5(i)). Los compuestos intermedios del proceso de fibrilación a pH 7,0 se muestran en la Fig. 5(ii-iv) para insulina bovina y en la Fig. 5(v-vi) para la insulina rH. SIA-I representa grupos alargados que tienen una disposición similar a perlas. En el medio, hay algunas partículas lineales alargadas con alturas de $12 \pm 2\text{ nm}$, lo que sugiere más asociación en estados oligoméricos superiores. El compuesto intermedio SIA-II se considera como una asociación lineal de los grupos alargados anteriormente mencionados en caso tanto de la insulina bovina como de la rH, que tiene una única entidad con una organización estructural supra-oligomérica (Fig. 5 (c y e)). SIA-III (SIA-II subsiguiente a la etapa de fibrilla) presentó un aumento en la densidad de las estructuras oligoméricas superiores. Fibras totalmente desarrolladas a pH 7,0 representan la típica estructura cruzada en β de amiloide de insulina (Fig. 5(vii)). Los compuestos intermedios del proceso de fibrilación a pH 2,0 en 6-7 h revelan una asociación lateral de dos fibrillas de altura de 7,2 a 8,3 nm, y después de 20 h, se observaron grandes fibras retorcidas de 10-12 nm de ancho (Fig. 5ix y 5x).

El ejemplo 8 proporciona Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) para evaluar la presencia de los posibles montajes de insulina. Microfotografías de MET muestran la presencia de algunas estructuras oligoméricas amorfas y superiores en el montaje supramolecular de insulina etapa II (Fig. 6i). Las etapas posteriores al montaje supramolecular II de insulina (Fig. 6(ii)) tienen estructura más fibrilar como se muestra en la (Fig. 6 (iii y iv)). Por el contrario, hay una abundancia de formas fibrilares cuando la insulina se incubaba a pH 2,0 [Fig. 6 (v)].

El ejemplo 9 proporciona detalles de los modelos animales utilizados para el estudio de la eficacia de amiloide de insulina y formas de montaje supramolecular de insulina. Los autores han utilizado cuatro modelos de diabetes diferentes para probar la hipótesis y el potencial terapéutico del SIA, en el tratamiento de la diabetes, a saber, (a) ratas tratadas con STZ, (b) ratas tratadas con Aloxano y (c) ratones tratados con STZ (d) conejo con STZ.

Para estandarizar la dosis, 50 μg , 100 μg , 200 μg y 400 μg de montaje supramolecular de insulina-II se inyectaron por vía subcutánea y alternativamente por vía intramuscular en ratas diabéticas. Como se resume en la Fig. 7a y b, una dosis única de 50 y 100 μg de montaje supramolecular de insulina mantuvo concentraciones casi normoglucémicas hasta sólo 10 y 30 días, respectivamente, en comparación con 135 y 160 días cuando se utilizó 200 μg de montaje supramolecular de insulina, tanto bovina como humana, respectivamente. En caso de una dosis de 400 μg , se observó normoglucemia repentina sin ayuno e hipoglucemia en ayunas independientemente de la ruta utilizada, lo que sugiere la liberación de un bolo inicial de una concentración basal de monómero de insulina procedente del medicamento de liberación lenta SIA de insulina bovina. El uso de 200 mg de montaje supramolecular de insulina como una dosis terapéutica fue elegido para los estudios prospectivos detallados a largo plazo.

El ejemplo 10 proporciona el tratamiento de los animales diabéticos con forma de insulina del montaje supramolecular de insulina. Las ratas diabéticas inducidas por STZ asignadas a múltiples grupos se trataron con insulina (4 UI/kg, IP), montaje supramolecular de insulina (200 μg tanto SC como IM), respectivamente, para estudiar el efecto *in vivo* de la terapia del montaje supramolecular de insulina sobre el control de la glucemia en sangre. Además, un grupo de ratas diabéticas tratadas con PBS y otro grupo de ratas normales sirvieron como referencia diabética y no diabética. La glucemia preprandial y posprandial de las ratas se controlaron durante un período hasta que se observó el efecto fisiológico de la insulina. Como se muestra en la Fig. 8a y b, el tratamiento con 200 μg de montaje supramolecular de insulina mantuvo la concentración basal de insulina mediante la liberación prolongada y lenta de monómeros de insulina del medicamento de liberación lenta del montaje supramolecular de insulina en ratas diabéticas inducidas por STZ, lo que conduce a una reducción significativa en la glucemia sin ayuno sin hipoglucemia en ayunas (Fig. 9a y b). No se observaba ninguna diferencia significativa si el montaje supramolecular de insulina se inyectaba por vía subcutánea o intramuscular. En el caso de tratamiento sin insulina (es decir en su contrapartida normal; forma organizada no de modo supramolecular) (dosis única de 4 UI/kg), la glucosa en sangre diaria se redujo a un valor sin ayuno de 350-450 mg/dl y en ayunas de 300-400 mg/dl solamente. A ratas diabéticas se les administró cada día insulina por vía intraperitoneal manteniendo concentraciones hiperglucémicas de glucosa en sangre ($300 \pm 100\text{ mg/dl}$). A diferencia del tratamiento con insulina libre, donde se requería dosis diaria para mantener la glucemia desde caída en picado a niveles muy altos, la inyección única de montaje supramolecular de insulina era suficiente para conseguir concentraciones casi normoglucémicas ($150 \pm 60\text{ mg/dl}$) en ratas diabéticas durante 3 meses sin hipoglucemia en ayunas ($90 \pm 50\text{ mg/dl}$). Se obtuvieron resultados similares con el montaje supramolecular de insulina formado a partir de insulina humana, como se representa en la Fig 8b y 9b. La administración de insulina amiloide, formada a pH 7,0 y 2,0, no tuvo ningún efecto beneficioso sobre el estado glucémico de ratas diabéticas, como se desprende de la Fig. 10. Una vez más el peso del cuerpo que es un indicador de la salud normal se controló junto con BGL en todos los casos

durante todo el período de tratamiento. Como se muestra en la figura 11, hubo una pérdida inicial de peso corporal inmediatamente después del tratamiento con STZ, pero se consiguieron ganancias progresivas de peso en ratas diabéticas después del tratamiento con montaje supramolecular II de insulina y la curva de los animales tratados con montaje supramolecular de insulina era paralela a la de la referencia de no diabéticos. Por lo tanto, la eficacia sorprendente del montaje supramolecular II de insulina para su uso en el tratamiento a largo plazo de la diabetes mellitus se considera una mejora sobre los procedimientos convencionales.

El ejemplo 11 proporciona la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal para evaluar la eficacia de montaje supramolecular de insulina para liberar insulina de manera continua. Se controló la liberación *in vivo* de insulina. Se estimó la actividad biológica del monómero liberado por la eliminación de la glucosa de la sangre en la sangre. Los detalles de los experimentos independientes realizados se muestran en la Fig. 12. Se determinó la glucemia antes (T_0) y a los 30, 90, 150, 270 y 330 min después de la administración de glucosa a ratas normales en ayunas y tratadas con STZ, tras el tratamiento con PBS, montaje supramolecular II de insulina e insulina. Como se muestra en la figura 12, la inyección de insulina, el tratamiento con montaje supramolecular II de insulina o monómeros liberados *in vitro* solos mejoró significativamente la prueba de tolerancia a la glucosa en los animales tratados, y su elevada glucemia una vez que la infusión de glucosa volvió a las concentraciones de antes de la prueba de tolerancia en 1,5 horas.

El ejemplo 12 describe el análisis cuantitativo de insulina sérica de la insulina bovina y rH en la administración del montaje supramolecular de insulina (Figura 13 a). La insulina sérica fue detectable hasta un período de 150 días y 180 días para insulina SIA-II bovina y rH, respectivamente, lo que correspondía a una disminución en BGL. La disminución de la glucemia se mantuvo hasta un período de 150 días y 180 días para la insulina SIA-II bovina y rH, respectivamente, manteniendo valores de glucosa casi normales durante más de 20 a 25 semanas con una dosis única del montaje supramolecular II de insulina. Se realizó ELISA en estado sólido para analizar cuantitativamente las concentraciones en el plasma de insulina liberada de la insulina SIA II, que es responsable del mantenimiento de la glucemia normal. Como era de esperar, se logró la liberación de insulina a concentración basal o ligeramente por encima de la basal en el caso de ratas diabéticas tratadas con montaje supramolecular de insulina (0,5-1,2 ng/ml) en comparación con la concentración de insulina no detectable (0,08 ng/ml) en ratas diabéticas tratadas con PBS (Fig. 13 a y c). Se observó una liberación lenta de la insulina (0,8-1,1 ng/ml) desde el día de la inyección hasta 150-180 días, independientemente de la vía, lo que contribuyó a valores próximos a la normoglucemia en animales tratados con montaje supramolecular de insulina. Aunque se observó alguna variación de un animal a otro, podrían conseguirse valores destacables de liberación de insulina que van desde 0,5 hasta 1,2 ng/ml. Esta concentración basal fue suficiente para mantener las concentraciones de normoglucemia hasta el agotamiento del montaje supramolecular de insulina. Sin embargo, en los animales diabéticos tratados con insulina, se detectó una concentración sérica media relativamente mayor, pero con un alto grado de variación entre los animales. Esto fue atribuible a la variabilidad entre pacientes en BGL por tratamiento con insulina sola. Se analizaron cuantitativamente también las concentraciones séricas de insulina para la prueba de tolerancia a la glucosa realizada, para la que ya se han demostrado los datos de glucosa. La figura 13b, se describe los valores de insulina bovina en el suero de las ratas hasta 270 minutos en los experimentos de IPGTT. En caso de tanto las ratas alimentadas con PBS solamente tratadas con la referencia como con STZ, el valor de insulina bovina es casi insignificante (Fig. 13b). Mientras que, en el caso de la administración de insulina, los valores de insulina aumentan a $\sim 0,9$ ng/ml en 30 min, y luego disminuyen durante un período de tiempo. Se observó un perfil similar cuando se utilizó insulina liberada terminal, que es equivalente a la insulina libre. Esto corresponde a la disminución de la glucemia, seguido de su aumento debido a la absorción y la degradación de la insulina. Por otra parte, en el tratamiento con montaje supramolecular de insulina, las concentraciones séricas de insulina alcanzaron a 0,8-0,9 ng/ml, equivalente a la concentración basal en 30 min y luego se mantuvo constante durante el período de estudio, como se ve por el análisis cuantitativo de insulina bovina. Esta concentración basal continua asegura una concentración normoglucémica, en lugar de disminuir drásticamente las concentraciones y hacer que el animal se vuelva hipoglucémico. Además, se realizó el ELISA de insulina de rata para evaluar las concentraciones séricas de insulina, tanto para las ratas de referencia como para las tratadas con STZ. Como se muestra en la figura 13c, la concentración basal de insulina de rata es 0,501 ng/ml y aumenta el colector en respuesta a la glucosa infundida. En el caso de ratas tratadas con STZ, las concentraciones basales de insulina son casi insignificantes, debido a la destrucción de las células β pancreáticas por STZ. Esto confirma que la disminución en la glucemia observada en caso de tratamiento con montaje supramolecular de insulina es debida a la liberación de insulina bovina/rH liberado de la SIA II. En el procedimiento de preparación de insulina SIA II, se emplea otra insulina aparte de la insulina bovina y rH seleccionadas de un grupo que consiste en, pero no se limita a, la insulina de cerdo.

El ejemplo 13 proporciona 125 marcador de la insulina para validar y cuantificar la liberación *in vitro* de los terminales de SIA II. El montaje supramolecular de insulina II formado a partir de la insulina marcada tiene una actividad específica de 49.912 CPM/ml/ μ g. 50 μ l de montaje supramolecular de insulina (4.991.200 CPM) se inyectaron por vía subcutánea así como por vía intramuscular y se hizo el seguimiento de la glucemia y se recogieron muestras de suero a los 0, 30 min, 1 h, 4 h, 10 h, 24 h, después una vez al día, y luego en días alternos una vez a la semana. Se midieron los recuentos por ml de suero (Fig. 14a). Como se muestra, el perfil de glucosa en sangre fue el mismo que el observado con SIA II sin marcar. El CPM/ml calculado se mantuvo casi constante (Fig. 14a) cuando se representa frente al número de días de tratamiento. Sin embargo, hubo un recuento inicial alto a los 30 minutos-4 horas, que luego disminuyó gradualmente hasta el nivel constante de 2000 a 3000 en 10 horas. La cantidad de

insulina liberada en la sangre se calculó y estaba comprendida en el intervalo de 0,5 a 1,2 ng/ml, que corresponde a la concentración basal o ligeramente por encima de la basal de insulina sérica como se ha observado con ELISA (Fig. 14b). Para probar más que la insulina liberada del montaje supramolecular de insulina es monomérica, el suero de los diferentes momentos se redisolvió en tricina-SDS-PAGE y se reveló el radiograma utilizando phosphor imager. Como se muestra en la figura 15, la banda en suero corresponde al monómero de insulina libre y su intensidad permaneció constante durante un largo período en el que se cargó la misma cantidad de suero. Se observó una disminución de la intensidad después de 20 días mostrando el uso y el agotamiento del medicamento de liberación lenta del montaje supramolecular de insulina durante un período de tiempo junto con algún efecto de la desintegración del propio marcador de radio.

El ejemplo 14 describe los estudios de pinzamiento hiperglucémico realizados para evaluar la liberación lenta y continua de monómeros de insulina procedentes del SIA II inyectado. En un intervalo de tiempo de una semana, un mes y tres meses, la cantidad de glucosa infundida para mantener el estado hiperglucémico se mantuvo sin cambios durante todo el experimento. Esto demuestra que existe liberación de insulina constante desde el medicamento de liberación lenta en el punto de inyección. En caso del grupo al que se administra insulina libre, la cantidad de glucosa infundida disminuye con el tiempo, lo que es debido a una disminución en la absorción de glucosa en la sangre por el músculo y el hígado en ausencia de suministro continuo de insulina libre (Figura 16 a-c).

El ejemplo 15 proporciona el efecto de la insulina en el transporte de glucosa y otros episodios metabólicos en los tejidos adiposos al realizar cultivos primarios de adipocitos de rata que están mediados por cascadas de señalización intracelulares que se inician una vez que la insulina se une a los receptores de insulina en la superficie celular (Paul Bevan Insulin signaling. *J. Cell Sci.*, 114, 1429-1430 (2001)). El efecto de la insulina en la célula está mediado por la activación de mediadores intracelulares como PI3K, AKT y ERK. La activación de la PI3 cinasa y Akt, media en la absorción de glucosa provocada por insulina y la transposición de vesículas GLUT-4 a la membrana plasmática y está involucrada en varios otros efectos de la insulina incluyendo la inhibición de la lipólisis y la activación de la síntesis de ácidos grasos, glucógeno, proteínas y ADN. Por otra parte, la activación de la ruta de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) está involucrada en las respuestas mitogénicas de preadipocitos a los factores de crecimiento. Se estudió la concentración de PI3K, que es la primera cinasa aguas abajo para señalización de insulina. Como se muestra en la figura 17a, la concentración de PI3K aumenta significativamente cuando se utiliza montaje supramolecular de insulina y la insulina se libera *in vitro* de ellos en comparación con la referencia. No hubo diferencia significativa observada en comparación con la insulina. También se evaluó la proteína y la concentración activada de Akt total, una treonina/serina cinasa importante para la regulación de la acción de la insulina y sus diversas respuestas metabólicas en los adipocitos. Se observó un aumento significativo en la concentración de p-Akt, que otra vez era similar a la respuesta observada con insulina libre. No hubo diferencia en la concentración de proteína Akt total por lo tanto, no hay diferencia en su expresión en presencia de insulina o de su montaje supramolecular II de insulina, fue observada. Para evaluar si los perfiles temporales observados y el nivel de fosforilación de Akt en los adipocitos era paralelo a la diferencia en la actividad de Akt, la fosforilación del sustrato GSK3 β de Akt endógeno se controló por inmunotransferencia utilizando anticuerpos contra GSK3 β y p-GSK3 β , GSK3 β es fosforilado directamente por Akt en Ser-21 y es inactivado después de su fosforilación. La fosforilación de GSK3 β aumentó varias veces en los adipocitos tratados con insulina libre de la insulina o montaje supramolecular II de insulina en comparación con la referencia y no había una diferencia significativa entre las células tratadas. No se observó ninguna diferencia en la concentración de proteína GSK3 β total lo que sugiere que no hay cambio en su expresión posterior al tratamiento. Por lo tanto, tanto Akt como GSK3 β mostraron respuestas rápidas y pronunciadas al montaje supramolecular II de insulina y liberaron insulina de montaje supramolecular de insulina y fueron similares a las respuestas observadas en la estimulación con insulina libre utilizado como referencia. Se observó la activación de ERK en el tratamiento con montaje supramolecular de insulina y la insulina liberada de ella en los adipocitos, ya que esta cinasa está implicada en la regulación mediada por la insulina de los factores de transcripción de adipocitos y el desarrollo de tejido adiposo. En el tratamiento de los adipocitos con insulina, el montaje supramolecular de insulina y la insulina liberada de montaje supramolecular de insulina, se observó una activación significativa de ERK 1/2 en comparación con la referencia. La fosforilación de ERK 2 fue dos veces mayor que ERK 1 lo que sugiere más expresión de ERK 2 en el tratamiento. No hubo ninguna diferencia significativa en el modelo de fosforilación de ERK 1/2 en el SIA, la insulina o las células tratadas en suero. Por tanto, la fosforilación de ERK en el montaje supramolecular II de insulina y las células tratadas con insulina fueron similares en el contexto de la señalización mediada por PI3K, Akt y GSK3. Se observó activación similar de mediadores de señalización, cuando el suero de animales tratados con insulina o su SIA-II se añadió a adipocitos cultivados (Fig. 17b). En conjunto estos datos demuestran que la insulina liberada del montaje supramolecular II de insulina es capaz de activar la ruta de señalización de la insulina en adipocitos como la propia insulina. Los efectos observados son aún mejores a medida que la insulina en su forma monomérica se libera principalmente de su montaje supramolecular de insulina.

El ejemplo 16 describe análisis de inmunotransferencia Western de insulina, montaje supramolecular de insulina e insulina liberada *in vitro* (monómeros) y suero de ratas tratadas con insulina, montaje supramolecular de insulina y PBS.

El ejemplo 17 describe detalles de histología e inmunohistoquímica de montaje supramolecular de insulina de la insulina. En ratas diabéticas tratadas con el montaje supramolecular de insulina se controló la presencia de una cantidad residual de montaje supramolecular de insulina a partir del día de la inyección de una semana a 12 semanas. Se detectaron depósitos de montaje supramolecular de insulina en secciones de tejido subcutáneo así

como muscular utilizando rojo Congo. Se prepararon, tiñeron y analizaron secciones de tejido subcutáneo y muscular como se describe en materiales y procedimientos. Se encontró que los tejidos obtenidos después de 24 h de inyección del montaje supramolecular de insulina que se unen con rojo Congo efectivamente, lo que confirma la presencia de mayores cantidades de fibrillas de montaje supramolecular de insulinas (Fig. 18). La fijación de rojo Congo disminuyó en función del tiempo y era insignificante después de 16 semanas (Fig. 18 a(i-x) y b (i-x)), lo que confirma la liberación de insulina procedente de los terminales de los medicamentos de liberación lenta del montaje supramolecular de insulina. En los mismos tejidos también se comprobó la inflamación causada por un montaje supramolecular de insulina por H y E e inmunotinción. Extensiones representativas se sometieron al método de tinción con H y E e inmunohistoquímica para detectar la presencia de células inflamatorias (Fig. 18a (xi-xx) y 18b (XI-XV)).

En comparación con las secciones de ratas inyectadas, con LPS, donde la infiltración de células proinflamatorias eran visibles tanto en tejidos subcutáneos como musculares teñidos con H & E (Fig. 19a (i-ii)), secciones inyectadas con montaje supramolecular de insulina no presentaban ningún signo de inflamación incluso después de 16 semanas (Fig. 18a (xi-xv)). Se observaron resultados similares en el caso de secciones inmunoteñidas donde LPS de *Escherichia coli* fue suficiente para atraer a número enorme de células proinflamatorias después de 72 h en el punto de la inyección (Fig. 19a (iii-iv)), mientras que no se observó dicha reacción en los animales tratados con el montaje supramolecular de insulina (Fig. 18a (xv-xx) y b (xi-xv)). Estas observaciones refuerzan la naturaleza no citotóxica del montaje supramolecular de insulina que se utiliza. El amiloide formado a pH 2,0 se une a colorante rojo Congo de manera muy eficiente como se ve en la figura 19b, cuando se inyecta por vía subcutánea. Por otra parte no hay disminución en el medicamento de liberación lenta corroborando los datos que ninguna liberación de monómeros de insulina se lleva a cabo desde el amiloide completamente formado (Fig. 19b i-viii).

El ejemplo 18 describe el modelo de aloxano de la diabetes. Ratas Wistar macho se volvieron diabéticas utilizando aloxano y se controló su glucemia. La administración del montaje supramolecular II de insulina a ratas diabéticas, redujo la glucemia a niveles casi normoglucémicos, y se mantuvo un control estricto de la glucemia de hasta > 120 días, tanto en condiciones preprandiales como posprandiales (Fig. 20a y b). El análisis cuantitativo de insulina sérica se realizó utilizando ELISA. Desde el día de la inyección, se observa una liberación lenta y constante de la insulina humana en el suero de las ratas tratadas (0,5-0,9 ng/ml) (Fig. 20c). por lo tanto, el efecto fisiológico observado por la reducción de las concentraciones de glucosa en ratas diabéticas es debido a la liberación continua de monómeros de insulina del medicamento de liberación lenta SIA-II formado en el punto de inyección.

Ejemplo 19 Reducción de las complicaciones secundarias relacionadas con la hiperglucemia en la diabetes de tipo I: En la diabetes de tipo 1, el suministro insuficiente de insulina conduce a un aumento de la degradación de proteínas en los músculos esqueléticos y a la lipólisis en los adipocitos. Las ratas diabéticas mostraron una marcada disminución en el músculo esquelético (~20-40%) y la grasa abdominal (> 60%) (Nathan, D. M., Cleary, p. ej. A., Backlund, J. Y., et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 353, 2643-53 (2005)). Por el contrario, animales diabéticos tratados con el montaje supramolecular de insulina tenían peso normal para estos tejidos y estaban sanos. Se observó el desarrollo de cataratas en ratas diabéticas, así como en las tratadas con insulina (Fig. 21). Mientras que no se observó formación de cataratas en los animales tratados con SIA II, la mayoría de las ratas no tratadas presentaba cataratas como se demuestra en la Fig. 21. Además, la función del hígado y del riñón, los dos órganos principales del cuerpo que por lo general y gravemente resultan afectados en la diabetes estaban normales en ratas tratadas con el montaje supramolecular II de insulina en comparación con las ratas sin tratar o infundidas con insulina libre y se resume en la tabla 1.

Se examinó la deposición de oligómeros superiores de SIA-II inyectado a ratas diabéticas en secciones de corazón, riñón e hígado después de 12 semanas, observadas utilizando colorante rojo Congo (Fig. 22). No se observó deposición de oligómeros en ninguna de las secciones de tejido.

El ejemplo 20 proporciona los detalles de la detección de la enzima degradante de insulina (EDI) y de la detección de anticuerpos contra la insulina. La resistencia subcutánea a la insulina en la diabetes de tipo 1 es un raro síndrome (Paulsen, E.P., Courtney, J. W. y Duckworth, W.C. Insulin resistance caused by massive degradation of subcutaneous insulin. *Diabetes* 28, 640-645 (1979) y Freidenberg, G.R., White, N., Cataland, S., O'Dorisio, T.M., Sotos, J.F. y Santiago, J.V. Diabetes responsive to intravenous but not subcutaneous insulin: effectiveness of aprotinin. *N. Engl. J. Med.* 305, 363-368 (1981)), definido como la falta de actividad biológica de la insulina inyectada por vía subcutánea, sin embargo, se mantiene la eficacia de la insulina infundida por vía intravenosa. Esto se atribuye principalmente al aumento de la degradación de la insulina por la EDI en los tejidos subcutáneos. La EDI degrada específicamente la insulina (Duckworth, W.C., Bennett, R.G. y Hamel, F. G. *Insulin degradation: progress and potential*, *Endocr. Rev.* 19, 608-624 (1998)) y la insulina parcialmente degradada se reabsorbe en la circulación con aumento de la inmunogenicidad, pero ninguna actividad biológica. La EDI está presente en los tejidos sensibles a la insulina y en las células insensibles a la insulina, tales como monocitos y linfocitos. Para comprobar el desarrollo de dicha resistencia a la insulina en animales tratados con el montaje supramolecular, se determinaron la actividad biológica de EDI y la presencia de anticuerpo anti-insulina como se describe en el apartado Procedimientos. La actividad de EDI era insignificante en todas las muestras de suero (1-12 semanas) de los animales tratados con el montaje de insulina supramolecular (Fig. 23). Del mismo modo no había presencia de anticuerpos anti-insulina incluso después de 12 semanas de tratamiento, lo que apoya la ausencia de actividad de EDI (Fig. 24).

Para ver si los monómeros de insulina liberados por el montaje supramolecular II de insulina habían sufrido algún cambio en su estructura o en su dinámica de fijación, se realizó ensayo de MTT en las estirpes celulares MCF 7. La proliferación de células MCF 7, cuando se añadió SIA al cultivo fue similar a la de las células a las que se añadió insulina natural. Además, los monómeros liberados del SIA II formado, también presentaban la misma cinética de la proliferación celular. La insulina como factor de crecimiento I se utilizó como referencia positiva para la proliferación de las células MCF-7 (Fig. 25). La insulina y el IGF 1 tienen estructura similar, y en ausencia del otro, cada uno puede unirse al otro receptor. Pero mientras que el IGF 1 es mitógeno, la insulina tras la fijación a receptor de insulina o del receptor de IGF no produce proliferación de las células. Por lo tanto los monómeros liberados de SIA II tienen la misma cinética de fijación que la de la insulina natural, y no sufren ningún cambio estructural.

El ejemplo 21 describe el modelo de estreptozotocina para la provocación de la diabetes en ratones. La respuesta a la dosis de SIA humana y bovina en ratones que se vuelven diabéticos con STZ. La administración de diversas dosis de 20, 50, 100 y 200 µg del SIA respectivo a ratones diabéticos mantuvo la normo/casi normoglucemia para 5, 15, 30, 120 días, respectivamente (Fig. 26 a-c).

El ejemplo 22 describe el modelo de estreptozotocina para la provocación de la diabetes en conejos. La administración de 1 mg/kg de peso corporal de SIA-II de insulina rH a conejos diabéticos mantuvo la normo/casi normo-glucemia durante al menos 80 días (Fig. 27).

El ejemplo 23 proporciona detalles de los experimentos llevados a cabo con el montaje supramolecular de insulina junto con exendina 4. Para el tratamiento de la diabetes de tipo II, se administró el montaje supramolecular de insulina con exendina 4. La terapia administrada fue capaz de disminuir la glucemia y mantener a niveles casi normoglucémicos en ratas diabéticas hasta > 30 días (Fig. 28). Las concentraciones de TG y AGL también se mantuvieron casi aproximadamente normales en comparación con ratas tratadas con sólo insulina o PBS, cuando las concentraciones aumentaron hasta 1,5 veces en el suero como se muestra en la Tabla 2.

La formulación del montaje supramolecular de insulina de la presente invención muestra el sorprendente resultado de la liberación de monómeros de insulina durante un largo período. Además, el montaje supramolecular II de insulina de la presente invención no presenta una gran liberación brusca de insulina; impidiendo la etapa hipoglucémica en ratas diabéticas tratadas con STZ. Para validar el resultado inesperado anterior se evaluaron los productos intermedios del montaje supramolecular II de insulina obtenidos durante el proceso de fibrilación de la insulina a pH 7,0. El compuesto intermedio del montaje supramolecular II de insulina se encuentra para liberar monómeros de insulina a un ritmo constante de larga duración. El compuesto intermedio (montaje supramolecular II de insulina) seleccionado no presenta fijación significativa de rojo Congo lo que indica su incapacidad para evolucionar a un estado de amiloide y el análisis MFA confirmó la presencia de una asociación lineal de oligómeros alargados como especie predominante. La altura de esta entidad única es 18 ± 5 nm en comparación con la fibra completamente desarrollada muy retorcida con altura de 12 ± 5 nm, lo que sugiere que los oligómeros alargados que forman el montaje supramolecular de insulina están hinchados y han conservado la estructura similar a la natural. Estructuras no fibrilares similares se observan también en los estudios de MET. La eficacia biológica de la insulina se evaluó generalmente por su capacidad para regular la glucemia en sangre. La disminución resultante en la glucemia representa lo más destacable y, terapéuticamente, el efecto más importante de la insulina. Se evaluó la eficacia del control glucémico en ratas diabéticas inducidas con STZ tratadas con una sola dosis de montaje supramolecular de insulina y se comparó con inyecciones diarias de insulina sola. Tanto el tratamiento con montaje supramolecular de insulina como las inyecciones de insulina reducen la gravedad de la hiperglucemia. En comparación con el tratamiento con insulina, una sola dosis de montaje supramolecular de insulina de la presente invención mantiene las concentraciones casi normoglucémicas (120 mg/dl) en el animal diabético durante un período de alrededor de 150-180 días.

La presente invención evalúa además el efecto de la terapia del montaje supramolecular II de insulina en la regulación de la glucemia. Animales diabéticos tratados con el montaje supramolecular de insulina se sometieron a ayuno durante la noche. Estos animales en ayunas fueron capaces de mantener su glucemia en ayunas dentro del intervalo normal (60-100 mg/dl) y no se observó hipoglucemia preprandial. Considerados en conjunto, estos datos siempre que el estado oligomérico superior del montaje supramolecular II de insulina en comparación con la terapia convencional de insulina consigue un control glucémico estrictamente regulado sin hipoglucemia en ayunas en los animales diabéticos.

La presente invención evalúa además el efecto del tratamiento con el montaje supramolecular II de insulina sobre el peso corporal. Se llevó a cabo la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal para determinar el inicio de la acción del montaje supramolecular de insulina en caso de hiperglucemia grave. El perfil de la glucosa en sangre IPGTT demostró que tanto el tratamiento con insulina como con montaje supramolecular de insulina demostraron su efecto en 30 minutos, lo que sugiere ninguna fase de retardo en la liberación de monómeros bioactivos de insulina procedentes del medicamento de liberación lenta del montaje supramolecular II de insulina.

La presente invención proporciona el perfil de liberación *in vivo* de insulina en el montaje supramolecular de insulina por análisis cuantitativo de insulina sérica bovina/humana utilizando ELISA. A diferencia de la cinética de liberación sigmoidea observada *in vitro*, la liberación *in vivo* de monómeros de insulina procedentes del montaje supramolecular de insulina seguida de cinética de orden cero como es de esperar para una liberación lenta. Una

liberación lenta de nivel basal y por encima de basal (0,5-1,2 ng/ml) de insulina para mantener la normoglucemia se observó, que se correlacionaban bien con la duración del tratamiento. Para validar la cinética de liberación anterior, se hizo el radiomarcado de insulina con ^{125}I y el montaje supramolecular de insulina marcado con ^{125}I se inyectaron por vía subcutánea o por vía intramuscular a animales tratados con STZ. La cantidad de liberación de insulina se midió haciendo el seguimiento de CPM/ml. CPM/ml/ μg (49.912) se utilizó para el análisis cuantitativo de la insulina liberada en el suero en un momento específico y era análoga a la cantidad de insulina bovina analizada cuantitativamente por ELISA. Después de medir los recuentos, las muestras de suero se resolvieron en tricina-SDS-PAGE. Las imágenes de fósforo reveladas presentaban bandas correspondientes al monómero de insulina. Los monómeros de insulina liberados del medicamento de liberación lenta del montaje supramolecular de insulina activaron eficazmente la cascada de señalización de insulina en adipocitos sensibles a la insulina. La insulina liberada del montaje supramolecular de insulina *in vitro* e *in vivo* (suero), cuando se añade a adipocitos aislados fue capaz de activar los mediadores intracelulares (es decir, P13K, Akt, ERK1/2 y GSK3 β) de la ruta de señalización. Por lo tanto, los monómeros de insulina liberados del medicamento de liberación lenta del montaje supramolecular de insulina son biológicamente activos y siguen el mismo mecanismo que la insulina para regular la homeostasis de la glucosa en el cuerpo. La histoquímica también estipula que el montaje supramolecular II de insulina inyectado en animales formaba un medicamento de liberación lenta a partir del que hay una liberación lenta y prolongada de insulina bioactiva. Además, no se observa inflamación en oposición a la infiltración de leucocitos en respuesta a LPS inyectado por vía subcutánea o por vía intramuscular.

La presente invención estipula que la terapia de montaje supramolecular de insulina confiere cualidades fisiológicas profundos en animales diabéticos. Esto se refleja en parte en el control glucémico significativamente mejorado así como en las concentraciones de urea y creatinina notablemente reducidas debido a las funciones mejoradas de hígado y riñón en las ratas diabéticas según se proporciona en la Tabla 1.

La presente invención proporciona detalles de anticuerpos anti-insulina y de la enzima degradante de insulina (EDI) en el suero en la administración del montaje supramolecular de insulina. La ausencia de anticuerpos anti-insulina incluso al final de la 12ª semana añade el valor del montaje supramolecular de insulina como tratamiento para la diabetes mellitus. Su incapacidad para producir EDI como respuesta en o alrededor del punto de inyección es un factor importante en la prolongación de la liberación de insulina procedente del montaje supramolecular de insulina y el efecto antidiabético beneficioso simultáneo.

La presente invención estipula que el monómero de insulina liberado del montaje supramolecular II de insulina tiene la función biológica equivalente a la insulina soluble. Una diferencia importante reside en la duración de la acción, mientras que es sólo de 6-10 h para la inyección de la insulina convencional, pero sorprendentemente así, alrededor de 10 días a alrededor de 180 días o más, dependiendo de la dosis del montaje supramolecular II de insulina. Esto se puede atribuir a la notable estabilidad de la insulina en el montaje supramolecular de insulina, que forma un medicamento de liberación lenta en el punto de inyección para el suministro de la forma de insulina más fisiológicamente relevante, a saber, monómeros de insulina, durante largos períodos de tiempo.

La administración de montaje supramolecular II de la insulina humana condujo a un mejor control aún de la glucemia, observado durante un período de 135-180 días. Tanto la inyección subcutánea como la intramuscular de oligómero de insulina dieron como resultado casi normoglucemia como se desprende de las figuras 8b y 9b.

La insulina liberada en el suero se analizó cuantitativamente por ELISA y se observó que mantiene una concentración casi constante, resultante de una liberación lenta y prolongada del medicamento de liberación lenta.

Ratas Wistar macho se volvieron diabéticas con aloxano y ratones C57BL/6 diabéticos tratados con estreptozotocina (sirvieron como otro modelo de diabetes), ambos mostraron glucemia casi normoglucémica tras ser tratados con el montaje supramolecular II de insulina.

Los datos de inmunotransferencia Western obtenidos para el montaje supramolecular II de insulina humana son esencialmente los mismos, lo que muestra la activación de la ruta de señalización por los monómeros de insulina liberados.

El montaje supramolecular I de insulina se caracteriza por la especie inflamada y más globular con 18 ± 2 nm de altura. El despliegue de la estructura del péptido durante el proceso de formación de amiloides da como resultado las especies monoméricas globulares distribuidas al azar sobre la superficie de forma individual. Más adelante hay una asociación lineal de estos monómeros en la fase II del montaje supramolecular de insulina humana II, aunque conservando su morfología hinchada. Los oligómeros formados representan grupos alargados, igual que la insulina bovina con una altura de 18 ± 4 nm. En el caso de la montaje supramolecular III de insulina (más cerca de la etapa de fibrillas que sucede a SIA II), se observa un aumento en la densidad de las estructuras oligoméricas superiores. La estructura es más compacta con una altura de 5 ± 1 nm. La morfología general de la estructura se asemeja a etapas SIA bovina, con fibras completamente vistas más adelante.

La presente invención proporciona la eficacia, así como la viabilidad de la terapia del montaje supramolecular de insulina para la mejora significativa de la glucemia sin provocar hipoglucemia en ayunas en el modelo animal de diabetes inducida por STZ. A diferencia de la terapia intensiva de insulina, mediante la cual se controla la glucemia

mediante un aumento de la frecuencia de la inyección de insulina con el riesgo simultáneo de hipoglucemia, el control glucémico mejoró significativamente utilizando la terapia de montaje supramolecular de insulina, se lleva a cabo sin necesidad de múltiples inyecciones de insulina y sin ganancia excesiva de peso corporal.

Un valor adicional a esta innovación se añade por la extensión de estos estudios a las dolencias que requieren una infusión prolongada y continua de insulina como terapia, como en el caso de la diabetes mellitus de tipo II (DM II). Tanto la exendina 4 como la insulina, se utilizan en combinación como una terapia potente para DM II. La exendina 4 es conocida por una glucemia menor, mediante la disminución de la absorción de los alimentos en el estómago. También retarda el vaciado gástrico, disminuye las concentraciones de HbAC y evita el gran aumento de peso observado debido a la terapia con insulina. La exendina 4, agregada en un complejo oligomérico, del que se liberan los monómeros naturales de exendina 4 como es el caso con la insulina descrita en el apartado anterior. La exendina 4a se utiliza como terapia adjunta junto con SIA I y II para el tratamiento de la DM II en pacientes animales.

El ejemplo 24 describe el seguimiento de hormonas contrarreguladoras en el que se realizaron estudios de pinzamiento euglucémico/ hipoglucémico hiperinsulinémico para controlar las concentraciones de hormonas contrarreguladoras de la insulina, tales como glucagón y epinefrina. Se observó una disminución del 40% en la concentración máxima de glucagón para las ratas tratadas con SIA-II en comparación con las ratas Wistar normales de referencia (Fig. 29). Por el contrario, las ratas tratadas con insulina a diario presentaban 80 a 90% de reducción en la respuesta al glucagón. Por lo tanto la liberación de la insulina basal procedente de SIA-II imita la fisiología del cuerpo y no produce una alteración significativa en el mecanismo contrarregulador del cuerpo para mantener la homeostasis de la glucosa, a diferencia del tratamiento diario con insulina.

La recaída de la hipoglucemia durante el tratamiento con SIA-II en ratas diabéticas se reguló controlando la respuesta de la hormona contrarreguladora de la insulina a la hipoglucemia provocada en varios grupos tratados. La regulación glucémica por contrarregulación de la insulina se mantuvo en las ratas tratadas con SIA-II.

El Ejemplo 25 el estudio de resistencia a proteasas para evaluar la estabilidad del montaje supramolecular I, II y III de insulina.

La resistencia de SIA-II y SIA-III para escindir mediante tripsina y Proteinasa K demuestra además la diferencia en la organización estructural de estos oligómeros. La insulina rH y SIA-I son más sensibles a la escisión por las proteasas en comparación con SIA-II y SIA-III (Fig. 30), que adoptan una forma oligomérica de orden superior resistente a la acción de las proteasas.

Por lo tanto la presente invención no sólo abarca enfermedades metabólicas como la diabetes, tanto de tipo I como II, sino que puede extenderse más a todas aquellas enfermedades tales como el dolor crónico, la septicemia, la artritis, la osteoporosis, la inflamación, etc., donde se requiera una infusión continua de fármaco terapéutico, ya sea un péptido, proteína o una pequeña molécula de fármaco. Esta invención también expone la viabilidad de utilizar oligómeros de insulina (SIA I, SIA II y SIA III) para el tratamiento de DM I, DM II y casos diabéticos ambiguos. Esta metodología de la utilización de los oligómeros del fármaco como un medicamento de liberación lenta para el tratamiento se puede extender a muchas más enfermedades, que tienen aplicación completa, de amplio espectro.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a modo de ilustración de la invención contenida en la presente invención y por consiguiente no debe considerarse que limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Fibrilación de insulina

Se disolvieron 2 mg/ml de insulina bovina y rH, en solución salina con tampón fosfato (50 mM, pH 7,0) o pH 2,0 (ácido clorhídrico en agua) y se incubó a 37°C durante 72 h a 7 días con agitación constante a 180 rpm. Se hizo el seguimiento de la cinética de la formación de fibrillas controlando la adquisición de la fluorescencia por la tioflavina T (ThT).

Ejemplo 2

Fluorescenciade Tioflavina T

La fluorescencia de Th-T se midió en un espectrofluorómetro Fluoromax de Jobin Yvon utilizando anchuras de rendija de 3 nm y 5 nm para la excitación y emisión, respectivamente. Las muestras incubadas con 50 µM de Th-T durante 15 minutos se excitaron a 450 nm y su emisión se controló en el intervalo de 460-560 nm. Los datos se corrigieron para el blanco y el efecto de filtro interno utilizando la siguiente ecuación, $F_c = F \cdot \text{antilog}[(A_{ex} + A_{em})/2]$

donde el F_c es la fluorescencia corregida y F es la medida, A_{ex} y A_{em} son la absorbancia de la solución de reacción a las longitudes de onda de excitación y de emisión, respectivamente.

En la figura 1 se proporciona la cinética de formación de fibrillas por insulina bovina y rH a 37°C. La figura 1 (a) demuestra la cinética de la formación de fibrillas a pH 7,0 controlada con fluorescencia de Th-T 50 µM.

Ejemplo 3

5 Cinética de liberación *in vitro* de monómeros de productos intermedios y fibrillas completamente formadas construidas a pH 2,0 y 7,0

Se retiraron alícuotas de 200 µl (equivalente a 400 mg de insulina) en diferentes momentos de la reacción de fibrilación de insulina a pH 2,0 y 7,0, 37°C. Los compuestos intermedios del montaje supramolecular de insulina producidos se aislaron por centrifugación. El sedimento obtenido se lavó con PBS y se volvió a poner en suspensión en el 1 ml de PBS en un eppendorf. Se retiró la tapa de la eppendorf que contiene los compuestos intermedios y se selló la eppendorf con la membrana de diálisis del corte de 12 kDa. A continuación, la eppendorf se insertó por su cara de la membrana en un tubo Falcon de 50 ml que contenía 20 ml de PBS con azida sódica al 0,02% y la cinética de la liberación de insulina se controló durante 15 días con agitación constante. La cinética de liberación se controló por espectrofotometría a 280 nm y por su fluorescencia intrínseca (tirosina). Se calculó la cantidad de insulina liberada por hora. La figura 2a proporciona la liberación *in vitro* de insulina del compuesto intermedio del montaje supramolecular II de insulina controlada por absorbancia a 280 nm y la fluorescencia intrínseca de tirosina. También se da la intensidad de Th-T de la solución dentro de la membrana de diálisis a las 0 h y a los 15 días.

Para estudiar el perfil de liberación de pequeñas alícuotas de diferentes productos intermedios y de fibrillas amiloides completamente formadas tanto a pH 2,0 como 7,0, 37°C se retiraron del proceso de fibrilación diferentes productos intermedios a intervalos regulares y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y después de lavar dos veces el sedimento con PBS, se volvió a poner en suspensión en PBS reciente. La liberación de insulina monomérica se controló por espectrofotometría a 280 nm, 37°C. La cinética de liberación se estudió en dos condiciones diferentes. En una, el sedimento se puso en suspensión en PBS y se dializó a través de una membrana de corte a 12 kDa en 20 ml de PBS con agitación constante (Fig. 2a-c). En segundo lugar, el sedimento obtenido se puso en suspensión en 1 ml de PBS y la absorbancia del sobrenadante se leyó a 280 nm (Fig. 2d).

25 Ejemplo 4

Fijación con Rojo Congo

Se estimó que la cantidad de rojo Congo fijado a oligómeros/amiloides de insulina como se informó anteriormente (Klunk, W.E., Jacob, R.F. y Mason, R.P. Quantifying amyloid by Congo red spectral shift assay. *Methods Enzymol.* 309, 285-305 (1999)) utilizando la ecuación, moles de rojo Congo unido/l de la suspensión de amiloide = $A_{540} \text{ nm}/25295 - A_{477} \text{ nm}/46306$.

La figura 3 proporciona estudios de fijación con rojo Congo con insulina natural, montaje supramolecular II de insulina, montaje supramolecular III de insulina e insulina amiloide.

Ejemplo 5

Fluorescencia de tirosina

35 El dializado del montaje supramolecular de insulina retirado en diferentes intervalos de tiempo en una cubeta de cuarzo de 0,2 ml se excitó a 270 nm y se registró la emisión entre 320 y 370 nm. La anchura de la ranura de 5 nm se utilizó tanto para excitación como para emisión. La figura 2(a) proporciona la liberación *in vitro* de la insulina del compuesto intermedio del montaje supramolecular II de insulina controlado por absorbancia a 280 nm y la fluorescencia intrínseca de tirosina. También se muestra la intensidad de Th-T de la solución dentro de la membrana de diálisis a las 0 h y a los 15 días.

40 Ejemplo 6

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se registraron espectros de IR con un espectrómetro FTIR de sobremesa Bruker Tensor 27, equipado con un detector de telururo de cadmio y mercurio refrigerado N₂ líquido. Se analizaron muestras de insulina en Bio-ATR y se registraron 256 interferogramas a temperatura ambiente con una resolución de 2 cm⁻¹. Para cada espectro, se sustrajo el vapor de agua y se corrigió la referencia.

SIA I, II y III también se caracterizaron utilizando ATR-FTIR. Se observaron distintos espectros, correspondientes a cada fase (Fig. 4).

50 Montajes supramoleculares de insulina I, II y III de insulina bovina y rH se caracterizaron también utilizando ATR-FTIR. Se observaron distintos espectros, correspondientes a cada fase (Fig. 4). Se observa un desplazamiento de la banda IR hacia frecuencias más bajas durante la fibrilación. El montaje supramolecular de insulina II (SIA-II) tiene un pico agudo a 1647 cm⁻¹ y 1645 cm⁻¹ para insulina bovina y rH, respectivamente, mientras que los picos de amiloide completamente formados a 1630 cm⁻¹ y 1.628 cm⁻¹ para la misma. Los espectros de FTIR están de acuerdo con los

datos de fijación de RC demostrando que la configuración de SIA-II es todavía en gran parte helicoidal, aunque con un aumento en el contenido de la estructura en espiral aleatoria.

Ejemplo 7

5 Microscopia de Fuerza Atómica (MFA)

Se utilizó microscopio de fuerza atómica Pico plus (Agilent Technologies) en modo MAC magnético acústico (contacto) para diagnóstico por la imagen. Las imágenes se registraron en el aire, ya sea con una superficie desnuda de mica o mica con la muestra utilizando voladizo MAC tipo II (constante elástica del voladizo: 2,8 N/m, Frecuencia: 59,722 kHz). Las muestras se retiraron de la mezcla de reacción de fibrilación en diversos momentos, se diluyeron 20 veces con agua y se inmovilizaron sobre mica recién partida durante 2 minutos. Las muestras se lavaron con agua nanopura, se secaron bajo N₂ y se sometieron a análisis por MFA.

La figura 5 proporciona morfologías de compuestos intermedios de montajes supramoleculares y fibrillas de insulina estudiadas por Microscopia de Fuerza Atómica. Figura 5 (a) monómero de insulina (b) compuesto de montaje supramolecular I de insulina, pH 7,0, (c) montaje supramolecular II de insulina, pH 7,0, (d) compuesto intermedio del montaje supramolecular III de insulina, pH 7,0, (e) SIA I humano, (f) SIA II humano, (g) SIA III humano, y (h) fibrillas completamente formadas a pH 7,0., (i) proporcionan compuesto intermedio del montaje supramolecular de insulina formado en 6 horas, pH 2,0 a 37°C, (j) ofrece fibrillas amiloides completamente formadas a pH 2,0.

Ejemplo 8

Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

Para los estudios de MET, las muestras se agitaron intensamente e inmediatamente se absorbieron a rejillas de cobre de malla 300 recubiertas con fomer como tales o diluidas a 1:2-20 veces con agua mili-Q y se lavaron con agua desionizada. Las rejillas se incubaron en acetato de uranilo al 3% durante 2 a 5 min y se secaron bajo luz infrarroja para analizar las muestras por tinción negativa. Las rejillas se visualizaron con un Phillips CM-10 a 80 kV. Se tomaron imágenes con la cámara MegaView III y se analizaron utilizando el Imaging Software de Imaging System Phillips. La figura 6 proporciona microfotografías de MET con tinción negativa de fibrillas de insulina y compuestos intermedios de montaje supramolecular de insulina, en las que la figura 6(a) proporciona el compuesto intermedio del montaje supramolecular I de insulina, pH 7,0, la figura 6(b) proporciona el montaje supramolecular II de insulina, pH 7,0, la figura 6(c) proporciona el compuesto intermedio del montaje supramolecular III de insulina, pH 7,0, la figura 6(d) proporciona fibras maduras a pH 7,0, la figura 6(e) proporciona fibras formadas a pH 2,0, 37°C.

30 Ejemplo 9

Modelo de rata de diabetes

Se utilizaron ratas macho Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia) de nueve semanas de edad que pesaban 210 ± 10 g. Las ratas fueron alojadas en jaulas de polipropileno disponibles en el mercado, y mantenidas en condiciones de temperatura controlada en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y se dejó acceder a alimentos y agua a discreción.

Modelo de estreptozotocina para la provocación de diabetes en ratas

Ratas macho Wistar que pesaban 250-300 g se dividieron en cuatro grupos y se estimó la glucemia utilizando tiras para glucosa Accu Check de Roche. Las ratas se mantuvieron en ayuno durante 48 horas. 50mg/kg en peso de estreptozotocina recién preparada en tampón de citrato (pH 4,5) se administró por vía intraperitoneal a 10 a 20 ratas. Se proporcionó inmediatamente alimento y se comprobó la glucemia después de tres días. Los animales se agruparon según su glucemia (grupo I: 250-350 mg/dl, grupo II: 350-450 mg/dl y grupo III: > 450 mg/dl). Se mantuvo la glucemia alta durante una semana con 2-6 U/kg de peso corporal (en peso) de insulina bovina. Todas las ratas tratadas con STZ desarrollaron hiperglucemia (glucemia > 250 mg/dl), 5 días después de la inyección de STZ, y sus concentraciones de insulina sérica se analizaron cuantitativamente utilizando ensayo inmunosorbente con enzima ligada para insulina de rata sólida (ELISA) (Mercodia). Las ratas con > 250 mg/dl de concentraciones de glucosa y de insulina sérica insignificante (~0,08 ng/ml) se consideraron diabéticas y se utilizaron para el experimento.

Ejemplo 10

Tratamiento del montaje supramolecular de insulina

Después de una semana de mantenimiento de glucemia alta con insulina, las ratas se dividieron en tres grupos, conteniendo cada uno 5 ratas. A las ratas del grupo I se les administraron dosis únicas de 4U/kg en peso de insulina bovina por vía intraperitoneal al día. A las ratas del grupo II se les inyectaron 4U/kg en peso de insulina dos veces al día. Al grupo III se trató con 200 µg de montaje supramolecular II de insulina (por vía subcutánea así como por vía intramuscular) en 100 µl de PBS y a las ratas del grupo IV se les administró 100 µl de PBS, que constituye la referencia diabética. Un grupo de 5 ratas normales inyectadas con 100 µl de PBS, sirvió como referencia para no

diabéticos. El peso corporal y la glucemia, tanto preprandial después de 8 a 10 h de ayuno como posprandial se comprobaron inicialmente a diario y luego con frecuencia decreciente. La figura 7 muestra la eficacia *in vivo* del montaje supramolecular de insulina (alternativamente insulina preamiloide) en la homeostasis de la glucosa, (a) glucemia en respuesta a varias dosis de montaje supramolecular II de insulina (bovina) administrados tanto por vía subcutánea como intramuscular. (b) glucemia en respuesta a varias dosis de montaje supramolecular II de insulina (r-humano), administrado tanto por vía subcutánea como intramuscular.

La figura 8 muestra glucemias posprandiales controladas durante un periodo de 135 días después de la administración de SIA-II bovino (a) Insulina bovina, (b) insulina rH. La figura 9 muestra glucemias preprandiales controladas durante un periodo de 160 días después de la administración de SIA-II humano (a) insulina bovina, (b) insulina rH. La figura 10 muestra la glucemia controlada después de la administración de insulina amiloide formada a pH 2,0 y 7,0. La figura 11 muestra el perfil del peso corporal de ratas diabéticas tratadas con SIA-II, ratas de referencia diabéticas y ratas de referencia no diabéticas.

Ejemplo 11

Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT)

Ratas tratadas con STZ (n = 12) y ratas normales (n = 4) se mantuvieron en ayunas durante 12 h. Se controló la glucemia como se describió anteriormente. Se hizo la prueba de tolerancia a la glucosa. En resumen, se infundieron los animales con 3g/kg de peso corporal de glucosa, por vía intraperitoneal, seguida de inyección de 4U/kg en peso de insulina bovina a ratas del grupo I, 100 µl de insulina amiloide a las del grupo II y 100 µl de PBS (vehículo) a las del grupo III. Se controló la glucemia a 0, 30, 90, 150, 270 y 330 min después del tratamiento. Se aisló suero de varios momentos y se representó en un gráfico entre la glucemia y el tiempo. La figura 12 proporciona el perfil de la glucemia intraperitoneal de la prueba de tolerancia de glucosa intraperitoneal (por sus siglas en inglés, IPGTT).

Ejemplo 12

Análisis cuantitativo de insulina sérica

Se aisló suero de las muestras de sangre recogidas y se almacenó a 20°C hasta su posterior análisis. Las concentraciones de insulina bovina y de rata se analizaron cuantitativamente utilizando inmunoanálisis enzimático de dos puntos en fase sólida (ELISA) de Mercodia (Suecia), siguiendo el protocolo del fabricante. La figura 13a proporciona el análisis cuantitativo de la insulina sérica humana y bovina utilizando ELISA en ratas tratadas con STZ en respuesta al montaje supramolecular de insulina inyectado SC o IM, la figura 13(b) proporciona el análisis cuantitativo de la insulina sérica bovina de IPGTT, la figura 13(c) proporciona el ELISA de insulina sérica de rata realizado para IPGTT.

Ejemplo 13

Marcaje de insulina con I¹²⁵

Para validar más y cuantificar la liberación *in vitro* de los terminales de la insulina SIA II, se hizo el marcaje de la insulina con ¹²⁵I (Pause, E., Bormer, O. y Nustad, K. Radioiodination of proteins with the iodogen method, in RIA and related procedures in medicine, international atomic agency, Viena, 161-171 (1982)). El montaje supramolecular de insulina formado a partir de insulina marcada tenía una actividad específica de 49.912 CPM/ml/µg. Se inyectaron 50 µl de montaje supramolecular de insulina (4991200 CPM) ya sea por vía subcutánea o por vía intramuscular y se controló la glucemia y se recogieron muestras de suero a los 0, 30 min, 1 h, 4 h, 10 h, 24 h, después una vez al día, y luego en días alternos o una vez a la semana. Se midieron los recuentos en por ml de suero (Fig. 14a). Como se muestra en la figura 14b, el perfil de glucosa en sangre fue el mismo que el observado con el SIAII sin marcar. Las CPM/ml calculadas se mantuvo casi constantes (Fig. 14a) cuando se representan frente al número de días de tratamiento. Sin embargo, hubo un alto recuento inicial en 30 minutos-4 horas, que luego se redujo gradualmente a un nivel constante de 2000-3000 en 10 h. La cantidad de insulina liberada en la sangre se calculó y estaba comprendida en el intervalo de 0,5-1,2 ng/ml, lo que corresponde al nivel basal o ligeramente por encima del basal de la insulina sérica como se ha observado con ELISA (Fig. 14b). Para demostrar además que la insulina liberada del montaje supramolecular de insulina es monomérica, suero de diferentes puntos de tiempo se resolvieron en tricina-SDS-PAGE (Schaögger, H. y Von Jagow, G. Se desarrolló la electroforesis en gel de Tricina-dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida para la separación de proteínas en el intervalo de 1 a 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379 (1987)) y radiograma utilizando el phosphor imager. Como se muestra en la figura 15, la banda en suero corresponde al monómero de insulina libre y su intensidad se mantuvo constante durante un largo período cuando se cargó la misma cantidad de suero. Se observó una disminución de la intensidad después de 20 días presentando utilización y disminución del medicamento de liberación lenta del montaje supramolecular de insulina durante un período de tiempo junto con algún efecto de la desintegración del propio radio marcado.

Ejemplo 14

Pinzamiento hiperglucémico después del tratamiento con montaje supramolecular II de insulina

Se anestesiaron ratas Wistar macho (isoflurano al 2%) y se instaló un catéter de carótida y yugular para permitir la extracción de sangre e inyecciones de glucosa (solución de glucosa al 20%) para fijar la glucemia en 600 mg/dl. Después de un período de 12 horas en ayunas, la glucosa se infundió en todos los grupos para volverles hiperglucémicos. Esto fue seguido de extracción sanguínea a intervalos de tiempo indicados, para las mediciones de glucosa en la sangre y se calcularon las cantidades de infusión de glucosa para mantenerles hiperglucémicos. Este procedimiento se repitió después de uno y tres meses de administración SIA II (Fig. 16 a-c).

Ejemplo 15

Aislamiento y cultivo primario de adipocitos de rata

Se aislaron adipocitos de rata y se cultivaron según el método descrito por Björntorp *et al.* (Björntorp, P., Karlsson, M., Pettersson, P. y Sypniewska, G. Differentiation and function of rat adipocyte precursor cells in primary culture. *J. Lipid Res.* 21, 714-723 (1987)). Se sacrificaron ratas Wistar macho alimentadas libremente y se disecó el tejido adiposo del epidídimo y se recogió en reactivo A (HBSS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 50 µg/l de gentamicina). El tejido se lavó apropiadamente en HBSS. Después de esto el tejido se cortó y picó finamente y se transfiere a un tubo Falcon, se centrifugó a 200g durante 2 min. Se retiró la capa de aceite transparente y la capa de adipocitos (gruesa y densa) se añadió a tres veces el volumen de reactivo B (reactivo A que contiene 0,1% de BSA y 1 mg/ml de colagenasa) en un matraz. El matraz se incubó a 37°C durante 60 min con agitación lenta continua. La reacción se interrumpió por adición de medio completo DMEM (con HEPES 15 mM, glc, 0,1% de BSA, adenosina 50 nM y 1% de suero bovino fetal) tres veces el volumen y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La reacción se transfirió a un tubo Falcon y se centrifugó a 200g durante 10 min. Se recogieron los adipocitos después de descartar la capa superior de aceite y se lavaron dos veces con el reactivo A por centrifugación a 200g durante 10 min. Las células se repartieron en un matraz con el volumen apropiado de medio DMEM completo y se incubaron durante 24 h a 37°C. Para la señalización de la insulina, los adipocitos se centrifugaron y se mantuvieron en medio exento de suero durante 12 h antes de la colocación en placas de aproximadamente 2 ml en placas de cultivo de 6 pocillos, y se incubaron más durante 2 horas.

Ejemplo 16

Análisis de inmunotransferencia Western de lisados celulares totales

Se incubaron células sembradas en placa ya sea con insulina 20 nM, 50 µl de montaje supramolecular de insulina e insulina liberada *in vitro* (monómeros) o 50 µl de suero de ratas tratadas con insulina, montaje supramolecular de insulina y PBS durante 10 min. Después de la incubación, las células se recogieron en un tubo Falcon y se centrifugaron a 200g durante 10 min. La capa superior de adipocitos se recogió en un eppendorf y se mantuvo en hielo. Se añadieron 500 µl de tampón de lisis (Tris 20 mM pH 8,0, 1% de NP 40, NaCl 137 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, DTT 1 mM, glicerol al 10%, PMSF 1 mM, ortovanadato de sodio 0,4 mM y mezcla inhibidora de proteasas) y las muestras se congelaron a -80°C, durante 2 horas. Esto fue seguido de descongelación e incubación a 4°C durante 4 h con rotación constante. Se recogió el sobrenadante después de centrifugación a 13.000 rpm durante 30 min y se estimó la concentración de proteína en lisado celular utilizando el reactivo de Bradford. Cincuenta microgramos de proteína celular total se aplicaron a cada carril y se separaron sobre 10% de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando un aparato de transferencia en húmedo de Bio-Rad a 4°C durante la noche. Después de la transferencia, la inmunotransferencia se retiró y se tiñó con Ponceau-S para la visualización de las bandas transferidos, y se destiñó además con agua. La membrana se bloqueó durante 1 hora a 37°C con 5% de leche desnatada en PBS, pH 7,4, se lavó y después se incubó durante la noche en anticuerpo primario (dilución 1:1000 utilizando 1% de leche desnatada en PBS) de PI3K, p-Akt, Akt total, p-GSK3β, GSK3β, ERK1/2, GAPDH y β actina (anticuerpos de señalización celular) a 4°C. Después de lavar con PBST, la transferencia se incubó durante 1 h en anticuerpo secundario respectivo (conjugado con HRP) y las bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando el protocolo ECL de inmunotransferencia Western (Amersham). La figura 17 proporciona análisis de inmunotransferencia Western (por sus siglas en inglés, WB) de adipocitos cultivados para la cascada de señalización de la insulina. Los adipocitos tratados con (a) PBS, insulina, SIA-II, insulina liberada de SIA-II, (b) suero tal como se indica, y se analiza para la señalización de la insulina.

Ejemplo 17

Histología e inmunohistoquímica

Se inyectaron ratas con 200 µg de insulina SIA-II o 150 g de lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) bien por inyecciones intramusculares o subcutáneas en el músculo del muslo y en la piel del dorso respectivamente. Las ratas inyectadas con LPS se sacrificaron a las 48 h de la inyección mientras que las ratas inyectadas con insulina SIA-II se controlaron de la 1 a la 12 semana y las secciones de tejido se escindieron a un intervalo de cada 7 días. Se anestesiaron las ratas con cetamina y se perfundieron con paraformaldehído al 4%. Se retiraron los músculos de la piel y del muslo y se extirpó el punto de inyección. Se procesaron los tejidos a continuación para su incorporación en parafina y se seccionaron longitudinalmente a un espesor de 10 µm y se procesaron posteriormente para la tinción con hematoxilina-eosina (H & E) de rutina para ver la histología y la infiltración de las células inflamatorias, tinción con rojo Congo (Lee, G. y Luna, H. T. Manual of Histologic staining

methods of armed forces institute of pathology. 3^a ed. McGraw-Hill book company (1960)) para detectar la presencia de SIA-II residual e Inmunohistochemistry (Sanz M. J., Marinova-Mutafchiev L., Green P., Lobb R. R., y Feldmann M., Nourshargh S. IL-4-induced eosinophil accumulation in rat skin is dependent on endogenous TNF-alpha and alpha 4 integrin/VCAM-1 adhesion pathways. J. Immunol. 160, 5637-5645 (1998)) con anticuerpos contra CD11b, RT-1A y CD6 (BD Pharmingen, CA, EE.UU.). Todas las extensiones inmunofluorescentes se montaron permanentemente con el reactivo Antifade + medio de montaje (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.) y se observaron a la luz fluorescente de anticuerpos conjugados con FITC. Extensiones teñidas con CR y H & E se montaron con medio Citramount (Polysciences, PA, EE.UU.). Se observaron secciones H & E a la luz brillante, en tanto que, las extensiones teñidas con CR a las luces brillante y polarizada (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Japón). Las imágenes fueron tomadas utilizando la cámara DS SMC CCD (Nikon, Japón) y se analizaron por el programa informático NIS-Element (Nikon, Japón).

Ejemplo 18

Modelo de aloxano para la provocación de diabetes en ratas

Ratas macho Wistar que pesan 250-300 g se dividieron en cuatro grupos y se hizo una estimación de la glucemia se realizó utilizando tiras de glucosa Accu Check de Roche. Las ratas se mantuvieron en ayunas durante 24 horas. Se administraron por vía intraperitoneal a 10-20 ratas 150mg/kg en peso de Aloxano recién preparado en tampón de citrato (pH 4,5). El alimento se proporcionó inmediatamente y se comprobó la glucemia a los tres días. Los animales se agruparon según su glucemia (grupo I: 250-350 mg/dl, grupo II: 350-450 mg/dl y grupo III: > 450 mg/dl). Se mantuvo la glucemia alta durante una semana con 2-6 U/kg de peso corporal (en peso) de insulina bovina. El 60% de las ratas tratadas con Aloxano desarrolló hiperglucemia (glucemia > 250 mg/dl), 5 días después de la inyección, y sus concentraciones de insulina sérica se analizaron cuantitativamente utilizando el ensayo inmunosorbente con enzima ligada de insulina de rata sólida (ELISA) (Mercodia). Las ratas con > 250 mg/dl de glucosa y concentraciones de insulina sérica insignificantes (~ 0,18 ng/ml) se consideraron diabéticos y se utilizaron para el experimento.

Ejemplo 19

Ejemplos de parámetros clínicos examinados

Se realizaron ensayos bioquímicos para la evaluación de la toxicidad del tratamiento con montaje supramolecular de insulina. La glutamato oxalo-acetato transaminasa sérica (SGOT), la glutamato piruvato transaminasa sérica (SGPT), la bilirrubina total, la bilirrubina, la fosfatasa alcalina, las proteínas séricas totales, la albúmina sérica, la globulina sérica, la relación A/G sérica, pruebas de la función renal (KFT), la formación de cataratas, el peso del tejido adiposo, el peso corporal y el aspecto se estimaron utilizando kits de ensayo disponibles en Merck India Ltd. La Tabla 1 proporciona el análisis de los parámetros clínicos para la evaluación de la toxicidad de la insulina SIA II. Se aisló suero de muestras de sangre recogidas al final de los tres meses de estudio y se sometió a diversas pruebas que se indican en la Tabla. Los resultados son la media $\pm$ d.e. de tres experimentos diferentes con n = 4 animales en cada grupo.

Ejemplo 20

Detección de anticuerpos anti-insulina y enzima degradante de insulina (EDI) en el suero

Se realizó ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti-insulina en el suero de rata siguiendo el protocolo convencional de ELISA. El ELISA indirecto se realizó para la detección de anticuerpos anti-insulina sérica en el suero de rata siguiendo el protocolo convencional de ELISA. En resumen, 200 μ l de 2mg/ml de insulina bovina en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,6, se recubrieron sobre una placa de ELISA de 96 pocillos y se mantuvieron durante la noche a 4°C. Se utilizó BSA al 5% en PBS para bloquear a 37°C durante 1 hora. A continuación, la placa se lavó con PBST (Tween 20 al 0,02%) y se añadieron 20031 de suero diluido 1:100 y se mantuvo a 37°C durante 1 h. Más rondas de lavado con PBST fueron seguidas de la adición de 2° anticuerpo conjugado con anti-IgG-HRP de rata diluido a 1:10000 y se incubaron durante 2 horas, 37°C. Se desarrolló el color utilizando TMB como sustrato y la reacción se interrumpió mediante la adición de H₂SO₄ conc. La placa se leyó a 450 nm por espectrofotometría. Se utilizó anticuerpo anti-insulina como referencia positiva de la reacción. Se analizó cuantitativamente EDI del suero utilizando el kit Insulysin/EDI InnoZyme™ Immunocapture Activity Assay Kit de (Calbiochem) siguiendo el protocolo del fabricante. EDI de rata proporcionado en el kit sirvió como referencia positiva.

Ensayos de proliferación celular

Se sembraron células en placas de 24 pocillos con 10.000 células/pocillo en medio DMEM regular que contenía 10% de FBS. Las células se cambiaron a medio sin suero durante 12 h y a continuación se trataron como se indica en las leyendas de la Fig. 25. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Se midió el crecimiento a los 3 días del tratamiento. El crecimiento se ensayó por el ensayo MTT. Se añadieron un total de 50 μ l de 5 mg/ml de solución MTT en PBS a cada pocillo. Después de la incubación durante 4 h a 37°C, cristales de formazán se lisaron con 500 μ l de solución de disolución (20% de SDS, 50% de DMSO). Se midió la absorbancia con un lector de placas a 570

nm utilizando un filtro diferencial de 670-nm.

Ejemplo 21

Modelo de estreptozotocina para provocación de diabetes en ratones

- 5 Se utilizaron ratones macho C57BL/6 endogámicos de 12 a 16 semanas de edad. Los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con 50 mg/kg de estreptozotocina en peso al día durante 5 días. La glucemia se estimó a las dos semanas. Los ratones con > 300 mg/dl de glucemia se consideraron diabéticos y se seleccionaron para otros experimentos. Se hicieron un total de seis grupos, consistiendo cada grupo en seis ratones. Varias dosis, tales como 10 µl, 25 µl, 50 µl y 100 µl de insulina bovina/humana SIA-II se administraron por vía subcutánea o por vía intramuscular a ratones vueltos diabéticos utilizando estreptozotocina, sirviendo los otros dos grupos como grupo diabético y no diabético. Se controló la glucemia en ayunas y con alimentación utilizando las tiras de glucosa Accu Check de Roche.

Ejemplo 22

Modelo de estreptozotocina para la provocación de diabetes en conejo

- 15 Se utilizaron conejos macho de Nueva Zelanda, con un peso entre 1.000 y 1.200 g. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de humedad, temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y ciclo de luz y oscuridad de 12 h. El protocolo experimental y manejo de los animales estaban de acuerdo con el Comité Institucional de Ética Animal del Instituto Nacional de Inmunología, Nueva Delhi, India. Para la provocación de la diabetes experimental, los conejos utilizados se mantuvieron en ayunas durante 12 h, seguido de la administración de 80 mg/kg de estreptozotocina en peso, preparado en tampón de citrato, pH 4,5. Las glucemias se revisaron a los tres días. Los conejos que presentan BGL > 450 mg/dl se denominaron diabéticos y se siguieron dividiendo en tres grupos de tres conejos cada uno. Grupo I - conejos sanos normales, grupo II - diabéticos tratados con insulina, grupo III - diabéticos tratados con SIA-II (SC) y grupo IV - diabéticos tratados con PBS.

Ejemplo 23

Modelo para la provocación de la diabetes tipo II en ratas Wistar y su tratamiento utilizando SIA

- 25 Ratras Wistar macho, de 7 semanas de edad, y un peso aproximado de 200 g, se utilizaron para todos los estudios. Los animales se alimentaron con una dieta de pienso normal que consiste en (como porcentaje de kcal totales) 12% de grasas, 60% de carbohidratos, y 28% de proteínas o una dieta alta en grasas que consiste en 40% de grasa, 41% de carbohidratos y 18% de proteínas. Después de 2 semanas en cualquiera de las dietas, los animales (a excepción de las referencias no inyectadas) después de una noche en ayunas se inyectaron con STZ (50 mg/kg) en la vena de la cola mediante una sonda permanente del calibre 24 temporal. Los animales tuvieron acceso libre a comida y agua después de la inyección de STZ, y tanto los animales inyectados con STZ como los no inyectados continuaron con sus dietas originales (comida o grasa) durante todo el estudio. A los animales con glucemia alta se les administró bien PBS como vehículo, insulina SIA, o insulina SIA con exendina 4a por vía subcutánea. Se extrajo sangre, se separó el suero por centrifugación y se analizaron las concentraciones de glucosa (tiras de glucosa, Accucheck, Roche), insulina (kit Elisa para insulina, Mercodia), triglicéridos (TG) (glicerol fosfato oxidasa [GPO]-método Trinder, Sigma) y ácidos grasos libres (método acil coenzima A sintetasa [ACS-ACOD], Wako Diagnostics, Richmond, VA).

Diabetes tipo II: modelo Db/db

- 40 Ratones Db/db con antecedentes de C57BL/6 se alimentaron a discreción con una dieta normal y se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Se extrajeron muestras de sangre mediante sangrados en la cola del ratón, y se determinaron las concentraciones de glucosa circulante usando un glucómetro (tiras de glucosa Accucheck de Roche). Se determinaron las concentraciones de insulina sérica de las muestras de suero utilizando un kit de ensayo inmunosorbente con enzima ligada de insulina (Mercordia). Se realizaron la glucemia en ayunas y glucosa alimentada al azar por la mañana en días alternos.

Ejemplo 24

Seguimiento de la hormona contrarreguladora de insulina

- 50 Se siguió el procedimiento de pinzamiento glucémico hiperinsulinémico para proporcionar un estímulo hipoglucémico fijo a las ratas. Se cateterizaron los animales como se describió anteriormente. Se dejaron en ayunas ratas conscientes y no estresadas durante 12 a 14 horas antes del comienzo del experimento. La infusión constante de insulina de 30 mU/kg.min comenzó junto con una infusión variable de glucosa exógena, que se ajustó basándose en la determinación de la glucemia obtenida a intervalos de 10 min para conseguir la concentración de glucosa deseada. Durante los primeros 90 min del experimento, las ratas se llevaron a euglucemia, ~ 110 mg/dl. Después, la glucemia se redujo a ~ 50 mg/dl (hipoglucemia provocada por infusión de insulina) y se mantuvo durante los 90 min siguientes. Los experimento se terminaban si las concentraciones de glucosa descendían por debajo de 80

mg/dl y 40 mg/dl durante la fases euglucémica y la hipoglucémica, respectivamente. Se extrajeron muestras de sangre para la determinación de glucagón y epinefrina en diversos intervalos de tiempo, como se indica en la figura 29.

Ejemplo 25

5 Resistencia a las proteasas

A 20 µl de 2 mg/ml de insulina rH, SIA-I, SIA-II Y SIA-III, se añadió una dilución 1:5, 1:10 y 1:50 de 2 mg/ml de tripsina y una dilución 1:1000, 1:2000 y 1:5000 de 2 mg/ml de proteinasa K. La mezcla de reacción se incubó durante 12 h a 37°C en una incubadora. La muestras se cargaron en 20% de SDS-PAGE y se analizaron utilizando tinción de Coomassie.

10 Tabla 1: Análisis de los parámetros clínicos para la evaluación de la toxicidad del montaje supramolecular II de insulina (SIA II)

Parámetros estimados	Ratas normales	Tratadas con SIA II	Inyección única de insulina diaria	Inyección de insulina dos veces al día
LFT				
Bilirrubina (Total) (mg/dl)	0,35 ± 0,03	0,35 ± 0,06	0,40 ± 0,08*	0,35 ± 0,1
Bilirrubina (Directa) (mg/dl)	0,108 ± 0,02	0,1 ± 0,03	0,36 ± 0,08*	0,25 ± 0,06*
SGOT (U/l)	222,8 ± 79	219,8 ± 61	355 ± 83*	300 ± 56*
SGPT (U/l)	74,8 ± 17	77 ± 21	86 ± 36	85 ± 15
Fosfatasa alcalina (U/l)	343,2 ± 76,8	431 ± 70,3	777,8 ± 89,4*	489 ± 65
Proteínas séricas totales (g/dl)	3,92 ± 0,095	6,14 ± 0,3	6,70 ± 0,21*	5,55 ± 0,25*
Albumina sérica (g/dl)	1,77 ± 0,11	1,85 ± 0,13	2,5 ± 0,21	3,2 ± 0,19
Globulina sérica (g/dl)	2,15 ± 0,08	2,64 ± 0,12	4,2 ± 0,18	3,35 ± 0,15
Relación A/G sérica	0,823	1,3	0,595	0,955
KFT				
Urea (mg/dl)	47,68 ± 10,8	50,9 ± 7,6	58,3 ± 9,2	60,1 ± 12,36
Creatinina sérica (g/dl)	0,80 ± 0,06	0,83 ± 0,02	1,01 ± 0,30	0,88 ± 0,21
Ácido úrico	2,39 ± 0,12	2,26 ± 0,08	3,0 ± 0,81	3,1 ± 0,56
Electrolitos	140 ± 11	144 ± 10	200 ± 26	198 ± 45,5
Sodio (meq/l)	4,5 ± 1,01	4,4 ± 1,1	6,5 ± 1,3	6,2 ± 0,95
Fósforo (meq/l)	102,8 ± 12	101 ± 17	165 ± 23	119 ± 26
Cloruro (meq/l)				
Formación de cataratas	(-)	(-)	(+)	(+)
Tejido adiposo	Normal	Normal	Reducido	Reducido
Peso corporal y aspecto	(+++)	(+++)	(+)	(++)

Tabla 2: Efectos de los tratamientos en los parámetros biológicos de la sangre en ratas diabéticas alimentadas con grasa/estreptozotocina

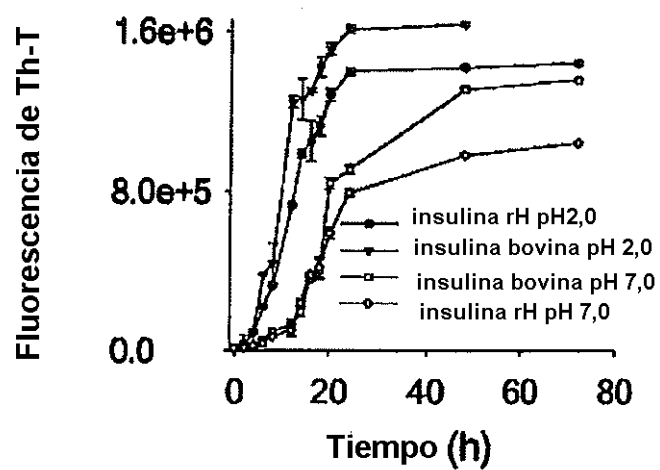
Grupo	1 semana						2 semanas						3 semanas						4 semanas					
	BGL (mg/dl)	Insulina de rata (μ U/ml)	FFA (mmol/l)	TG (mmol/l)	BW		BGL (mg/dl)	Insulina de rata (μ U/ml)	FFA (mmol/l)	TG (mmol/l)	BW		BGL (mg/dl)	Insulina de rata (μ U/ml)	FFA (mmol/l)	TG (mmol/l)	BW		BGL (mg/dl)	Insulina de rata (μ U/ml)	FFA (mmol/l)	TG (mmol/l)	BW	
Referencia	107	20,5 $\pm$ 1,95	0,87 $\pm$ 0,10	0,48 $\pm$ 0,17	25	3	98	19,5 $\pm$ 1,5	0,89 $\pm$ 0,10	0,49 $\pm$ 0,17	260		100	20,1 $\pm$ 0,95	0,86 $\pm$ 0,10	0,51 $\pm$ 0,17	265		98	20,5 $\pm$ 1,95	0,9 $\pm$ 0,10	0,47 $\pm$ 0,17	276	
Referencia ST/alimentada con grasa	477	39,48 $\pm$ 6,72	2,45 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,04	26	5	480	35,38 $\pm$ 10,18	2,55 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,04	271		506	39,55 $\pm$ 6,3	2,56 $\pm$ 0,07	0,91 $\pm$ 0,04	256		511	40,15 $\pm$ 1,35	2,59 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,04	250	
Alimentada con grasa/ST + insulina	420	37,09 $\pm$ 4,7	1,9 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,05	26	1	401	37,09 $\pm$ 4,7	2,1 $\pm$ 0,08	0,75 $\pm$ 0,05	263		390	37,09 $\pm$ 4,7	1,8 $\pm$ 0,08	0,73 $\pm$ 0,05	269		396	37,09 $\pm$ 4,7	2,1 $\pm$ 0,08	0,76 $\pm$ 0,05	272	
Alimentada con grasa/STZ + insulina SL	180	34,83 $\pm$ 5,96	1,1 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,12	26	4	158	36,96 $\pm$ 5,04	1,0 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,12	268		149	36,96 $\pm$ 5,04	0,9 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,12	272		163	22,42 $\pm$ 8,70	1,1 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,12	276	
Alimentada con grasa/STZ + Exendina-4 SA	157	31,58 $\pm$ 6,75	0,91 $\pm$ 0,11	0,51 $\pm$ 0,13	25	2	121	21,58 $\pm$ 6,75	0,88 $\pm$ 0,11	0,50 $\pm$ 0,13	259		119	19,40 $\pm$ 4,86	0,87 $\pm$ 0,11	0,48 $\pm$ 0,13	265		158	23,40 $\pm$ 4,86	0,98 $\pm$ 0,11	0,65 $\pm$ 0,13	272	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un montaje supramolecular de insulina (SIA) para su utilización en el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones, comprendiendo dicho montaje una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina como SIA I, SIA II, SIA III o combinación de las mismas, en la que SIA I consiste en grupos alargados con disposición parecida a una perla del monómero de insulina, SIA II consiste en una asociación lineal de grupos alargados con disposición parecida a una perla de los monómeros de insulina y SIA III consiste en aproximadamente el 90% de SIA-II y una asociación densa, lineal de oligómeros de insulina.
- 10 2. El montaje supramolecular de insulina (SIA) para su utilización según la reivindicación 1, en el que dicha insulina es insulina humana recombinante, insulina bovina o porcina o mutantes/análogos de insulina.
3. El montaje supramolecular de insulina (SIA) para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho montaje libera insulina a un ritmo que va de 0,1 a 5,4 ng/ml, durante aproximadamente 7 a 180 días, *in vivo*.
- 15 4. El montaje supramolecular de insulina (SIA) para su utilización según la reivindicación 1, en el que dicho montaje comprende SIA I y libera insulina a un ritmo que va de 4 a 5,4 ng/ml, durante al menos 7 a 10 días.
5. El montaje supramolecular de insulina (SIA) para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho montaje comprende SIA II y libera insulina a un ritmo que va de 0,5 a 1,8 ng/ml, durante al menos 160 días.
- 20 6. El montaje supramolecular de insulina (SIA) para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho montaje comprende SIA III y libera insulina a un ritmo que va de 0,1 a 0,7 ng/ml, durante al menos 180 días.
7. El montaje supramolecular de insulina (SIA) para su utilización según la reivindicación 1, en el que dicho montaje comprende SIA II y en la administración a pacientes diabéticos mantiene el nivel casi normoglucémico (120 ± 30 mg/dl) durante al menos 160 días en un paciente que lo necesita.
- 25 8. El montaje supramolecular de insulina (SIA) para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que una sola dosis de dicho montaje en la administración mantiene un nivel casi normoglucémico (120 ± 30 mg/dl) durante al menos 7 a 180 días en un paciente que lo necesita, en el que la concentración de dicho montaje en dicha dosis está comprendida en el intervalo de 0,125 a 3,75 mg/kg de peso corporal; o
- 30 en el que una sola dosis de dicho montaje en la administración mantiene un nivel casi normoglucémico (120 ± 30 mg/dl) durante al menos 160 días en un paciente que lo necesita, en el que la concentración de dicho montaje en dicha dosis está comprendida en el intervalo de 0,75 a 1,25 mg/kg de peso corporal.
9. El montaje supramolecular de insulina (SIA) para su utilización según la reivindicación 1, que es un profármaco no citotóxico, no inmunógeno, no apoptótico y no mitógeno.
- 35 10. Una composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento de trastornos metabólicos seleccionados del grupo que consiste en diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 y sus complicaciones, comprendiendo dicha composición una cantidad terapéuticamente eficaz del montaje supramolecular de insulina (SIA) definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. La composición farmacéutica para su utilización según la reivindicación 10, que comprende además excipientes, aditivos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 40 12. La composición farmacéutica para su utilización según la reivindicación 10 u 11, en el que la composición farmacéutica se administra por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea, y/o en la que la composición farmacéutica se administra mediante un dispositivo capaz de liberar dicha composición, seleccionándose dicho dispositivo de un grupo que consiste en bombas, catéteres, parches e implantes.
- 45 13. Un procedimiento para la preparación del montaje supramolecular de insulina (SIA) definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicho procedimiento:
 - (a) disolver insulina a una temperatura de aproximadamente 25 a 60°C, preferentemente a 37°C, en una solución que tiene un pH comprendido en el intervalo de 1,5 a 7,8, preferentemente 6,8 a 7,8, aún más preferentemente 7,2; y
 - 50 (b) incubar la anterior durante un periodo de 6 a 48 horas, preferentemente de 8 a 12 horas, aún más preferentemente 10 horas, con agitación constante para obtener un montaje supramolecular de insulina (SIA), en el que SIA comprende una forma oligomérica insoluble y agregada de insulina.
14. El procedimiento según la reivindicación 13, que comprende además:

- (c) lavar dicho SIA con PBS; y
- (d) volver a poner en suspensión dicho SIA en PBS.

5 15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, la solución se selecciona de ácido clorhídrico o acético en agua que tiene el pH en el intervalo de aproximadamente 1,5 a 2,5; tampón de acetato sódico que tiene el pH en el intervalo de aproximadamente 3,5 a 5,5; tampón de fosfato (PBS) que tiene el pH 6 a 7,5 y tampón de citrato que tiene el pH en el intervalo de aproximadamente 4 a 6.



Cinética de formación de fibrillas

Figura 1

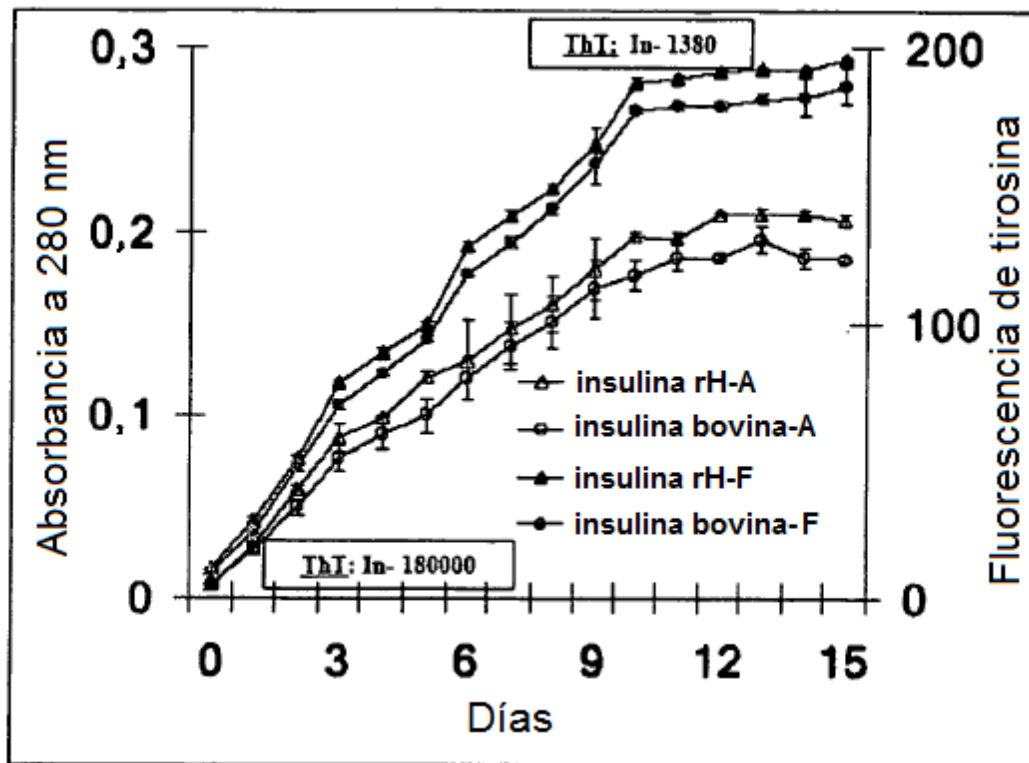


Figura 2a

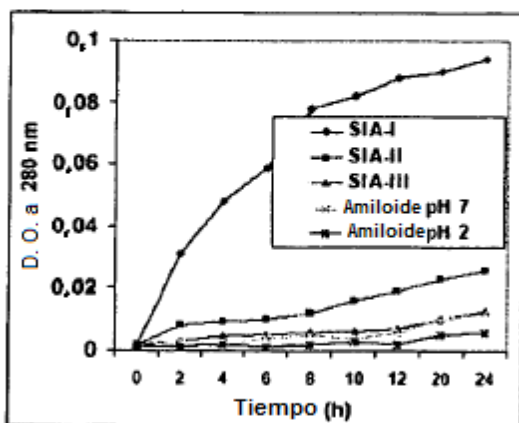


Figura 2b

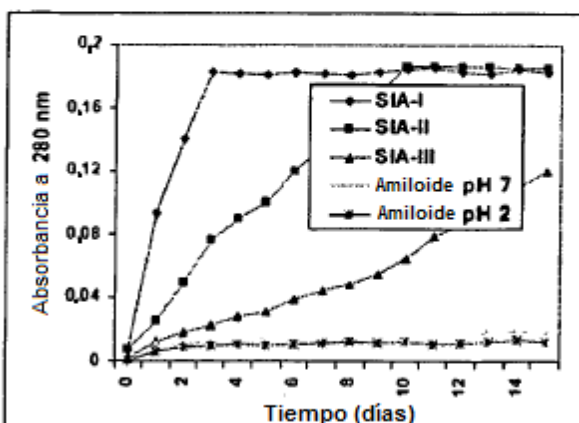


Figura 2c

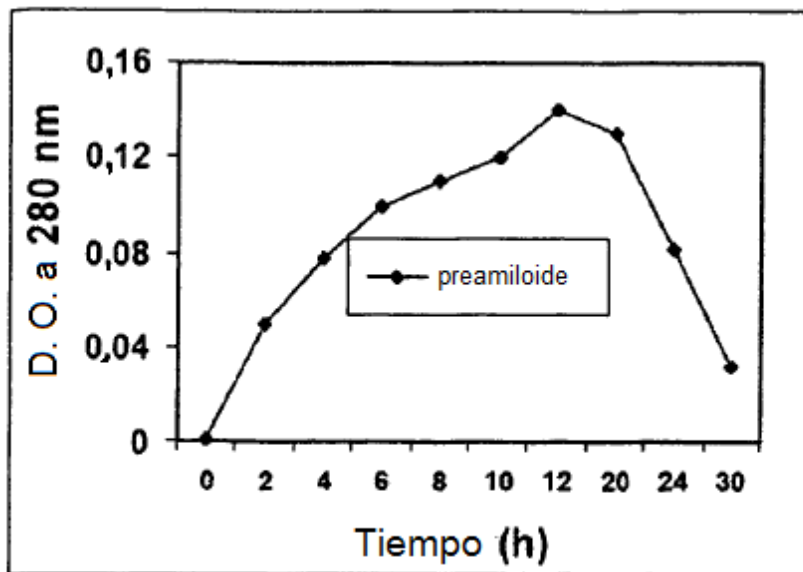


Figura 2d

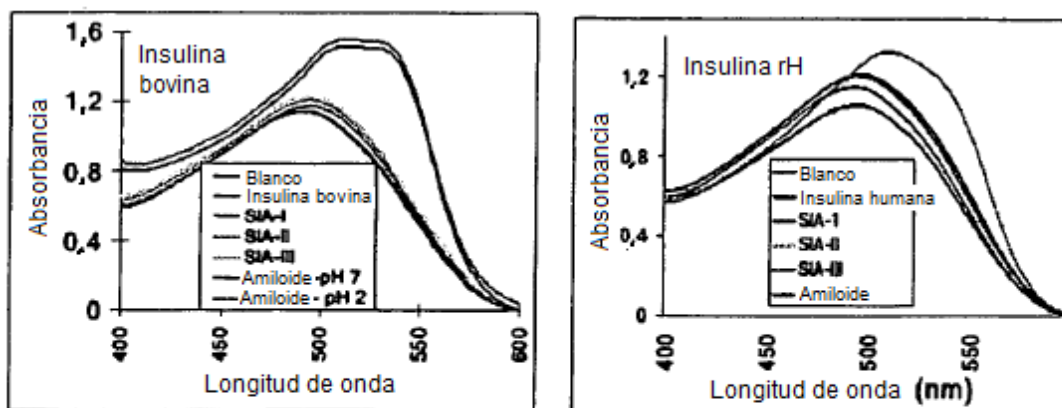


Figura 3

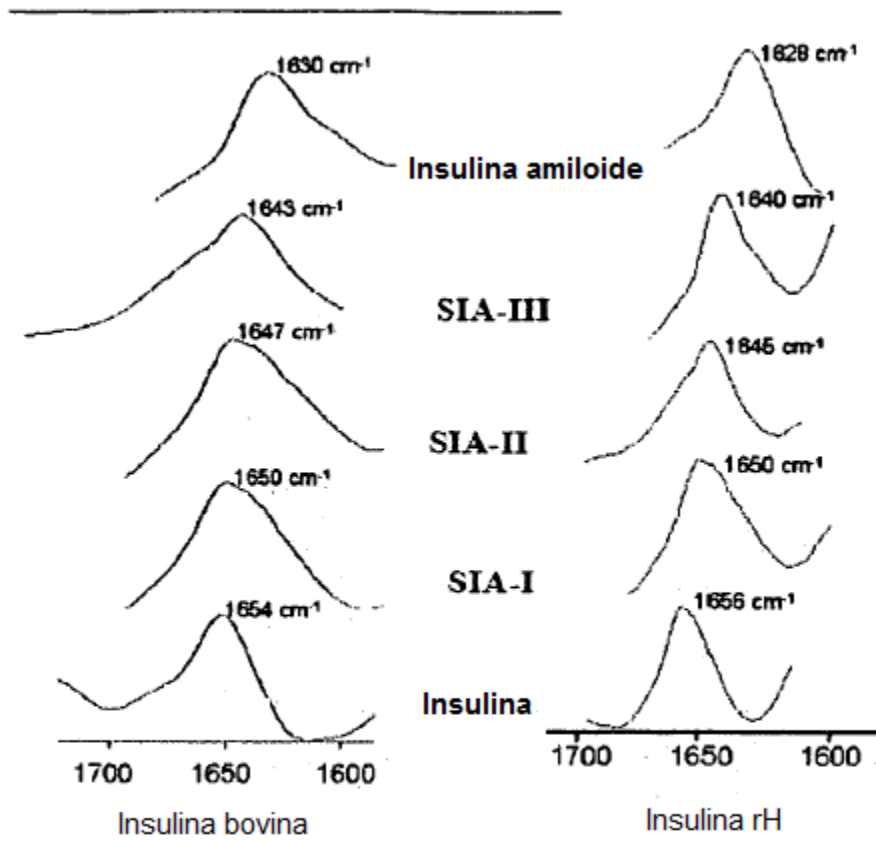


Figura 4

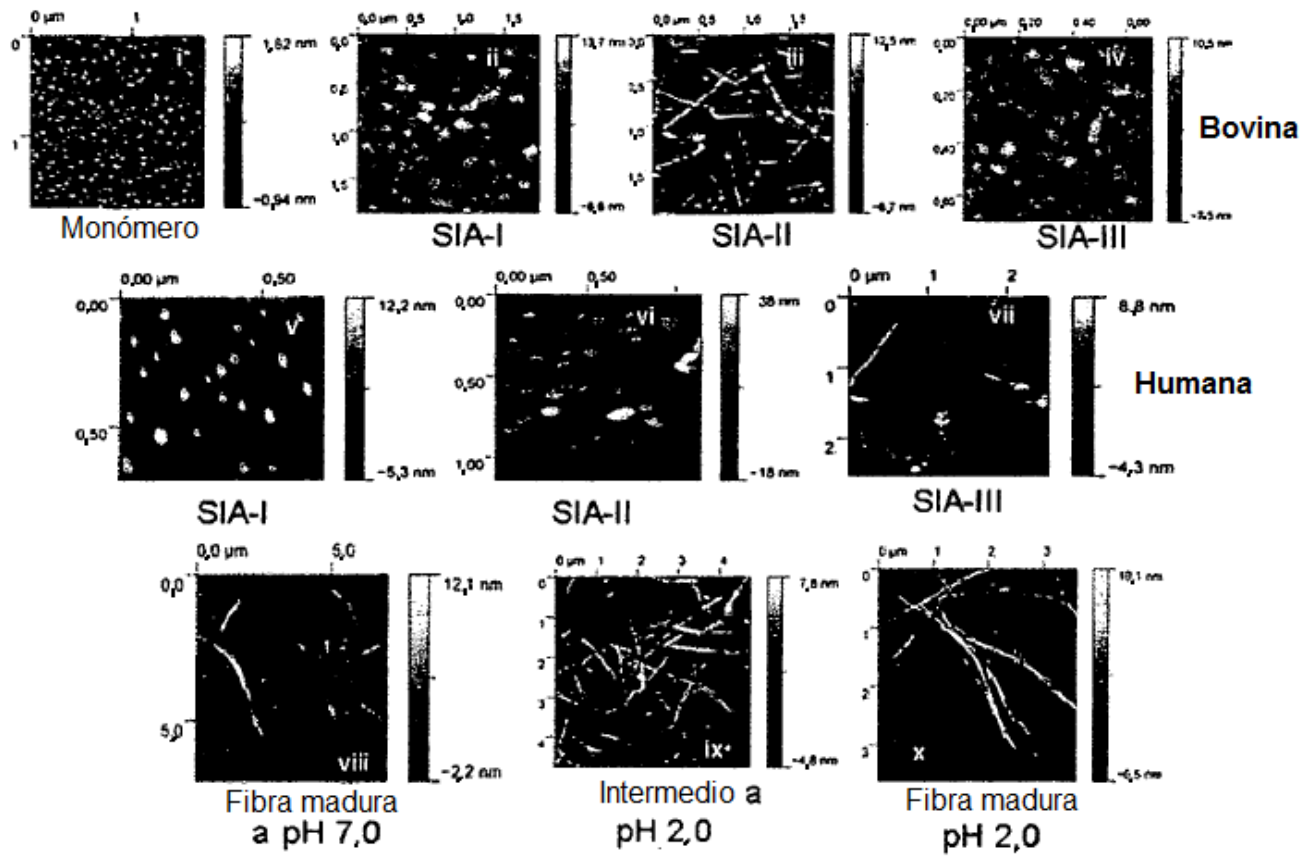
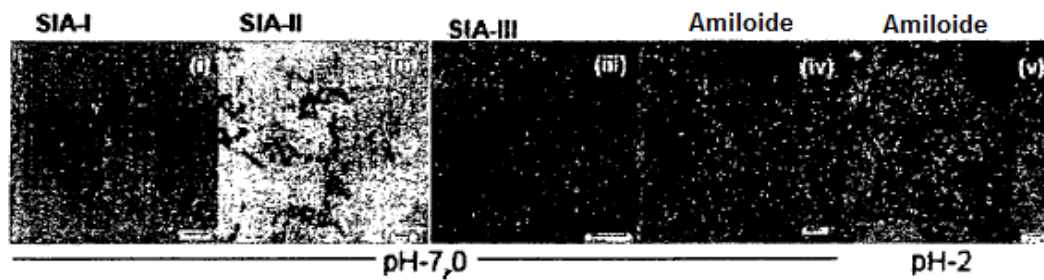


Figura 5



Microfotografías de MET

Figura 6

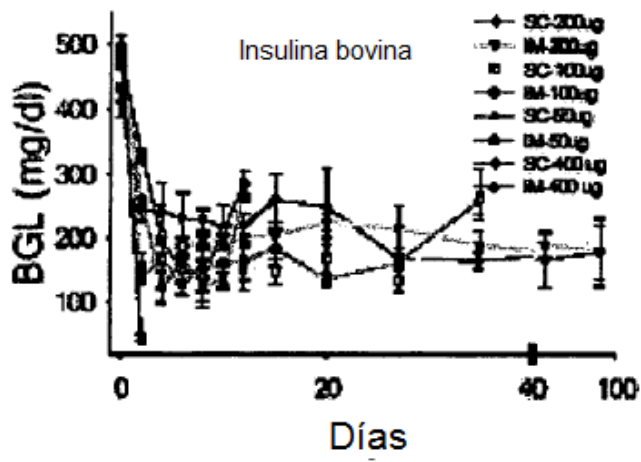


Figura 7a

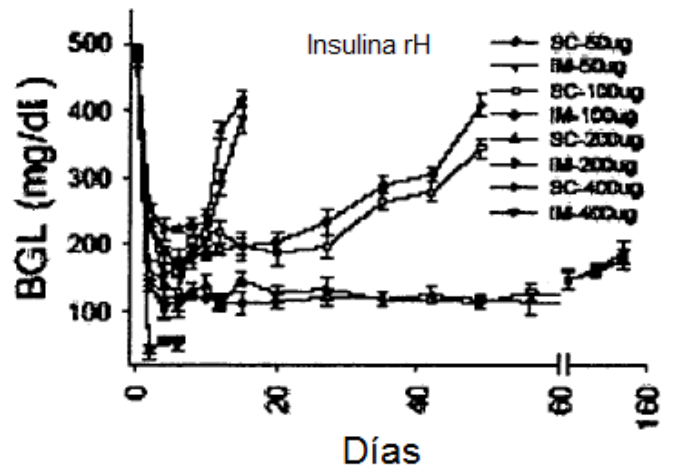


Figura 7b

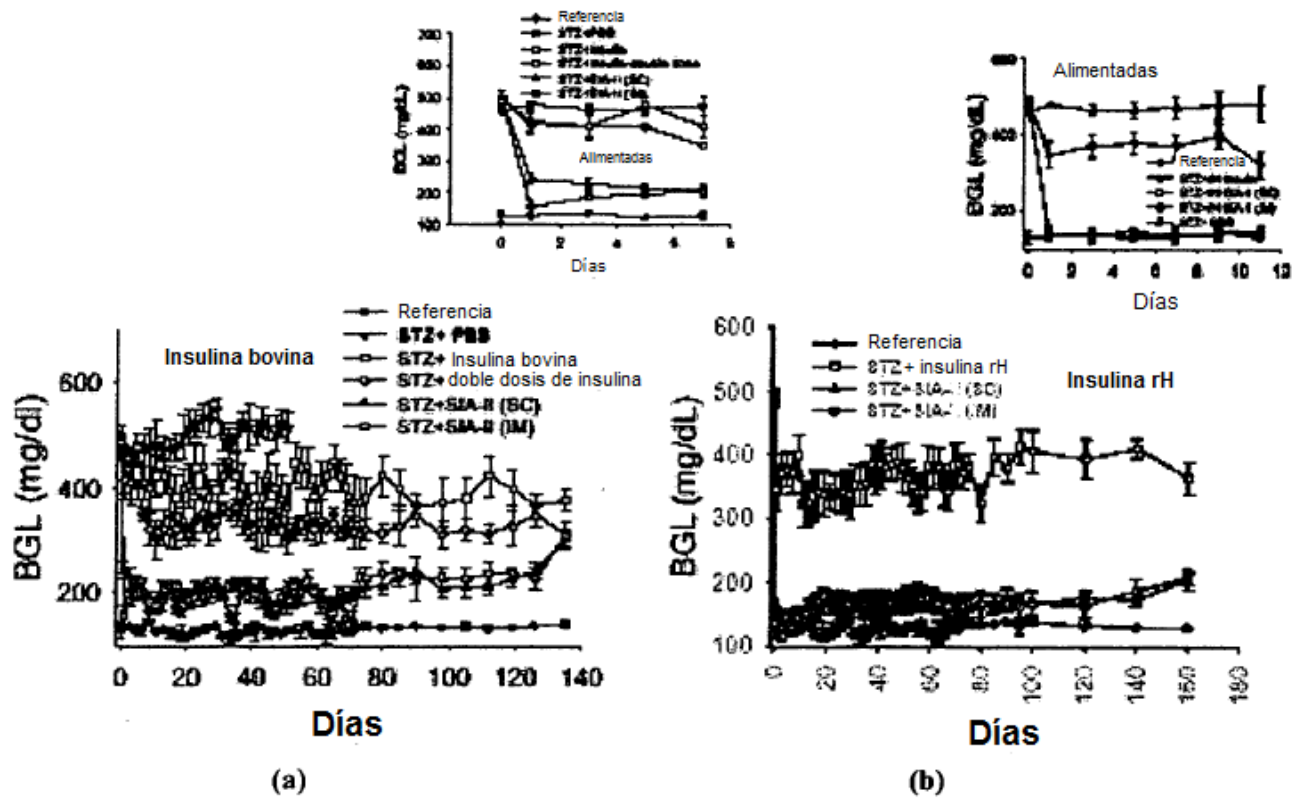


Figura 8

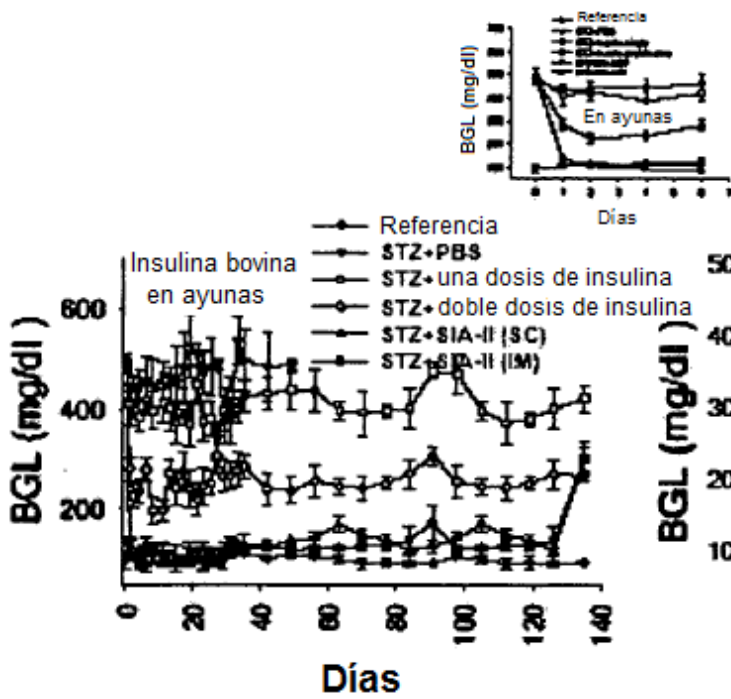


Figura 9a

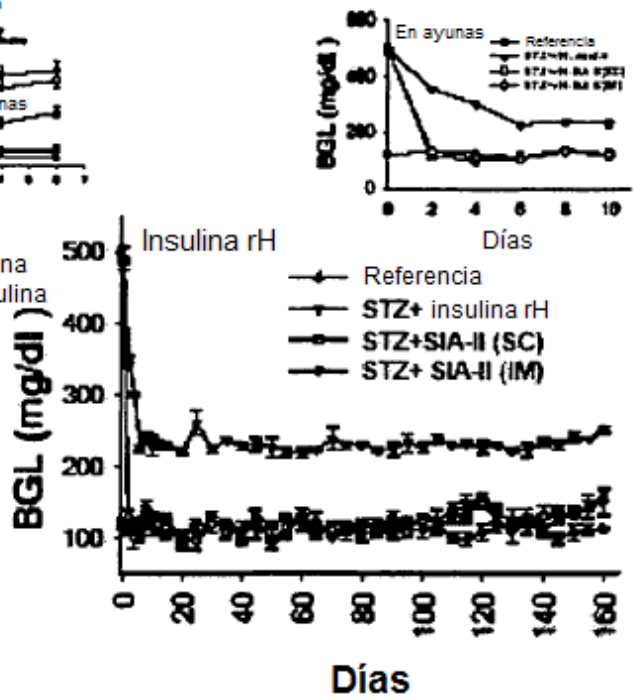


Figura 9b

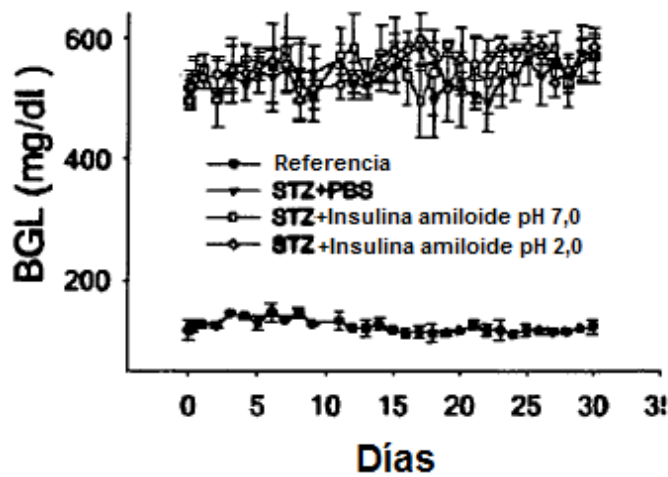


Figura 10

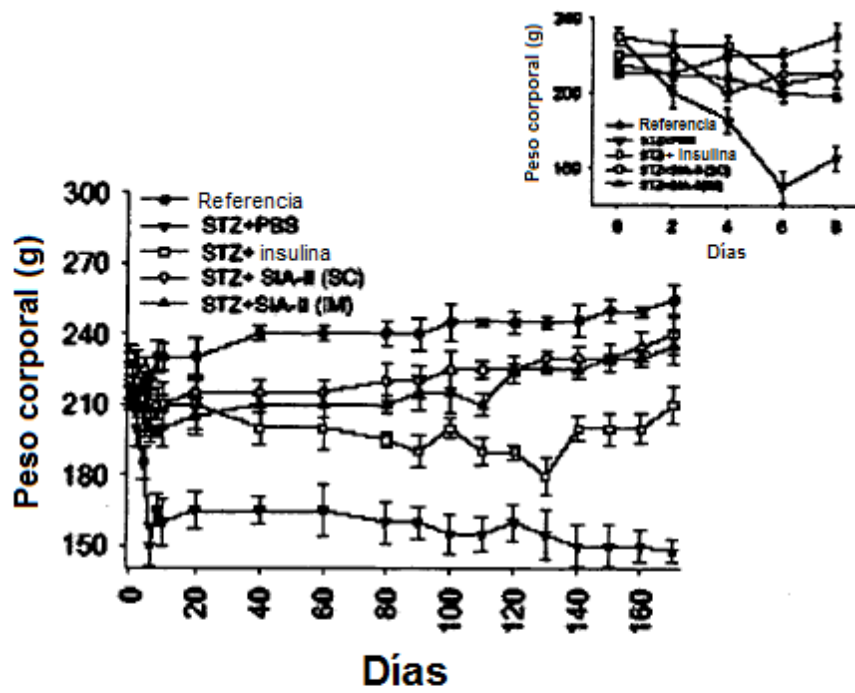


Figura 11

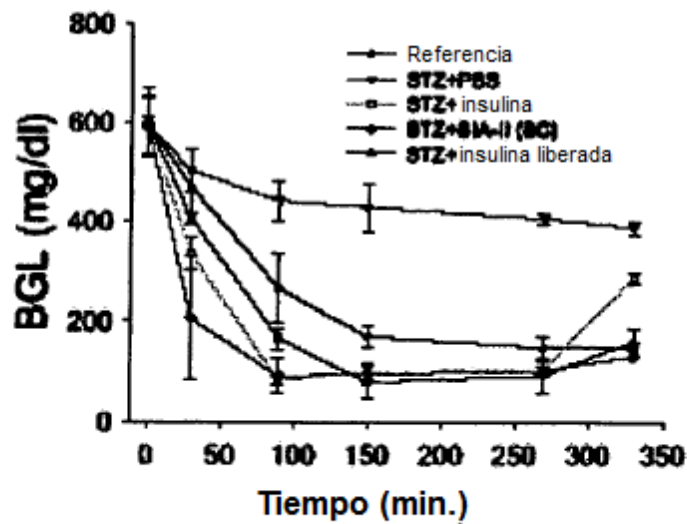


Figura 12

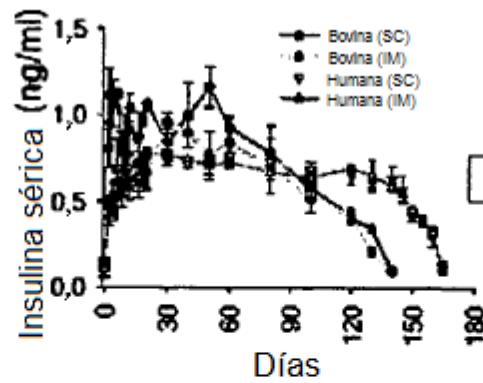


Figura 13a

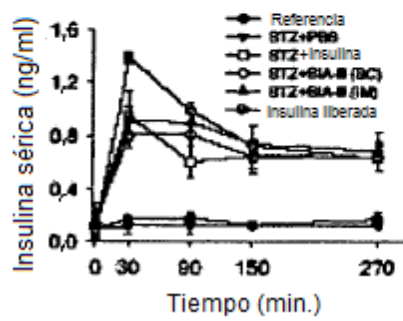


Figura 13b

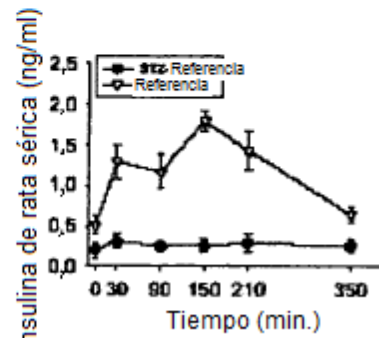


Figura 13c

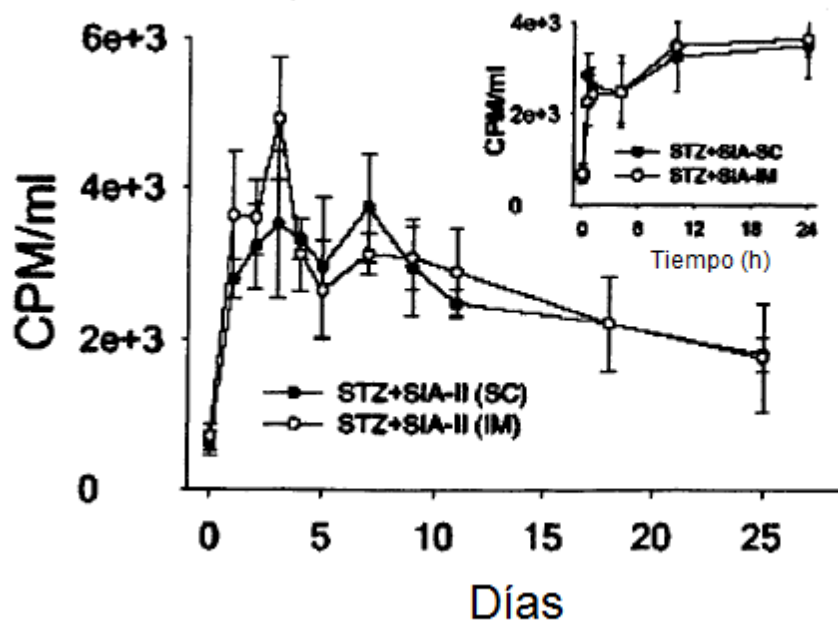


Figura 14a

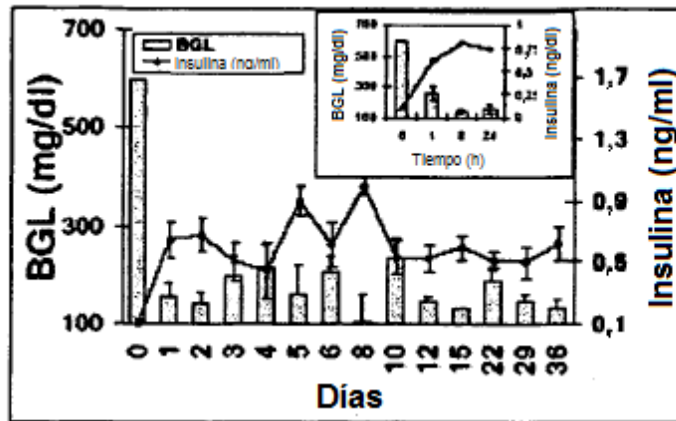


Figura 14b

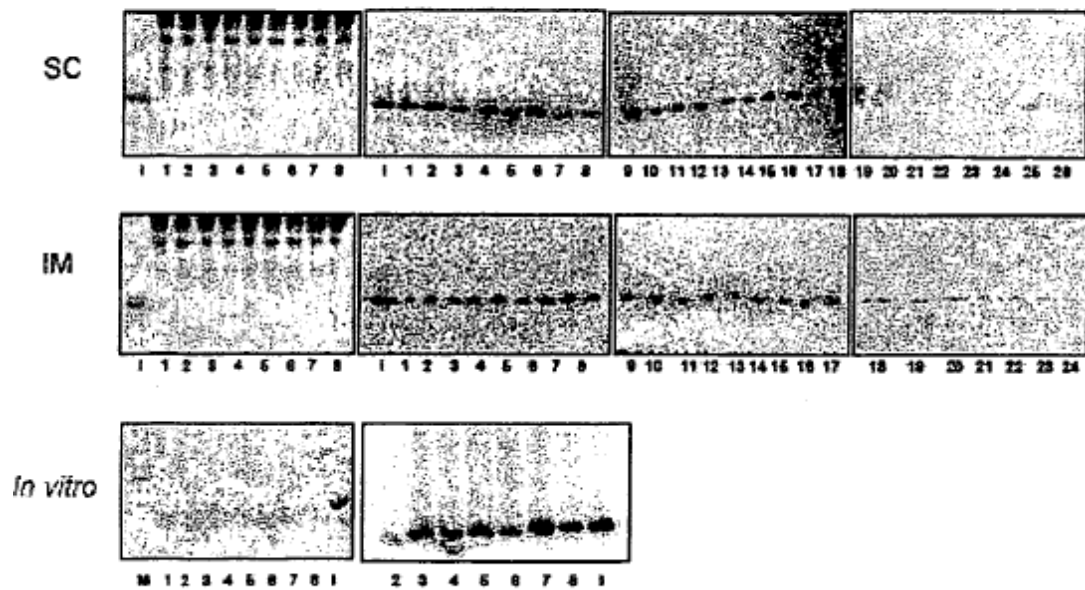


Figura 15

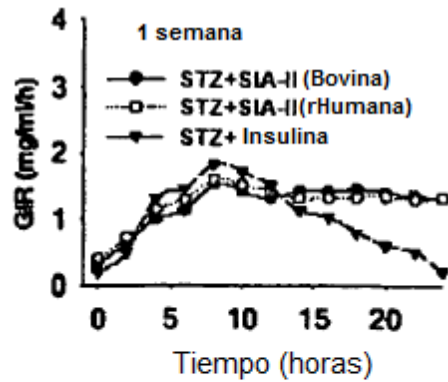


Figura 16a

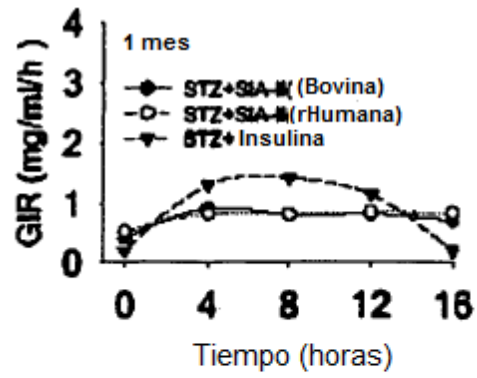


Figura 16b

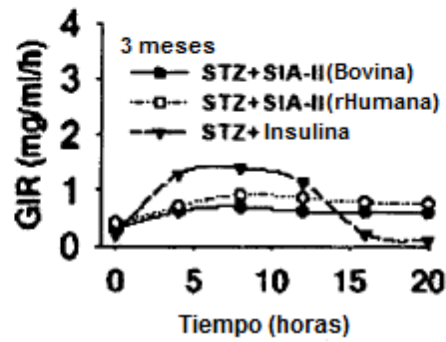


Figura 16c

Figura 17a

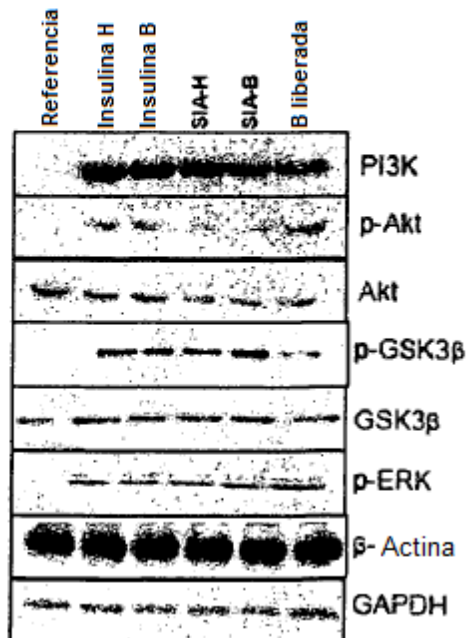
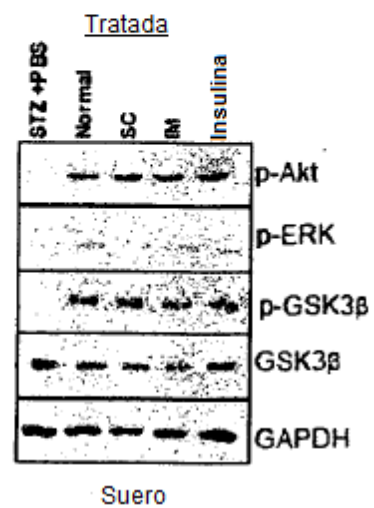


Figura 17b



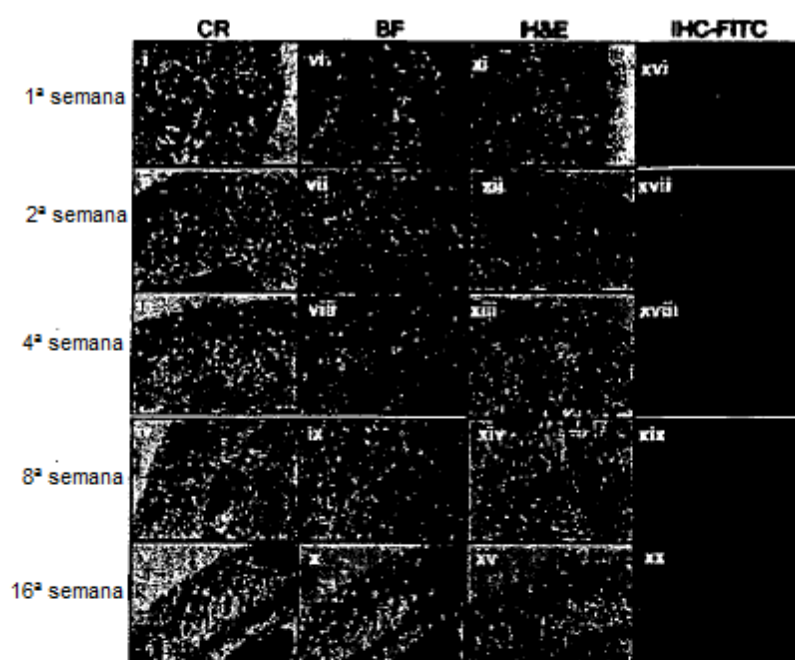
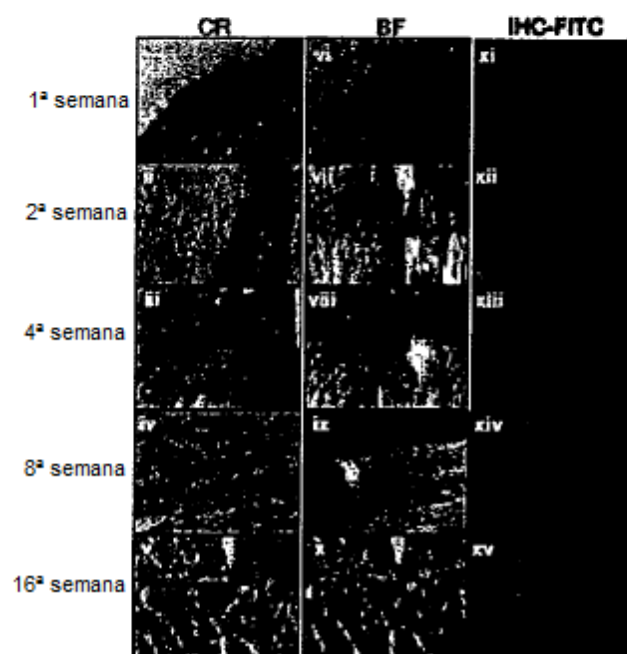


Figura 18a

Figura 18b



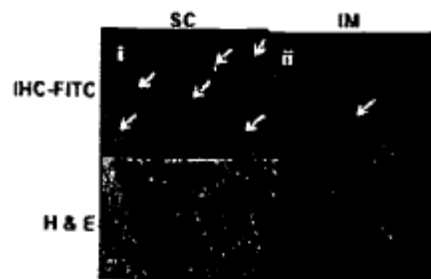


Figura 19a

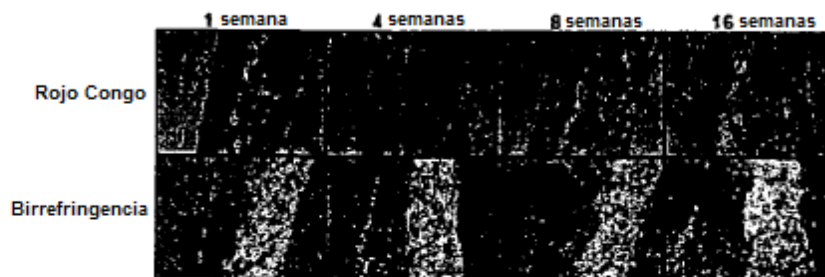
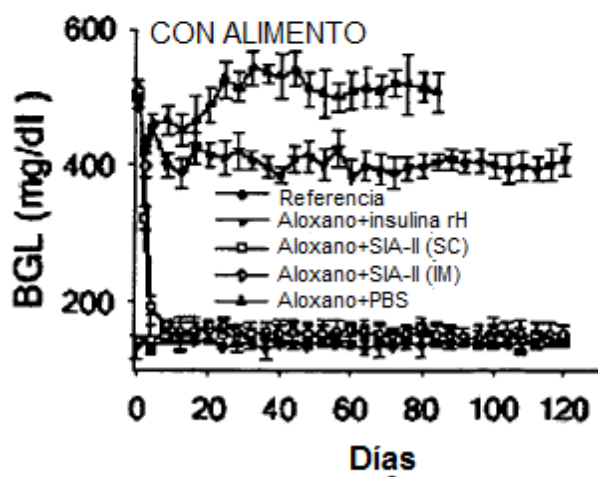
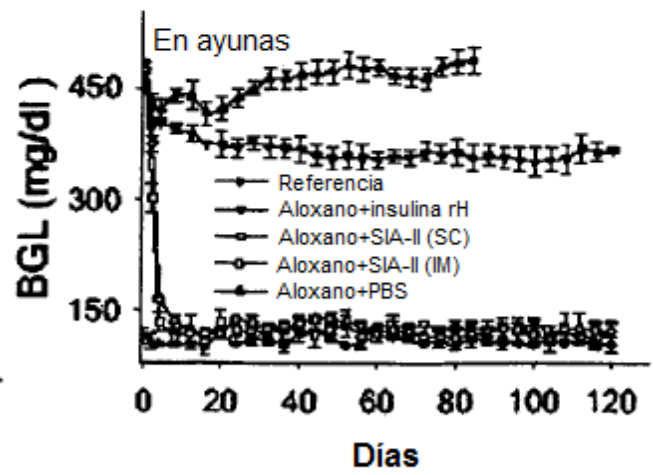


Figura 19b



a



b

Figura 20

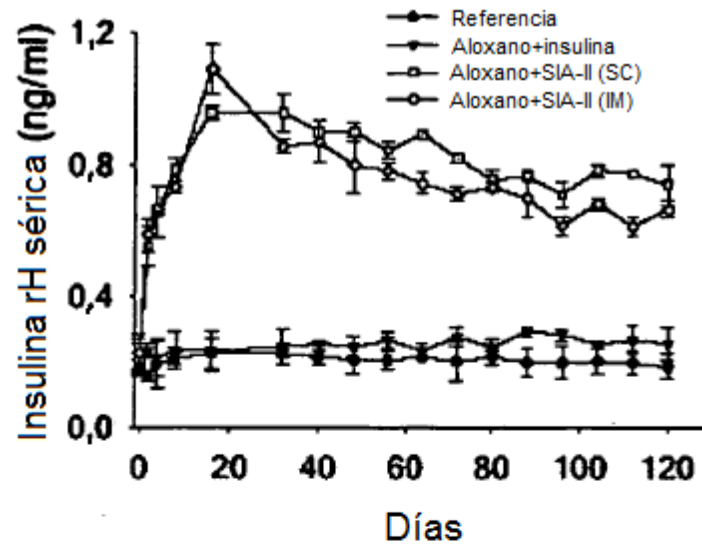


Figura 20c

Inducción de cataratas

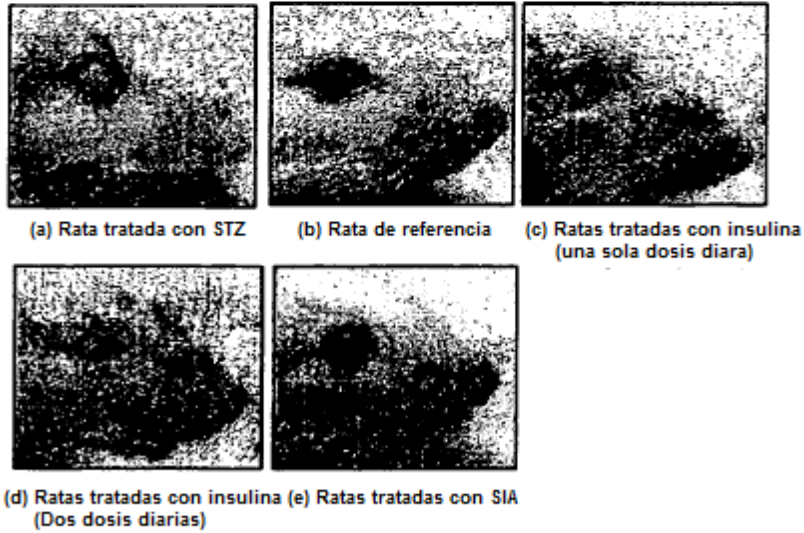


Figura 21

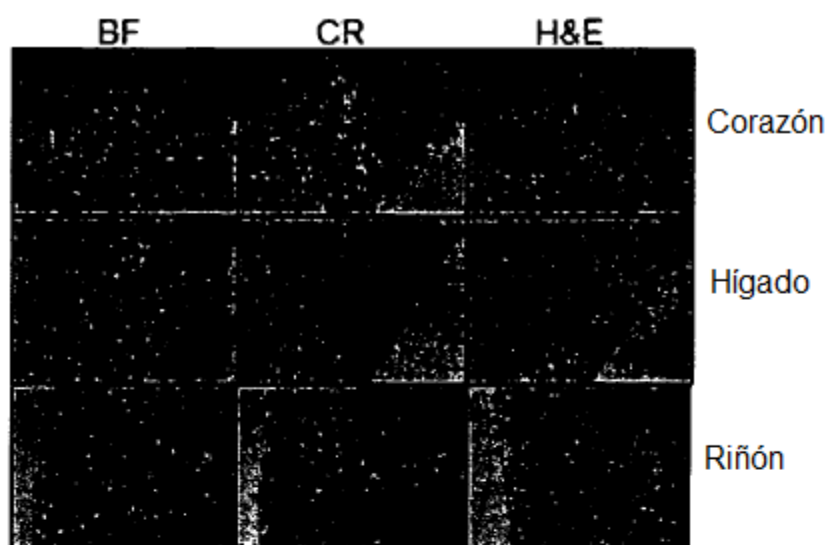


Figura 22

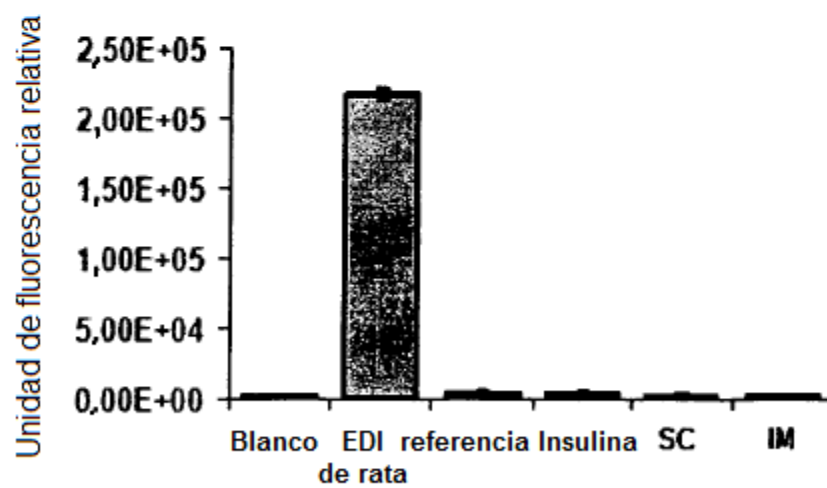


Figura 23

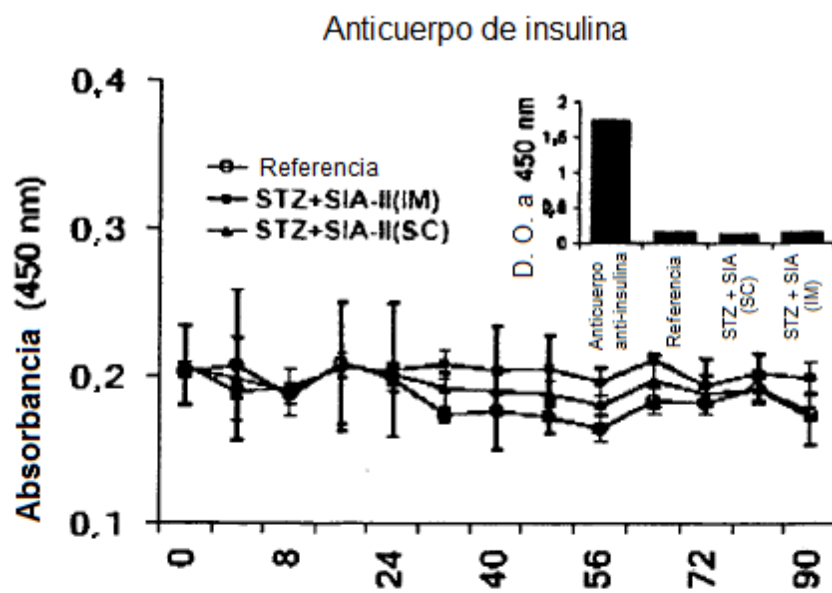


Figura 24

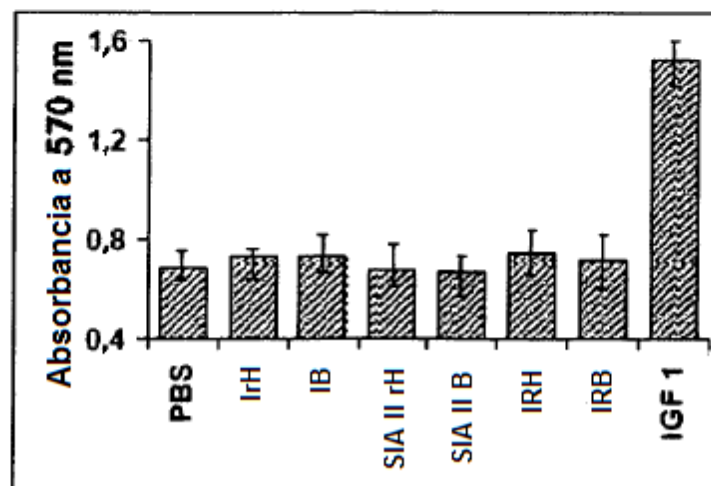


Figura 25

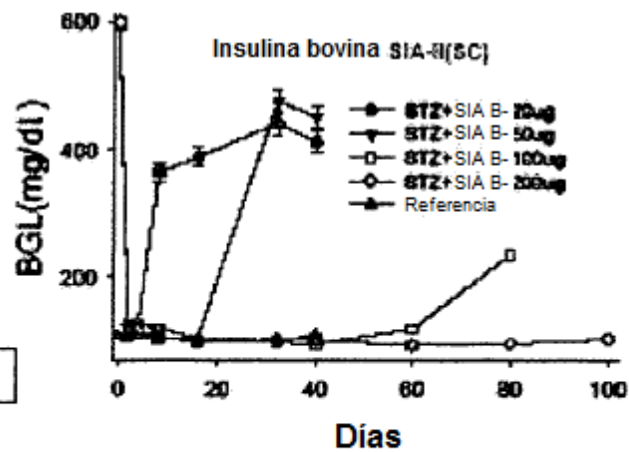
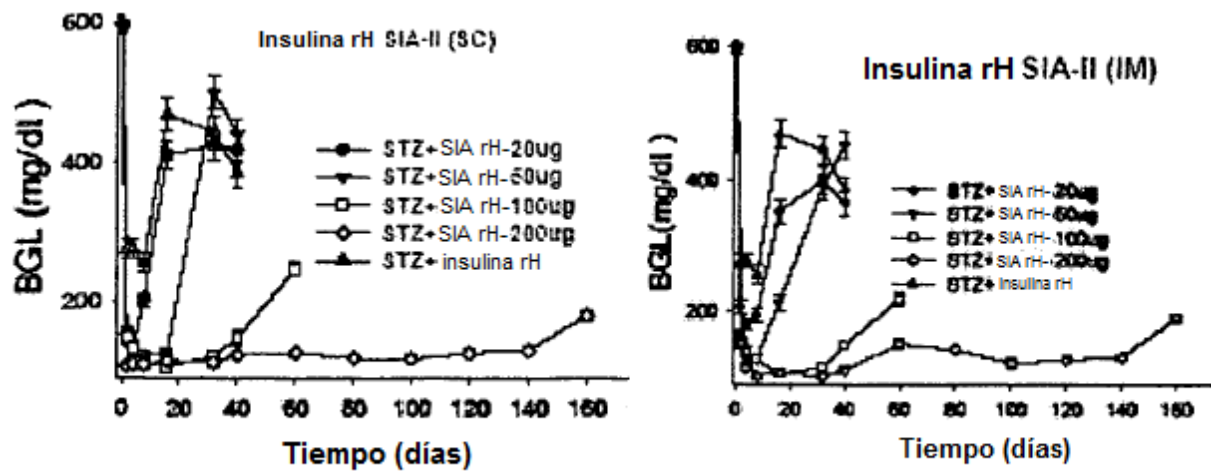
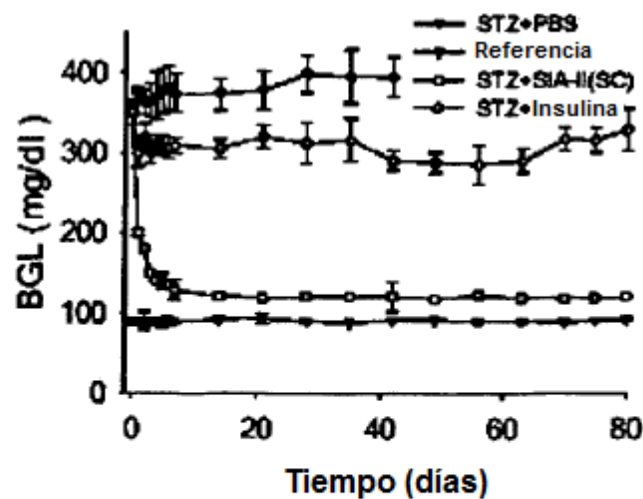
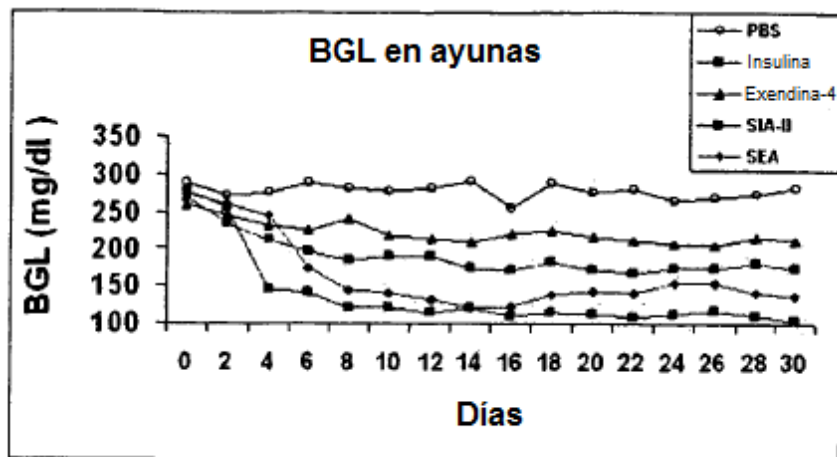


Figura 26

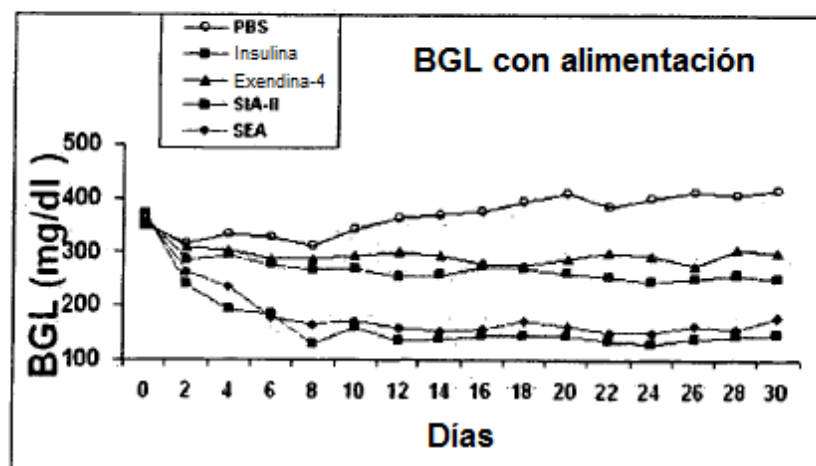


Conejo tratado con STZ

Figura 27



(a)



(b)

Figura 28

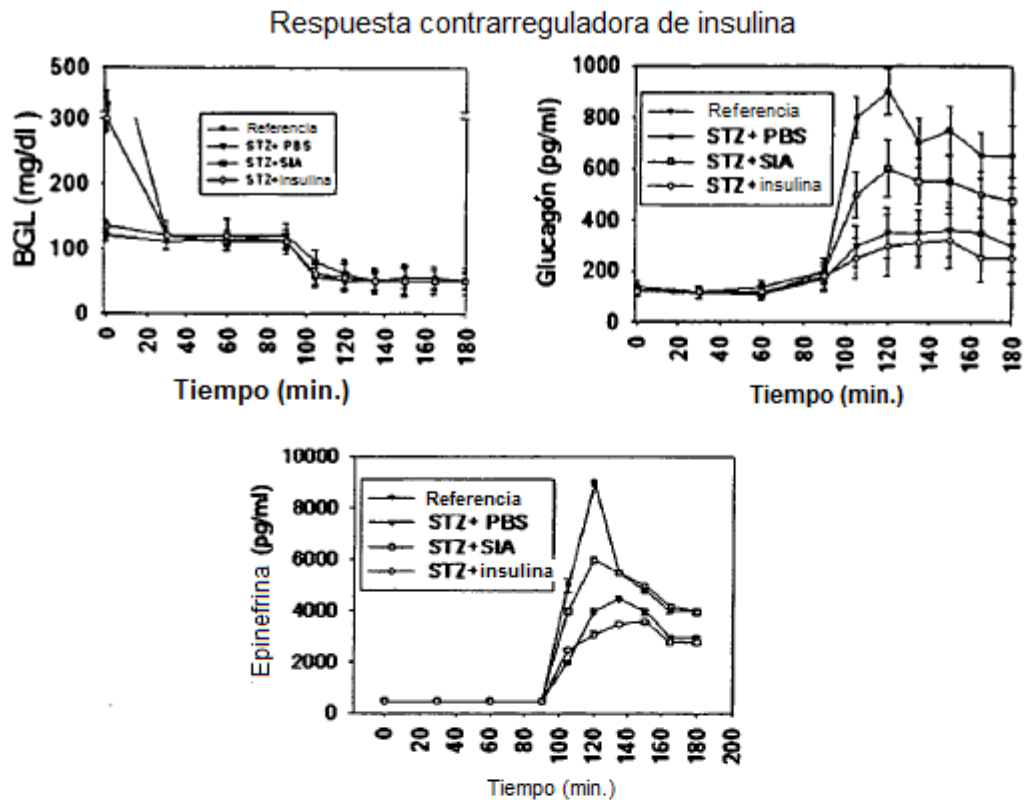


Figura 29

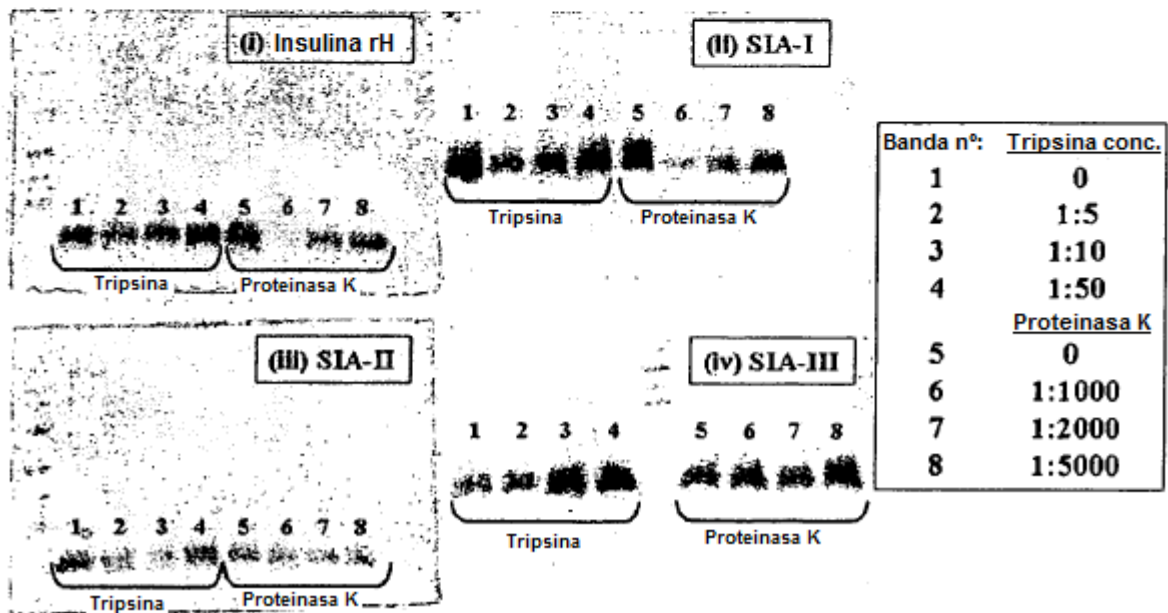


Figura 30