

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 823**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2005 E 05773736 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 1773878**

54 Título: **Conjugados insulina-oligómero, formulaciones y usos de estos**

30 Prioridad:

19.07.2004 US 589058 P
15.10.2004 US 619153 P
02.12.2004 US 632578 P
24.02.2005 US 655803 P
24.02.2005 US 655838 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.05.2015

73 Titular/es:

BIOCON LIMITED (100.0%)
20TH K.M. HOSUR ROAD, ELECTRONIC CITY
P.O.
BANGALORE 560 100, IN

72 Inventor/es:

RADHAKRISHNAN, BALASINGAM;
AGGARWAL, DITI;
FERRO, MICHELLE;
JAMES, KENNETH D.;
MALKAR, NAVDEEP B.;
MILLER, MARK A.;
PAVLIV, LEO;
POLOWY, KAREN;
PUSKAS, KAREN y
EKWURIBE, NNOCHIRII N.

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 535 823 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados insulina-oligómero, formulaciones y usos de estos.

5 1 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente de los Estados Unidos Núms. 60/589,058 presentada el 19 de julio de 2004, 60/619,153 presentada el 15 de octubre de 2004, 60/632,578 presentada el 2 de diciembre de 2004, y 60/655,838 presentada el 24 de febrero de 2005, y 60/655,803 presentada el 24 de febrero de 2005.

10

2 Campo

La invención se refiere a nuevos conjugados de compuestos de insulina en los que la insulina se acopla a una porción modificadora. La invención se relaciona además con complejos de cationes de tales conjugados de compuestos de insulina y a formulaciones farmacéuticas que incluyen tales conjugados de compuesto de insulina y/o porciones modificadoras.

15

3 Antecedentes

El compuesto de insulina que forma complejo con zinc está disponible comercialmente, por ejemplo, bajo los nombres comerciales HUMULIN® y HUMALOG®. La insulina que forma un complejo con zinc típicamente existe en una forma hexamérica.

20

Se han descrito varios métodos para el uso del zinc en la cristalización de la insulina acilada. Por ejemplo, la publicación de patente de los Estados Unidos 20010041786, que se publicó el 15 de noviembre de 2001, por Mark L. Brader y otros, titulada "Formulaciones de insulina acilada estabilizada" describe una formulación con una solución acuosa para el suministro parenteral, particularmente como una formulación inyectable, con un pH de 7.1 a 7.6, que contiene un ácido graso-insulina acilada o un ácido graso-análogo de insulina y se estabiliza por medio del uso de zinc y preferentemente un compuesto fenólico. La patente de los Estados Unidos 6,451,970, concedida el 17 de septiembre de 2002 a Schaffer y otros, asignada a Novo Nordisk A/S, titulada "Derivados de péptidos" describe derivados del compuesto de insulina y análogos de la insulina donde el grupo amino N-terminal de la cadena B y/o el grupo ε-amino de la Lys en la posición B28, B29 o B30 se acila por medio del uso del grupo hidrocarburo de cadena larga que tiene de 12 a 22 átomos de carbono y complejos de zinc de estos.

25

30

Se ha descrito el uso de protaminas y compuesto fenólicos en la cristalización de la insulina acilada. Las patentes de los Estados Unidos 6,268,335 (31 de Julio de 2001) y 6,465,426 (10 de octubre de 2002) a Brader, ambas tituladas "Insulina insoluble," describe composiciones insolubles compuestas de insulina acilada un compuesto que forma complejos con la protamina, un compuesto fenólico estabilizador hexámero, y un catión metálico divalente.

35

El documento WO-A-01/21197 describe una síntesis en "un recipiente" para hacer monómeros de insulina en donde la insulina se modifica en el grupo α-amino del residuo PheB1. Los inventores trataron de evitar la auto asociación de la insulina en dímeros, hexámeros, agregados de alto peso molecular y fibrillas insolubles que se reconocen como un problema en el tratamiento de la diabetes mellitus pero encontraron que la inclusión de Zn causó una estabilidad reducida y precipitación de la molécula de insulina en aproximadamente 8 horas. Así, se reveló que la inclusión de un catión divalente causó la producción de hexámeros altamente agregados que precipitaron rápidamente, aunque este era el resultado que los inventores trataron de prevenir.

40

45

Los enfoques existentes están especialmente adaptados para la cristalización del compuesto de insulina nativo o análogos del compuesto de insulina o compuesto de insulina acilados que tienen una lipofiliidad relativa aumentada en relación a los compuestos de insulina no acilados. Hay una necesidad en la materia de complejos farmacéuticamente aceptables que incluyan compuestos de insulina derivados, diferentes de los compuestos de insulina acilados, tales como derivados de compuestos de insulina hidrofílico y/o anfífilicos, y de análogos de compuesto de insulina lipofílicos no acilados. Hay además una necesidad en la materia de nuevos conjugados de proteína que tengan una biodisponibilidad aumentada u otros atributos farmacéuticos mejorados en relación a los conjugados existentes. Hay una necesidad en la materia de nuevas formulaciones que faciliten el suministro oral de proteínas y conjugados de proteínas. Finalmente, hay una necesidad de un enfoque combinado para mejorar la biodisponibilidad oral de una proteína, tal como un compuesto de insulina, que incorpora un conjugado de proteína oral mejorado proporcionado como un sólido en una formulación mejorada para maximizar los beneficios del suministro oral de proteínas.

50

55

60 4 Breve descripción de la invención

En general, la invención proporciona un complejo que incluye un conjugado de compuestos de insulina con un compuesto de insulina conjugado a una porción modificadora, y un catión, donde el conjugado de compuestos de

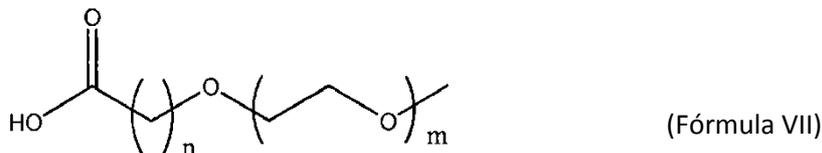
insulina forma un complejo con el catión. El compuesto de insulina es una insulina nativa. El componente catión es un catión metálico divalente seleccionado del grupo que consiste de Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Ca⁺⁺, Fe⁺⁺, Ni⁺⁺, Cu⁺⁺, Co⁺⁺ y Mg⁺⁺.

5 La porción modificadora se puede seleccionar para hacer al conjugado de compuesto de insulina más, menos o igualmente soluble en comparación al compuesto de insulina correspondiente no conjugado. La porción modificadora se selecciona preferentemente para hacer al conjugado de compuesto de insulina al menos 1.05, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, o 15 veces más soluble que el compuesto de insulina correspondiente no conjugado en una solución acuosa a un pH de aproximadamente 7.4. Preferentemente la porción modificadora se selecciona para rendir un conjugado de compuesto de insulina que tenga una solubilidad acuosa que exceda aproximadamente 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 50 g/L, 75 g/L, 100 g/L, 125 g/L, o 150 g/L a un pH de aproximadamente 7.4. Más aun, la porción modificadora se selecciona para hacer al conjugado de compuesto de insulina igualmente o más soluble que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado, y la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición de zinc. En otra modalidad, la porción modificadora se selecciona para hacer al conjugado de compuesto de insulina igualmente o más soluble que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado; la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición de zinc; y la solubilidad en agua del complejo es mayor que la solubilidad en agua del compuesto de insulina. Aún en otra modalidad, la lipofilicidad relativa del conjugado de compuesto de insulina en comparación con el compuesto de insulina parental correspondiente (k_{rel}) es 1 o menos que 1.

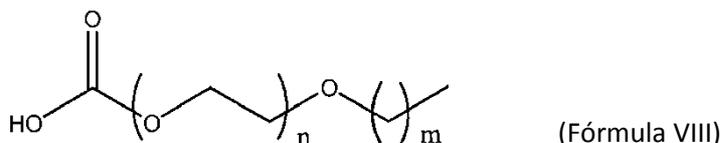
20 La invención proporciona un complejo que comprende:

un conjugado de insulina que comprende una insulina nativa conjugada a una porción modificadora, en donde la porción modificadora comprende desde 2 a 10 subunidades de polietilenglicol (OCH₂CH₂) que forman un componente PEG acoplado a un componente lipofílico, donde el componente lipofílico es un alquilo, en donde la porción modificadora se acopla a Lys^{B29} de ese modo proporciona un monoconjugado; y un catión divalente seleccionado del grupo que consiste de Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Ca⁺⁺, Fe⁺⁺, Ni⁺⁺, Cu⁺⁺, Co⁺⁺ y Mg⁺⁺, en donde el conjugado de insulina forma un complejo con el catión divalente.

30 La invención incluye coniuadados de compuesto de insulina que tienen porciones modificadoras con una fórmula:



40 donde n es 1, 2, 3 o 4, y m es 2, 3, 4 o 5; y/o



50 donde n es 1, 2, 3, 4 o 5, y m es 1, 2, 3 o 4.

55 La invención además proporciona una composición para tratar las deficiencias de insulina o de cualquier otra forma suplementar insulina en un sujeto que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de los complejos de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Los métodos para el tratamiento generalmente incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los complejos y/o formulaciones de la invención a un sujeto en necesidad de estos.

5 Breve descripción de las figuras

60 Las Figuras 1-15B muestran fotomicrografías de varios sólidos cristalinos de la invención. Las Figuras 1 y 2 son fotomicrografías tomadas por medio del uso de un microscopio Zeiss Axiovert que muestra complejos de Zn de tipo T de HIM2 a 30 g/L de concentración, los cristales crecieron por 24 horas. La Figura 3 es una fotomicrografía tomada por

medio del uso de un microscopio Zeiss Axiovert que muestra complejos de Zn de tipo T de HIM2 a 30 g/L de concentración, cristales crecidos por 5 días. La Figura 4 es una fotomicrografía tomada por medio del uso de un microscopio Zeiss Axiovert que muestra complejos de Zn de tipo R de HIM2 a 30 g/L cristales crecidos por 4 días. La Figura 5 muestra fotomicrografía de complejos de Zn de tipo R de IN105 que contiene 30% orgánico. Las Figuras 6A-10B muestran fotomicrografías de varios complejos de Zn de tipo R de HIM2 fabricados por medio del uso de disolvente orgánico. Las Figuras 11A-14B muestran fotomicrografías de cristales de varios complejos de Zn de tipo R co-cristalizados de HIM2 y IN105. Las Figuras 15A-15B muestran fotomicrografías de cristales de varios complejos de Zn de tipo R co-cristalizados de HIM2 e insulina humana. La invención incluye cristales que tienen las morfologías mostradas en cualquiera de las Figuras 1-15B.

Las Figuras 16-20 muestran los resultados del ensayo de glucosa en sangre de ratón para HIM2 y varios complejos Zn-HIM2. La Figura 16 muestra perfiles de biopotencia de MBGA para HIM2. La Figura 17 muestra perfiles de biopotencia de MBGA para el producto de compuesto de insulina Zn HIM2 de tipo R. La Figura 18 muestra perfiles de biopotencia de MBGA para el producto de compuesto de insulina Zn HIM2 de tipo T. La Figura 20 muestra perfiles de biopotencia de MBGA para el producto de compuesto de insulina Zn HIM2 con protamina. La Figura 20 muestra los efectos de disminución de glucosa de los complejos de protamina de tipo R a los 30 y 90 minutos después de la dosis.

Las Figuras 21-24 muestran los perfiles de biopotencia de MBGA para IN-186, IN-192, IN-190, IN-191, IN-189, IN-178, IN-193, IN-194, IN-185, IN-196 e IN-197.

Las Figuras 25 y 26 muestran los resultados del estudio de fijación en perros para los complejos Zn-HIM2 de la invención. Las Figuras 27 y 28 muestran los resultados del estudio de fijación en perros para los complejos Zn-IN105 de la invención.

Las Figuras 29 y 30 muestran los resultados del estudio de fijación en perros para perros dosificados con IN105 en 3% p/v sal de sodio de ácido cáprico en un amortiguador de fosfato sin excipientes adicionales.

Las Figuras 31-33 muestran los resultados del estudio de fijación en perror para perros dosificados con tabletas que contienen 6 mg de IN105 y 150 mg de manitol, 30 mg Exlotab con 143 mg Caprato con o sin 143 mg de laurato.

Las Figuras 34-37 muestran los resultados del estudio de fijación en perros para perros dosificados con la tableta prototipo tabletas de caprato 150 mg y 280 mg y con tabletas de caprato/laurato 140 mg/140 mg.

6 Definiciones

Lo siguiente son definiciones de los términos como se usan a lo largo de esta especificación y reivindicaciones. Las definiciones proporcionadas se aplican a lo largo de la presente especificación a menos que se indique de cualquier otra forma. Los términos que no se definen en la presente descripción tienen el significado comúnmente entendido en la materia a la que corresponde el término.

"**Adición**," cuando se usa en referencia a una secuencia de amino ácidos, incluye extensiones de uno o más amino ácidos en cualquiera de ambos extremos de la secuencia así como inserciones dentro de la secuencia.

"**Complejo**" se refiere a una asociación molecular en la que uno o más compuestos de insulina o conjugados de compuesto de insulina forman enlaces coordinados con uno o más átomos o iones metálicos. Los complejos pueden existir en solución o como un sólido, tal como un cristal, microcristal, o un sólido amorfo. "**Mezcla de complejos**" significa una mezcla que tiene dos o más complejos diferentes, ya sea en solución o en forma sólida. Las mezclas de complejos pueden, por ejemplo, incluir complejos con diferentes compuestos de insulina, diferentes conjugados de compuesto de insulina, diferentes complejos híbridos, diferentes cationes, combinaciones de los anteriores, y similares. "**Complejo híbrido**" significa un complejo conjugado de compuesto de insulina-catió que tiene dos o más compuestos de insulina y/o conjugados de compuesto de insulina diferentes.

"**Agente formador de complejos**" significa una molécula que tiene una multiplicidad de cargas y que se une a o forma complejos con los conjugados de compuesto de insulina. Ejemplos de agentes formadores de complejos adecuados para usar en la presente invención incluyen protaminas, surfen, proteínas globina, espermina, espermidina albúmina, amino ácidos, ácidos carboxílicos, compuestos polímeros policatiónicos, polipéptidos cationicos, polipéptidos aniónicos, nucleótidos, y antisentido. VerBrange, J., Galénicas de compuesto de insulina, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1987).

"**Conservativo**" usado en referencia a la adición, deleción o sustitución de un amino ácido significa una adición, deleción o sustitución en una cadena de amino ácidos que no disminuye completamente la eficacia terapéutica del compuesto de insulina, es decir, la eficacia puede reducirse, ser la misma, o aumentar, en relación a la eficacia terapéutica del control científicamente aceptado, tal como el compuesto de insulina nativo correspondiente.

"**Hidrofílico**" significa exhibir características de solubilidad en agua, y la "**porción hidrofílica**" se refiere a una porción que es hidrofílica y/o que cuando se une a otra entidad química, aumenta la hidrofilia de tal entidad. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, azúcares y porciones polialquileno tales como el polietilenglicol. "**Lipofílico**" significa exhibir características de solubilidad en grasa, tales como la acumulación en grasa y tejidos grasos, la habilidad para disolverse en lípidos y/o la habilidad para penetrar, interactuar y/o atravesar membranas biológicas, y el término,

"**porción lipofílica**" significa una porción que es lipofílica y/o que, cuando se une a otra entidad química, aumenta la lipofilicidad de tal entidad. "**Anfifílico**" significa exhibir características de hidrofiliicidad y lipofilicidad, y el término "**porción anfifílica**" significa una porción que es anfifílica y/o que, cuando se une a un fármaco polipéptido o no-polipéptido, aumenta la anfifilicidad (es decir, aumenta ambas la hidrofiliicidad y la lipofilicidad) del conjugado resultante, por ejemplo, ciertas porciones modificadoras PEG-ácido graso, y porciones modificadoras azúcar-ácido graso.

"**Alquilo inferior**" significa porciones alquilo sustituidas o no sustituidas, lineales o ramificadas que tienen de uno a seis átomos de carbono, es decir, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ o C₆. "**Alquilo superior**" significa porciones alquilo sustituidas o no sustituidas, lineales o ramificadas que tienen seis o más átomos de carbono, por ejemplo, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, etc.

"**Monodispersa**" describe una mezcla de compuestos donde aproximadamente el 100 por ciento de los compuestos en la mezcla tienen el mismo peso molecular. "Prácticamente monodispersa" describe una mezcla de compuestos donde al menos aproximadamente el 95 por ciento de los compuestos en la mezcla tienen el mismo peso molecular. "Puramente monodispersa" describe una mezcla de compuestos donde aproximadamente el 100 por ciento de los compuestos en la mezcla tienen el mismo peso molecular y tienen la misma estructura molecular. Así, una mezcla puramente monodispersa es una mezcla monodispersa, pero una mezcla monodispersa no es necesariamente una mezcla puramente monodispersa. "Prácticamente puramente monodispersa" describe una mezcla de compuestos donde al menos aproximadamente el 95 por ciento de los compuestos en la mezcla tienen el mismo peso molecular y la misma estructura molecular. Así, una mezcla prácticamente puramente monodispersa es una mezcla prácticamente monodispersa, pero una mezcla prácticamente monodispersa no es necesariamente una mezcla prácticamente puramente monodispersa. Los componentes del conjugado de compuesto de insulina de las composiciones de conjugado de compuesto de insulina-cación son preferentemente monodispersos, prácticamente monodispersos, puramente monodispersos o prácticamente puramente monodispersos, pero pueden además ser polidispersos. "**Polidispersos**" significa que tienen una dispersidad que no es monodispersa, prácticamente monodispersa, puramente monodispersa o prácticamente puramente monodispersa.

"**Compuesto de insulina nativa**" como se usa especialmente en la presente descripción significa compuesto de insulina de mamífero (por ejemplo, insulina humana, compuesto de insulina bovina, compuesto de insulina porcina o compuesto de insulina de ballena), proporcionada de fuentes naturales, sintéticas, o diseñada mediante ingeniería genética. La insulina humana está compuesta por una cadena A de veintiún amino ácidos y una cadena B de treinta amino ácidos que se entrecruzan por puentes disulfuro. Una insulina humana correctamente entrecruzada incluye tres puentes disulfuro: uno entre A7 y B7, un segundo entre A20 y B19, y un tercero entre A6 y A11. La insulina humana posee tres grupos amino libres: B1-fenilalanina, A1-glicina, y B29-lisina. Los grupos amino libres en las posiciones A1 y B1 son grupos α -amino. El grupo amino libre en la posición B29 es un grupo ϵ -amino. "**Análogo de la insulina**" significa un polipéptido que exhibe alguna, toda o aumentada actividad relativa a una insulina nativa correspondiente o que se convierte *in vivo* o *in vitro* en un polipéptido que exhibe alguna, toda o aumentada actividad relativa a la insulina nativa correspondiente, por ejemplo, un polipéptido que tiene la estructura de una insulina humana con una o más adiciones, deleciones y/o sustituciones conservativas de amino ácidos. Los análogos de la insulina pueden identificarse por medio del uso de técnicas conocidas, tales como aquellas descritas en la publicación de patente de los Estados Unidos Núm. 20030049654, "Automatización del diseño de proteínas para genotecas de proteínas," presentada el 18 de marzo de 2002 a nombre de Dahiyat y otros. Las proinsulinas, pre-proinsulinas, precursores de insulina, precursores de insulina de una sola cadena de humanos y animales no humanos y análogos de cualquiera de los anteriores se denominan en la presente descripción como análogos de la insulina, como son las insulinas de no-mamífero. Muchos análogos de la insulina se conocen en la materia (ver la discusión más abajo). A menos que el contexto específicamente lo indique de cualquier otra forma (por ejemplo, donde se hace referencia a una insulina específica, tal como la "insulina humana" o similares), el término "**compuesto de insulina**" se usa ampliamente para incluir insulinas nativas y análogos de la insulina.

"**Polialquilen glicol**" o PAG se refiere a polímeros de polialquilen glicol sustituidos o no sustituidos, lineales o ramificados tales como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG), y polibutilenglicol (PBG), y combinaciones de estos (por ejemplo, polímeros lineales o ramificados que incluyen combinaciones de dos o más subunidades de PAG diferentes, tales como dos o más subunidades de PAG diferentes seleccionadas de subunidades de PEG, PPG, PPG, y PBG), e incluye el monoalquiléter del polialquilen glicol. El término subunidad PAG significa una sola unidad PAG, por ejemplo, "**subunidad PEG**" se refiere a una sola unidad de polietilenglicol, por ejemplo, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$, "**subunidad PPG**" se refiere a una sola unidad de polipropilenglicol, por ejemplo, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$, y "**subunidad PBG**" se refiere a una sola unidad de polibutilenglicol, por ejemplo, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$. Las subunidades PAGs y/o PAG además incluyen subunidades PAGs o PAG sustituidas, por ejemplo, PAGs que incluyen cadenas laterales de alquilo, tales como cadenas laterales metilo, etilo o propilo, o cadenas laterales carbonilo, así como PAGs que incluyen una o más subunidades PAG ramificadas, tales como iso-PPG o iso-PBG.

"**Compuesto de proinsulina**" significa un compuesto de insulina en el que el C-terminal de la cadena B se acopla al N-terminal de la cadena A a través de un C-péptido natural o artificial que tiene 5 o más amino ácidos. "**Compuesto de**

5 **preproinsulina**" significa un compuesto de proinsulina que además incluye una secuencia líder acoplada al N-terminal de la cadena B, tal como una secuencia seleccionada para promover la excreción como una proteína soluble, o una secuencia seleccionada para prevenir la conjugación del N-terminal, o una secuencia seleccionada para mejorar la purificación (por ejemplo, una secuencia con afinidad de unión a una columna de purificación). **"Precursor de compuesto de insulina de una sola cadena"** o **"compuesto de miniproinsulina"** significa un compuesto de insulina en el que el C-terminal de la cadena B (o una cadena B troncada que tiene 1, 2, 3 o 4 amino ácidos eliminados del C-terminal) se acopla al N-terminal de la cadena A o una cadena A troncada acortada en el N-terminal por 1, 2, 3 o 4 amino ácidos, sin un C-péptido intermediario, o a través de un C-péptido acortado que tiene 1, 2, 3 o 4 amino ácidos.

10 **"Protamina"** se refiere a una mezcla de proteínas fuertemente básicas obtenidas a partir de fuentes naturales (por ejemplo, esperma de pez) o recombinantes. Ver Hoffmann, J. A., y otros, Expresión y purificación de proteínas, 1:127-133 (1990). La composición de Protamina se puede proporcionar en una preparación de las proteínas relativamente libre de sales, llamada frecuentemente "base protamina" o en una preparación que incluye sales de las proteínas.

15 **"Proteína"** **"péptido"** y **"polipéptido"** se usan intercambiamente en la presente descripción para referirse a compuestos que tienen secuencias de amino ácidos de al menos dos y hasta cualquier longitud.

20 **"Tipo R"** significa una conformación del complejo formado en la presencia del conjugado de compuesto de insulina, un catión y un compuesto estabilizador, tal como el fenol. **"Tipo T"** significa una conformación del complejo formado en la presencia del conjugado de compuesto de insulina y un catión *sin* un compuesto estabilizador, tal como el fenol. Un complejo tipo T o tipo R puede incluir o excluir Protamina.

25 **"Control científicamente aceptable"** significa un control experimental que es aceptable para un experto en la materia del asunto tema del experimento.

30 **"Sólido"** significa un estado de la materia en que hay regularidad de la estructura tridimensional; el término se usa ampliamente en la presente descripción para referirse a ambos sólidos cristalinos, sólidos amorfos, y combinaciones de sólidos cristalinos y sólidos amorfos. **"Sólido conjugado de compuesto de insulina-catión,"** se refiere a un sólido que incluye un conjugado de compuesto de insulina-catión, preferentemente coordinado con un catión monovalente o multivalente. **"Cristal"** significa un sólido con una forma polihédrica regular. **"Cristalino"** se refiere a sólidos que tienen las características de los cristales. **"Microcristal"** significa un sólido que está compuesto principalmente de materia en un estado cristalino que es microscópico en tamaño, típicamente con las mayores dimensiones dentro del intervalo de 1 micrón a 100 micrones. En algunos casos, los cristales individuales de una composición microcristalina son predominantemente de una sola composición cristalográfica. En algunas modalidades, los cristales de la invención no son microcristales. El término **"microcristalino"** se refiere al estado de ser del microcristal. **"Amorfo"** se refiere a un material sólido que no es cristalino en la forma. La persona de habilidades ordinarias en la materia puede distinguir cristales de materiales amorfos por medio del uso de técnicas estándar, por ejemplo, por medio del uso de rayos x, técnicas cristalográficas, microscopía electrónica de barrido o microscopía óptica. **"Mezcla de sólidos"** significa una mezcla de dos sólidos diferentes. **"Mezcla de cristales"** significa una mezcla de dos cristales diferentes. **"Co-cristal"** significa un cristal que tiene dos o más compuestos de insulina y/o conjugados de compuesto de insulina diferentes. Los complejos de conjugado de compuesto de insulina-catión de la invención se pueden proporcionar en cualquiera de las formas anteriores o en mezclas de dos o más de tales formas.

45 **"Sustitución"** significa remplazamiento de uno o más residuos de amino ácido dentro de la secuencia del compuesto de insulina con otro amino ácido. En algunos casos, el amino ácido sustituido actúa como un equivalente funcional, lo que resulta en una alteración silente. Las sustituciones pueden ser conservativas; por ejemplo, las sustituciones conservativas pueden seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el amino ácido sustituido. Ejemplos de amino ácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Ejemplos de amino ácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina. Ejemplos de amino ácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Ejemplos de amino ácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

50 La **"Solubilidad en agua"** o **"solubilidad acuosa"** a menos que se indique de cualquier otra forma, se determina en una solución amortiguadora acuosa a un pH de 7.4.

55 7 Descripción detallada de la invención

60 La invención proporciona complejos de conjugado de compuesto de insulina-catión y varias composiciones que incluyen tales complejos; además se describen los métodos de elaboración y uso de tales complejos y composiciones. Los complejos son útiles para la administración del compuesto de insulina para el tratamiento de varios trastornos médicos, tales como afecciones caracterizados por la deficiencia del compuesto de insulina. Los complejos incluyen un componente catión y un componente conjugado de compuesto de insulina. El componente conjugado de compuesto de insulina incluye un compuesto de insulina acoplado a una porción modificadora. Ejemplos de otros componentes de los

complejos y/o composiciones adecuados incluyen agentes estabilizantes, agentes formadores de complejos, y otros componentes conocidos en la materia para usar en la preparación de complejos catión-proteína. La invención además proporciona nuevos conjugados de compuesto de insulina y formulaciones de ácido graso que incluyen tales conjugados de compuesto de insulina y/o complejos de conjugado de compuesto de insulina-catión.

7.1 Compuesto de insulina

El conjugado de compuesto de insulina-catión incluye un componente compuesto de insulina. El compuesto de insulina puede, por ejemplo, ser un compuesto de insulina de mamífero, tal como insulina humana.

Una amplia variedad de análogos de compuesto de insulina se conocen en la materia. Los análogos de compuesto de insulina preferidos son aquellos que incluyen una lisina, preferentemente una lisina dentro de los 5 amino ácidos del C-terminal de la cadena B, por ejemplo, en las posiciones B26, B27, B28, B29 y/o B30, específicamente en la posición B29.

Los compuestos de insulina usados para preparar los conjugados de compuesto de insulina-catión se pueden preparar por cualquiera de una variedad de técnicas de síntesis de péptidos reconocidas, por ejemplo, métodos clásicos (en solución), métodos en fase sólida, métodos semi-sintéticos, y métodos de ADN recombinante. Por ejemplo, Chance y otros, solicitud de patente de los Estados Unidos Núm. 07/388,201, EPO383472, Brange y otros, EPO214826, y Belagaje y otros, patente de los Estados Unidos 5,304,473 describen la preparación de varios compuesto de proinsulina y análogos de compuesto de insulina y se incorporan en presente descripción por referencia. Las cadenas A y B de los análogos de compuesto de insulina pueden además prepararse a través de una molécula precursora tipo compuesto de proinsulina o molécula precursora de compuesto de insulina de una sola cadena por medio del uso de técnicas de ADN recombinante. Ver Frank y otros, "Péptidos: Síntesis-Estructura-Función" *Proc. Seventh Am. Pept. Symp.*, Eds. D. Rich y E. Gross (1981); Bernd Gutte, *Peptides: Synthesis, Structures, and applications*, Academic Press (19 de octubre de 1995); Chan, Weng y White, Peter (Eds.), *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press (Marzo 2000).

7.2 Porción modificadora

Los complejos de conjugado de compuesto de insulina-catión incluyen una porción modificadora acoplada (por ejemplo, covalentemente o iónicamente) al compuesto de insulina para proporcionar el conjugado de compuesto de insulina. Las porciones modificadoras son porciones acopladas al compuesto de insulina que proporcionan al compuesto de insulina las propiedades deseadas como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, la porción modificadora puede reducir la velocidad de degradación del compuesto de insulina en varios ambientes (tales como el tracto GI, y/o el flujo sanguíneo), de forma tal que se degrada menos compuesto de insulina en la forma modificada que el que se degradaría en ausencia de la porción modificadora en tales ambientes. Las porciones modificadoras preferidas son aquellas que permiten al conjugado de compuesto de insulina retener un porcentaje terapéuticamente significativo de la actividad biológica del compuesto de insulina parental. Más aun, las porciones modificadoras preferidas son aquellas que son anfífilas o hidrofílicas, y/o que hacen al conjugado de compuesto de insulina anfífilo o hidrofílico o menos lipofílico que un control científicamente aceptable, tales como un compuesto de insulina correspondiente, o un compuesto de insulina correspondiente no conjugado.

Las porciones modificadoras adecuadas comprenden de 2 a 10 subunidades de polietilenglicol (OCH₂CH₂) que forman un componente PEG acoplado a un componente lipofílico, donde el componente lipofílico es un alquilo, en donde la porción modificadora se acopla a Lys^{B29} de ese modo proporciona un monoconjugado.

Las porciones modificadoras pueden incluir enlaces débiles o degradables en sus esqueletos. Por ejemplo, los PEGs pueden incluir enlaces hidrolíticamente inestables, tales como láctido, glicólido, carbonato, éster, carbamato y similares, que son susceptibles a hidrólisis. Este enfoque permite clivar los polímeros en fragmentos de peso molecular inferior. Los ejemplos de tales polímeros se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos 6,153,211, titulada, a Hubbell y otros, la descripción completa la que se incorpora en la presente descripción como referencia. Ver además patente de los Estados Unidos 6,309,633, a Ekwuribe y otros.

La porción modificadora puede incluir cualquier porción hidrofílica, porción lipofílica, porción anfífilica, porción que forma sales, y combinaciones de estas. Los polímeros y porciones modificadoras hidrofílicos, anfífilicos, y lipofílicos representativos se describen en más detalle más abajo.

7.2.1 Porciones hidrofílicas

Ejemplos de porciones hidrofílicas adecuadas incluyen porciones PEG.

7.2.2 Porciones polialquilen glicol.

PAGs son compuestos con unidades de alquilen glicol repetidas. En la presente invención, las unidades son todas PEG.

5 PEG es un PAG preferido, y es útil en aplicaciones biológicas porque tiene propiedades altamente deseables y generalmente se considera como seguro (GRAS) por la Administración de alimentos y fármacos. El PEG generalmente tiene la fórmula $H-(CH_2CH_2O)_n-H$, donde n puede estar en el intervalo desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4000 o más, aunque las porciones de cubierta pueden variar, por ejemplo, mono-metoxi o di-hidroxi. El PEG típicamente es incoloro, inodoro, soluble en agua o miscible en agua (en dependencia del peso molecular), estable al calor, inerte químicamente, hidrolíticamente estable, y generalmente no tóxico. El PEG es además biocompatible, y típicamente no produce una respuesta inmune en el cuerpo. Las porciones PEG en la presente invención incluyen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 subunidades PEG.

15 El PEG puede ser monodisperso, prácticamente monodisperso, puramente monodisperso o prácticamente puramente monodisperso (por ejemplo, como se describió previamente por los solicitantes en la patente de los Estados Unidos 09/873,731 y la patente de los Estados Unidos 09/873,797, ambas presentadas el 4 de julio de 2001, la descripción completa de las que se incorpora en la presente descripción por referencia) o polidisperso. Una ventaja de usar polímeros de peso molecular relativamente bajo, monodispersos es que ellos forman fácilmente moléculas conjugadas definidas, que pueden facilitar la síntesis reproducible y la aprobación de la FDA.

20 El PEG puede ser lineal con un grupo hidroxilo en cada terminal (antes de conjugarse al remanente del compuesto de insulina). El PEG puede además ser un alcoxi PEG, tal como metoxi-PEG (o mPEG), donde un terminal es un grupo alcoxi relativamente inerte (por ejemplo, OC_{1-6} lineal o ramificado), mientras el otro terminal es un grupo hidroxilo (que se acopla al compuesto de insulina).

25 El PEG puede además ser ramificado, lo que en una modalidad se representa como $R(-PEG_nOH)_m$ en la que R representa un agente núcleo central (típicamente polihídrico) tal como pentaeritritol, azúcar, lisina o glicerol, n representa el número de subunidad PEG y puede variar para cada brazo y es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y m representa el número de brazos, y está en el intervalo desde 2 al máximo número de sitios de unión en el agente núcleo. Cada ramificación puede ser la misma o diferente y puede terminar, por ejemplo, con éteres y/o ésteres. El número de brazos m puede estar en el intervalo desde tres a un centenar o más, y uno o más de los grupos hidroxilo terminales se puede acoplar al remanente del compuesto de insulina, o de cualquier otra forma someterse a modificación química.

7.2.3 Porciones lipofílicas

35 En modalidades, las porciones modificadoras incluyen una o más porciones lipofílicas. La porción lipofílica puede ser porciones alquilo.

40 La porción alquilo puede ser saturada o insaturada, lineal, ramificada, o una cadena de hidrocarburos cíclicos. En algunas modalidades, la porción alquilo tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más átomos de carbono. Los ejemplos incluyen porciones alquilo saturadas, lineales tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo y eicosilo; porciones alquilo ramificada saturadas tales como isopropilo, *sec*-butilo, *ter*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metil-pentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo; y porciones alquilo insaturadas derivadas a partir de las porciones alquilo saturadas anteriores que incluyen, pero sin limitarse a, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. En otras modalidades, la porción alquilo es una porción alquilo inferior. Todavía en otra modalidades, la porción alquilo es una porción alquilo inferior C_1 a C_3 . En algunas modalidades, la porción modificadora específicamente no consiste de una porción alquilo, o específicamente no consiste de una porción alquilo inferior, o específicamente no consiste de una porción alcano, o específicamente no consiste de una porción alcano inferior.

50 Los grupos alquilo pueden ser sustituidos o no sustituidos con uno o más sustituyentes, y tales sustituyentes preferentemente ya sea no interfieren con los métodos de síntesis de los conjugados o eliminan la actividad biológica de los conjugados. La funcionalidad potencialmente interferente puede bloquearse adecuadamente con un grupo protector para hacer a la funcionalidad no-interferente. Cada sustituyente puede sustituirse opcionalmente con sustituyentes adicionales no-interferentes. El término "no-interferente" caracteriza los sustituyentes que no eliminan la factibilidad de cualquier reacción a realiza de acuerdo con el proceso de esta invención.

Otros ejemplos de porciones modificadoras adecuadas incluyen $-C(CH_2OH)_3$; $-CH(CH_2OH)_2$; $-C(CH_3)_3$; $-CH(CH_3)_2$.

60 7.2.4 Porciones anfífilas

En algunas modalidades, la porción modificadora incluye una porción anfífilica. Muchos polímeros y oligómeros son anfífilicos. Estos son a menudo co-polímeros bloqueadores, copolímeros ramificados o co-polímeros injertados que

incluyen porciones hidrofílicas y lipofílicas, que pueden estar en forma de oligómeros y/o polímeros, tales como polímeros o co-polímeros de cadenas lineales, ramificados, o injertados.

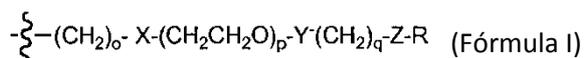
5 Las porciones anfílicas modificadoras pueden incluir combinaciones de cualquiera de las porciones lipofílicas e hidrofílicas descritas en la presente descripción. Tales porciones modificadoras típicamente incluyen al menos un grupo reactivo funcional, por ejemplo, halo, hidroxilo, amina, tiol, ácido sulfónico, ácido carboxílico, isocianato, epoxi, éster, y similares, que está a menudo en el extremo terminal de la porción modificadora. Estos grupos funcionales reactivos se pueden usar para unir un grupo lipofílico lineal o ramificado alquil, alqueno, alquino, arilalquilo, o alquilarilo, o un polímero u oligómero lipofílico, y de ese modo aumentar la lipofilicidad de la porción modificadora (y de ese modo hacerlas generalmente anfílicas).

7.2.5 Porciones modificadoras PAG-alquilo

15 La porción modificadora puede ser una porción polimérica lineal o ramificada que tiene una o más porciones PAG lineales o ramificadas y/o una o más porciones alquilo lineales o ramificadas, sustituidas o no sustituidas. En ciertos casos, tales porciones se consideran anfílicas; sin embargo, las porciones PAG y alquilo pueden variarse para hacer tales porciones más lipofílicas o más hidrofílicas. En ciertas modalidades, la porción modificadora específicamente no consiste de una porción alquilo y en otras modalidades, la porción modificadora específicamente no consiste de una porción alcano.

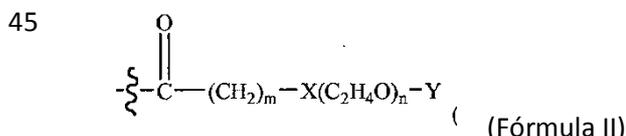
20 Las porciones PAG incluyen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 subunidad PEGs. En algunas modalidades las porciones alquilo preferentemente tienen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 átomos de carbono. Las porciones alquilo son preferentemente porciones alcano. La porción modificadora puede incluir una porción de cubierta, tal como -OCH₃. Más aun, la porción modificadora puede incluir un grupo hidrofóbico, tal como un grupo pivaloilo.

25 En una modalidad, la porción modificadora tiene una fórmula:



30 donde, independientemente, o y q son 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50, y p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y al menos uno de o, p y q es al menos 2. X, Y y Z se seleccionan independientemente de -C-, -O-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NH-NHC(O)-, y -C(O)NH-, y R es H o un alquilo, preferentemente un alquilo inferior, con mayor preferencia metilo. Las variables o, p y q se seleccionan preferentemente para producir una porción modificadora hidrofílica o anfílica, y se seleccionan preferentemente en relación al compuesto de insulina para producir un conjugado de compuesto de insulina hidrofílico o anfílico, preferentemente un monoconjugado, diconjugado o triconjugado. En una modalidad preferida para un conjugado de compuesto de insulina que se usa para el mantenimiento del compuesto de insulina basal, o, p y q se seleccionan para producir un PAG que es proximal al compuesto de insulina y una porción alquilo que es distal al compuesto de insulina. Alternativamente, O, P y Q se pueden seleccionar para producir un PAG que es distal al compuesto de insulina y un alquilo que es proximal a la insulina. En una modalidad alternativa, R es un grupo pivaloilo o un grupo alquilo-pivaloilo.

En una modalidad relacionada, la porción modificadora tiene una fórmula:

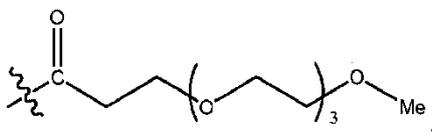


donde m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 y n es desde 2 hasta 10, X es -C-, -O-, -C(O)-, -NH-, -NHC(O)-, o -C(O)NH-, y Y es alquilo inferior o -H. X es preferentemente O y Y es preferentemente -CH₃. En algunos casos el grupo carbonilo (-C(O)-) puede estar ausente, y la porción -(CH₂-) puede acoplarse a un grupo disponible sobre un amino ácido, tales como un grupo hidroxilo o un grupo ácido carboxílico libre.

55 En una modalidad preferida, la porción modificadora tiene una estructura seleccionada de las siguientes:

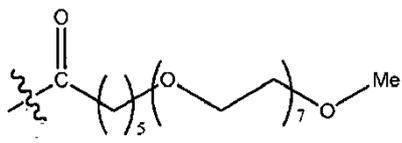
60

5



y (cuando la porción modificadora inmediatamente precedente se acopla a insulina humana en B29, el monoconjugado resultante se denomina IN105).

10



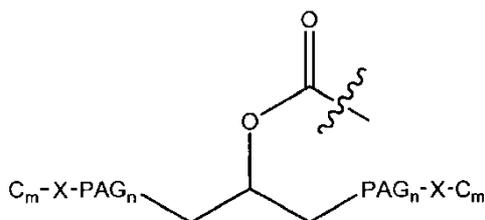
15

(cuando la porción modificadora inmediatamente precedente se acopla a insulina humana en B29, el monoconjugado resultante se denomina HIM2). Cualquiera de las anteriores porciones pueden, por ejemplo, acoplarse a insulina humana en un residuo nucleofílico, por ejemplo, A1, B1 o B29. En algunos casos el grupo carbonilo (-C(O)-) puede estar ausente o remplazarse con una porción alquilo, preferentemente una porción alquilo inferior, y la porción -(CH₂)- puede acoplarse a un grupo disponible en un amino ácido, tal como un grupo hidroxilo o un grupo ácido carboxílico libre.

20

En otra modalidad, la porción modificadora tiene una fórmula:

25



30

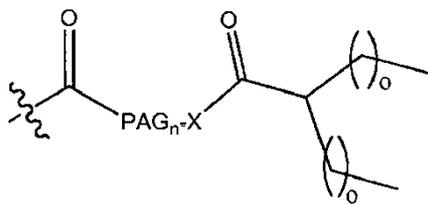
(Fórmula III)

35

donde cada C se selecciona independientemente y es una porción alquilo que tiene m carbonos y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20; y cada PAG se selecciona independientemente y es una porción PAG que tiene n subunidades y n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; cada X se selecciona independientemente y es una porción enlazadora que acopla PAG a C, y es preferentemente -C-, -O-, -C(O)-, -NH-, -NHC(O)-, o -C(O)NH-. En algunas modalidades la porción C_m-X está ausente, y la porción PAG_n termina con una porción -OH o una porción -OCH₃. Por ejemplo, el PAG puede ser un PAG terminado en metoxi o terminado en hidroxilo, que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 subunidades PAG, que incluyen subunidades PEG, PPG, y/o PBG. En algunos casos el grupo carbonilo (-C(O)-) puede remplazarse con una porción alquilo, preferentemente una porción alquilo inferior, que puede acoplarse a un grupo disponible en un amino ácido, tal como un grupo hidroxilo o un grupo ácido carboxílico libre.

40

45



50

(Fórmula IV)

55

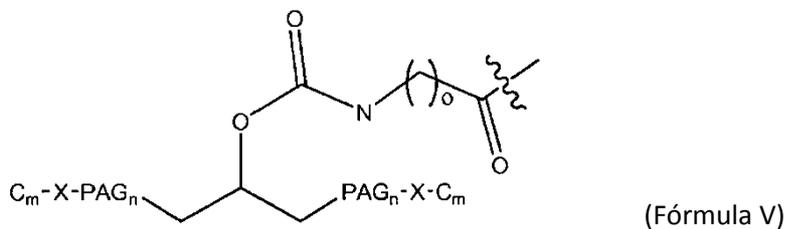
La porción modificadora puede, por ejemplo, tener una fórmula:

60

donde cada C se selecciona independientemente y es una porción alquilo que tiene m carbonos y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20; y cada PAG se selecciona independientemente y es una porción PAG que tiene n subunidades y n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; X es -O-, o -NH-; cada o se selecciona independientemente y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. Por ejemplo, el PAG puede tener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 subunidades PEGs. En algunos casos el grupo carbonilo (-C(O)-) proximal al punto de unión puede estar ausente o remplazarse con

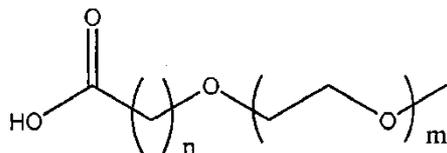
una porción alquilo, preferentemente una porción alquilo inferior, y la porción $-(CH_2)-$ puede acoplarse a un grupo disponible en un amino ácido, tal como un grupo hidroxilo o un grupo ácido carboxílico libre.

La porción modificadora puede, por ejemplo, tener una fórmula:



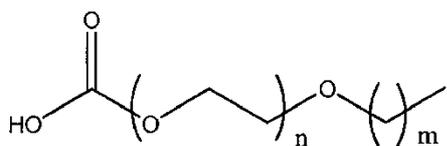
20 donde cada C se selecciona independientemente y es una porción alquilo que tiene m carbonos y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20; y cada PAG se selecciona independientemente y es una porción PAG que tiene n subunidades y n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; cada X se selecciona independientemente y es una porción enlazadora que acopla PAG a C, y es preferentemente $-C-$, $-O-$, $-C(O)-$, $-NH-$, $-NHC(O)-$, o $-C(O)NH-$; cada o se selecciona independientemente y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. En algunas modalidades la porción C_m-X está ausente, y la porción PAG_n termina con una porción $-OH$ o una porción $-OCH_3$. Por ejemplo, el PAG puede ser PAG terminado en metoxi o terminado en hidroxilo, que tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 subunidades PEG. En algunos casos el grupo carbonilo $(-C(O)-)$ proximal al punto de unión puede estar ausente, y la porción $-(CH_2)-$ puede acoplarse a un grupo disponible en un amino ácido, tal como un grupo hidroxilo o un grupo ácido carboxílico libre.

La invención incluye porciones modificadoras que tienen una fórmula:



40 donde n es 1, 2, 3 o 4, y m es 2, 3, 4 o 5.

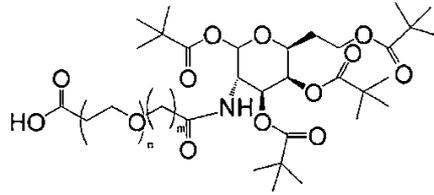
La invención incluye porciones modificadoras que tienen una fórmula:



55 donde n es 2, 3, 4 o 5, y m es 1, 2, 3 o 4.

La invención incluye porciones modificadoras que tienen una fórmula:

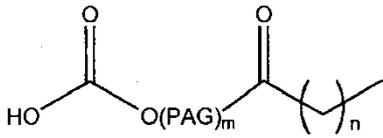
60



(Fórmula IX)

donde m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 y n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

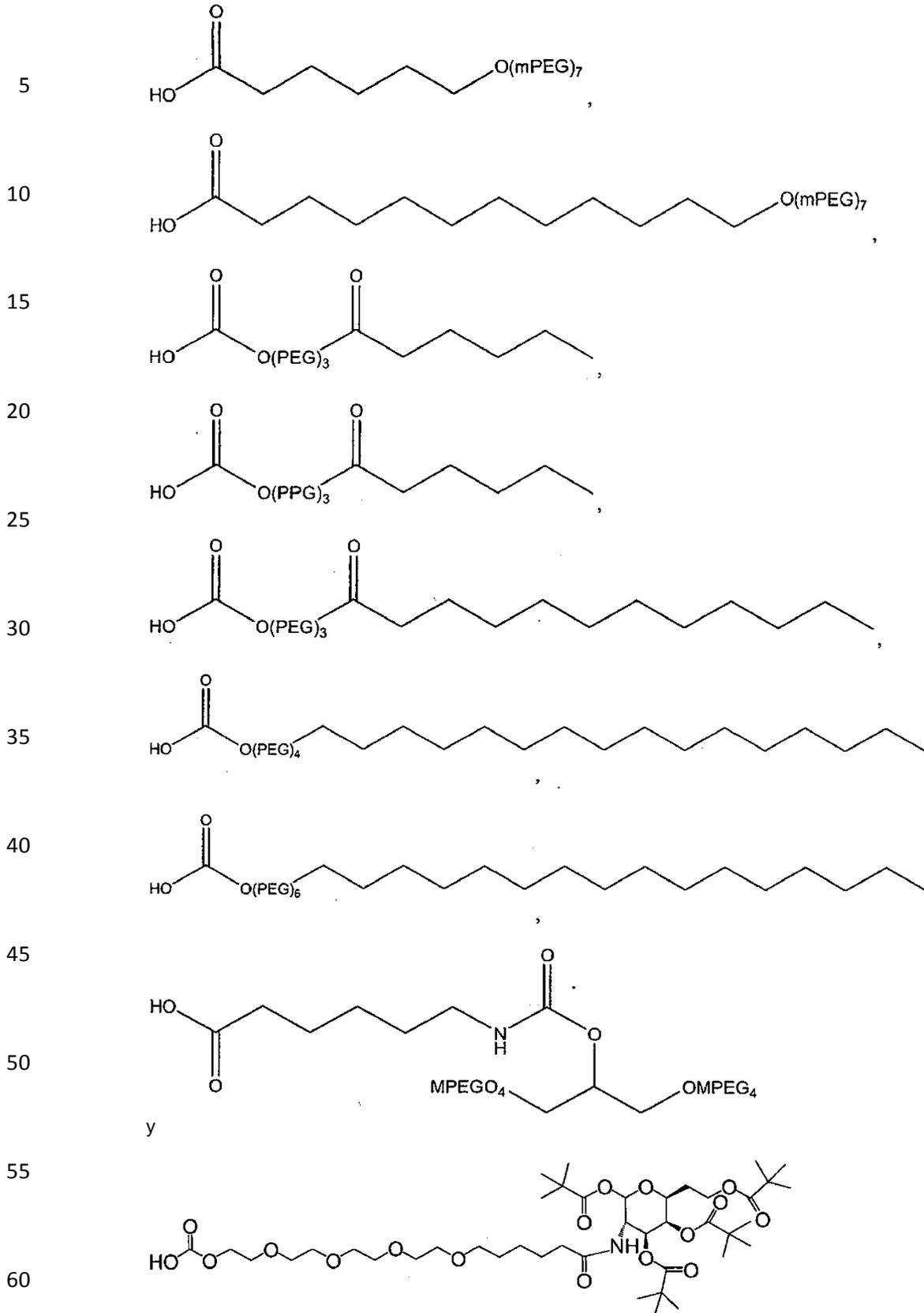
La invención incluye además porciones modificadoras que tienen una fórmula:



(Fórmula X)

donde PAG es una porción PAG que tiene m subunidades y m es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20.

Otras porciones modificadoras preferidas incluyen:



Las características farmacéuticas, tales como hidrofiliidad/lipofiliidad de los conjugados de acuerdo con las modalidades de la invención, pueden variarse por, por ejemplo, el ajuste de las partes lipofílicas e hidrofílicas de las porciones modificadoras, por ejemplo, por el aumento o la disminución del número de monómeros PAG, el tipo y longitud de la cadena alquilo, la naturaleza del enlace PAG-péptido, y el número de sitios de conjugación. La naturaleza exacta del enlace porción modificadora-péptido puede variar de forma tal que es estable y/o sensible a la hidrólisis a pH fisiológico o en el plasma. La invención además incluye cualquiera de las porciones modificadoras anteriores acopladas a un polipéptido, preferentemente al compuesto de insulina. Preferentemente, la porción modificadora hace al polipéptido más soluble que un polipéptido correspondiente no conjugado, por ejemplo, por un multiplicador de al menos 1.05, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, o 15. Una porción modificadora de la invención se acopla a un compuesto de insulina, tal como una insulina humana, en un punto de unión disponible del residuo nucleofílico B29.

Además, se apreciará que un aspecto de la invención incluye nuevas porciones modificadoras, tales como pero sin limitarse a las porciones de fórmulas VII y VIII, en una forma ácido carboxílico. Más aun, donde la porción modificadora incluye un grupo carboxilo, se puede convertir a un anhídrido mixto y reacciona con un grupo amino de un péptido para crear un conjugado que contiene un enlace amida. En otro procedimiento, el grupo carboxilo se puede tratar con carbodiimida soluble en agua y reaccionar con el péptido para producir conjugados que contienen enlaces amida. Consecuentemente, la invención incluye formas activadas de las porciones nuevas presentadas en la presente descripción, tales como formas activadas de las porciones modificadoras de las fórmulas VII y VIII y otros nuevos oligómeros de la invención, tales como carbodiimidias, anhídridos mixtas, o N-hidroxisuccinimidias.

En algunos casos, la porción modificadora puede acoplarse al polipéptido a través de un amino ácido o serie de 2 o más amino ácidos acoplados al C-terminal, o una cadena lateral del polipéptido. Por ejemplo, la porción modificadora puede acoplarse al -OH o -C(O)OH de Thr, y la Thr mm-modificada se acopla a un polipéptido en el terminal carboxi. Así, por ejemplo, la porción modificadora se acopla al -OH o -C(O)OH de Thr, y la Thr modificada se acopla al amino ácido B29 (por ejemplo, a B29 Lys para la insulina humana) del compuesto de insulina des-Thr. En otro ejemplo, el mm se acopla al -OH o -C(O)OH de la Thr de un octapéptido terminal de la cadena B del compuesto de insulina, y el octapéptido mm-modificado se acopla al amino ácido B22 del compuesto de insulina des-octa. Otras variaciones resultarán evidentes a los experimentados en la materia a la luz de esta especificación.

7.2.6 Porciones formadoras de sal

En algunas modalidades, la porción modificadora comprende una porción formadora de sal. La porción formadora de sal puede ser varias porciones formadoras de sal adecuadas como se entenderá por aquellos con experiencia en la materia que incluyen, pero sin limitarse a, carboxilato y amonio. En algunas modalidades donde la porción modificadora incluye una porción formadora de sal, el conjugado de compuesto de insulina se proporciona en forma de sal. En estas modalidades, el conjugado de compuesto de insulina se asocia con un contraión adecuado farmacéuticamente aceptable como se entenderá por aquellos con experiencia en la materia que incluyen, pero sin limitarse a, iones negativos tales como cloro, bromo, yodo, fosfato, acetato, carbonato, sulfato, tosilato, y mesilato, o iones positivos tales como sodio, potasio, calcio, litio, y amonio.

Los ejemplos anteriores de porciones modificadoras pretenden ser ilustrativos y no deben tomarse como limitantes en ninguna forma. Un experto en la materia reconocerá que porciones adecuadas para conjugación para lograr una funcionalidad particular serán posibles dentro de límites de los mecanismos de conjugación química descritos y reivindicados en la presente descripción. Por lo tanto, se pueden seleccionar y usar porciones adicionales de acuerdo con los principios descritos en la presente descripción.

7.3 Estrategias de conjugación

Factores tales como el grado de conjugación con porciones modificadoras, la selección de los sitios de conjugación en la molécula y la selección de porciones modificadoras pueden variar para producir un conjugado que, por ejemplo, es menos susceptible a la degradación *in vivo*, y así, tiene una vida media en el plasma aumentada. Por ejemplo, los compuestos de insulina se pueden modificar para incluir una porción modificadora en uno, dos, tres, cuatro o más sitios en la estructura del compuesto de insulina estructura en una unión adecuada (es decir, conjugación de la porción modificadora) sitios adecuados para facilitar la asociación de una porción modificadora de la misma. A manera de ejemplo, tales sitios de conjugación adecuados pueden comprender un residuo de amino ácido, tal como un residuo de amino ácido lisina.

En algunas modalidades, los conjugados de compuesto de insulina son monoconjugados. En otras modalidades, los conjugados de compuesto de insulina son multi-conjugados, tales como di-conjugados, tri-conjugados, tetra-conjugados, penta-conjugados y similares. El número de porciones modificadoras en el compuesto de insulina se limita solamente por el número de sitios de conjugación en el compuesto de insulina. Todavía en otras modalidades, los conjugados de compuesto de insulina son una mezcla de mono-conjugados, di-conjugados, tri-conjugados, tetra-conjugados, y/o penta-

conjugados. Las estrategias de conjugación preferidas son aquellas que rinden un conjugado que relaciona alguna o toda la actividad biológica del compuesto de insulina parental.

5 Posibles sitios de unión incluyen N-terminal de A1, N-terminal de B1, y cadena lateral de la lisina de B29, específicamente el B29 monoconjugado y B1, B29 diconjugados, con la presente invención dirigida al B29 monoconjugado. Otro punto de unión es una funcionalidad amino en un componente C-péptido o un componente péptido líder del compuesto de insulina.

10 Una o más porciones modificadoras (es decir, una sola o una pluralidad de estructuras de porción modificadora) puede acoplarse al compuesto de insulina. Las porciones modificadoras en la pluralidad son preferentemente la misma. Sin embargo, debe entenderse que las porciones modificadoras en la pluralidad pueden ser diferentes unas de otras, o, alternativamente, algunas de las porciones modificadoras en la pluralidad pueden ser la misma y algunas pueden ser diferentes. Cuando una pluralidad de porciones modificadoras se acoplan al compuesto de insulina, puede ser preferible
15 acoplar una o más de las porciones modificadoras al compuesto de insulina con enlaces hidrolizables y acoplar una o más de las porciones modificadoras al compuesto de insulina con enlaces no-hidrolizables. Alternativamente, todos los enlaces que acoplan la pluralidad de porciones modificadoras al compuesto de insulina pueden ser hidrolizables pero tener diferentes grados de hidrolizabilidad tal que, por ejemplo, una o más de las porciones modificadoras pueden eliminarse relativamente rápido del compuesto de insulina por hidrólisis en el cuerpo y una o más de las porciones modificadoras se elimina más lentamente del compuesto de insulina por hidrólisis en el cuerpo.

20 7.3.1 Acoplamiento de la porción modificadora al compuesto de insulina

La porción modificadora se acopla preferentemente covalentemente al compuesto de insulina. Más de una porción en la porción modificadora puede acoplarse covalentemente al compuesto de insulina. El acoplamiento puede emplear
25 enlaces hidrolizables y no hidrolizables o mezclas de los dos (es decir, diferentes enlaces en diferentes sitios de conjugación).

En algunas modalidades, el compuesto de insulina se acopla a la porción modificadora por medio del uso de un enlace hidrolizable (por ejemplo, un enlace éster, carbonato o carbamato hidrolizable). El uso de acoplamiento hidrolizable
30 proporcionará un conjugado de compuesto de insulina que actúa como un profármaco. Un enfoque profármaco puede ser deseable donde el conjugado compuesto de insulina-porción modificadora es inactivo (es decir, el conjugado carece de la habilidad de afectar el cuerpo mediante el mecanismo de acción primario del compuesto de insulina), tal como cuando el sitio de conjugación de la porción modificadora está en la región de enlace del compuesto de insulina. El uso de un acoplamiento puede además proporcionar un efecto de liberación en el tiempo o liberación controlada, al administrar el compuesto de insulina durante un período de tiempo dado a medida que una o más porciones
35 modificadoras se clivan de sus respectivos conjugados de compuesto de insulina-porción modificadora para proporcionar el fármaco activo.

En otras modalidades, el compuesto de insulina se acopla a la porción modificadora por medio del uso de un enlace no-hidrolizable (por ejemplo, un enlace no-hidrolizable carbamato, amida, o éter). El uso de un enlace no-hidrolizable puede ser preferible cuando es deseable permitir que cantidades terapéuticamente significativas del conjugado de compuesto de insulina circulen en el flujo sanguíneo por un extenso período de tiempo, por ejemplo, al menos 2 horas después de la administración. Los enlaces usados para acoplar covalentemente el compuesto de insulina a la porción modificadora de un modo no-hidrolizable se seleccionan típicamente del grupo que consiste de enlace(s) covalente, porciones éster, porciones carbonato, porciones carbamato, porciones amida y porciones amina secundaria.

La porción modificadora puede acoplarse al compuesto de insulina en varios residuos nucleofílicos, que incluyen, pero sin limitarse a, funciones hidroxilo y/o funciones amino nucleofílicas. Las funciones hidroxilo nucleofílicas se pueden encontrar, por ejemplo, en los residuos serina y/o tirosina, y las funciones amino nucleofílicas se pueden encontrar, por
50 ejemplo, en los residuos histidina y/o Lys, y/o en una o más cadenas A o B del N-terminal del compuesto de insulina. Cuando una porción modificadora se acopla al N-terminal del péptido natriurético, el acoplamiento forma preferentemente una amina secundaria.

La porción modificadora puede acoplarse al compuesto de insulina en un grupo -SH libre, por ejemplo, por la formación de un enlace tioéster, tioéter o sulfonato.

La porción modificadora puede acoplarse al compuesto de insulina a través de uno o más grupos amino. Los ejemplos en insulina humana incluyen los grupos amino en A1, B1 y B29. En una modalidad, una sola porción modificadora se acopla a un solo grupo amino en el compuesto de insulina. En otro arreglo, dos porciones modificadoras se conectan
60 cada una a un grupo amino diferente en el compuesto de insulina. Un ejemplo de dos porciones modificadoras acopladas a dos grupos amino es el acoplamiento en B1 y B29. Donde hay múltiples polímeros, los polímeros pueden ser todos iguales o uno o más de los polímeros pueden ser diferentes de los otros. Varios métodos y tipos de acoplamiento de polímeros a compuestos de insulina se describen en solicitud de patente de los Estados Unidos Núm.

09/873,899, titulada "Mezclas de conjugados de compuesto de insulina que comprenden polialquilen glicol, usos de estas, y métodos de hacer las mismas," presentada el 4 de julio de 2001. Todavía en otras modalidades, se puede usar un enfoque de profármaco parcial, en el que una parte de la porción modificadora se hidroliza. Por ejemplo, ver la patente de los Estados Unidos 6,309,633 a Ekwuribe y otros (cuya descripción completa se incorpora en la presente descripción por referencia), que describe porciones modificadoras que tienen componentes hidrofílicos y lipofílicos en los que el componente lipofílico se hidroliza *in vivo* para producir un conjugado micropegilado.

7.3.2 Selección de la porción modificadora y propiedades del conjugado insulina- compuesto y complejos de este

La porción modificadora se puede seleccionar para proporcionar los atributos deseados al conjugado de compuesto de insulina y los complejos de este. Las porciones modificadoras preferidas se seleccionan para hacer al compuesto de insulina más solubles en una solución acuosa que la solubilidad acuosa del compuesto de insulina en ausencia de la porción modificadora, preferentemente al menos 1.05, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, o 15 veces más soluble que el compuesto de insulina parental (es decir, el compuesto de insulina correspondiente no conjugado) en una solución acuosa. Por ejemplo, la insulina humana nativa que no forma complejo tiene una solubilidad de ~18mg/ml a un pH de aproximadamente 7.4. Los inventores sorprendentemente descubrieron un método de formar complejos de conjugados de insulina humana que son más solubles que la insulina humana por un multiplicador de al menos 1.05, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, o 15.

En ciertas modalidades, la porción modificadora se selecciona para rendir un conjugado de compuesto de insulina que tenga una solubilidad acuosa que excede 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 20 g/L, 50 g/L, 100 g/L, o incluso 150 g/L a un pH en el intervalo desde aproximadamente 4 a aproximadamente 8, preferentemente un pH en el intervalo desde aproximadamente 5 a aproximadamente 7.5, idealmente a un pH de aproximadamente 7.4.

El conjugado de compuesto de insulina puede ser más biodisponible oralmente en un mamífero que un control científicamente aceptable, tal como un compuesto de insulina correspondiente no conjugado. En otras modalidades, el conjugado de compuesto de insulina es más biodisponible oralmente en un humano que un control científicamente aceptable, tal como un compuesto de insulina correspondiente no conjugado. En ciertas modalidades, la absorción del conjugado de compuesto de insulina, por ejemplo, según se mide por los niveles en el plasma del conjugado, es al menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, o 4 veces mayor que la absorción de un compuesto de insulina control no conjugado.

Se apreciará que mientras en algunos aspectos de la invención la porción modificadora se selecciona para hacer al conjugado de compuesto de insulina más soluble que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado, en otros aspectos la porción modificadora puede además o alternativamente seleccionarse para hacer al conjugado de compuesto de insulina igualmente o más hidrofílico que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado. Más aun, la porción modificadora se puede seleccionar para hacer al conjugado de compuesto de insulina más anfifílico que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado.

En algunas modalidades, el complejo conjugado de compuesto de insulina-catión es igualmente soluble en agua o más soluble en agua que (a) un conjugado de compuesto de insulina correspondiente que no forma complejo, (b) un compuesto de insulina correspondiente que no forma complejo y no está conjugado, y/o (c) un compuesto de insulina correspondiente que forma complejo pero no está conjugado.

En una modalidad preferida, la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición de Zn^{++} . En algunas modalidades, la porción modificadora se selecciona para hacer al conjugado de compuesto de insulina igualmente o más soluble que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado, y la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición de zinc. En otras modalidades, la porción modificadora se selecciona para hacer al conjugado de compuesto de insulina igualmente o más soluble que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado, la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición de zinc, y la solubilidad en agua del complejo de catión es mayor que la solubilidad en agua del compuesto de insulina. En otro aspecto, el conjugado de compuesto de insulina es un compuesto de insulina acilado de ácido graso, el catión es zinc, y la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición del zinc. Todavía en otra modalidad, el conjugado de compuesto de insulina es un compuesto de insulina acilado de ácido graso que es igualmente o más soluble en agua que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado, el catión es zinc, y la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición del zinc.

En ciertas modalidades preferidas, la lipofilidad del conjugado de compuesto de insulina en relación al compuesto de insulina correspondiente parental es 1 o menos que 1. La lipofilidad relativa del conjugado de compuesto de insulina en comparación al compuesto de insulina correspondiente parental (k_{rel}) puede, por ejemplo, determinarse como sigue: $k_{rel} = (t_{conjugado} - t_0)/(t_{humano} - t_0)$, donde la lipofilidad relativa se mide en una columna de cromatografía líquida de alta resolución LiChroSorb RP18 (5µm, 250 X 4 mm) por elusión isocrática a 40 °C. Las siguientes mezclas se pueden usar como eluyentes: 0.1M amortiguador sodio fosfato a pH 7.3 que contiene 10% acetonitrilo, y 50% acetonitrilo en agua. El

tiempo muerto (t_0) se identifica por la inyección de 0.1 mM nitrato de sodio. El tiempo de retención para la insulina humana se ajusta a al menos $2t_0$ por la variación de la relación entre las mezclas de (c)(i) y (c)(ii). Preferentemente, en estas modalidades, la lipofilicidad relativa es aproximadamente igual a 1 o es menos que 1 o prácticamente menos que 1. En una modalidad preferida, el compuesto de insulina es insulina humana, y la lipofilicidad relativa es menos que 1. Preferentemente la lipofilicidad relativa es menos que aproximadamente 0.99, 0.98, 0.97, 0.96, 0.95, 0.94, 0.93, 0.92, 0.91, o 0.90. La discusión de las técnicas para determinar la solubilidad y/o lipofilicidad de la insulina y los conjugados de insulina se exponen en la patente de los Estados Unidos 5,750,499 titulada "Insulina acilada" concedida a Harelund y otros, el 12 de mayo de 1998, cuya descripción completa se incorpora en la presente descripción por referencia.

En una modalidad, la lipofilicidad relativa es como se describe anteriormente y la porción modificadora es una cadena de carbono que tiene 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 carbonos, en donde la cadena comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 grupos oxi insertados en la misma. En otra modalidad, la lipofilicidad relativa es como se describe anteriormente y la porción modificadora es una cadena de carbono que tiene 5, 6, 7, 8, 9 o 10 carbonos, en donde la cadena de carbono comprende 2, 3 o 4 grupos oxi insertados en la misma. En una modalidad relacionada, la lipofilicidad relativa es como se describe anteriormente y la porción modificadora comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades polialcalen glicol. En otra modalidad relacionada, la lipofilicidad relativa es como se describe anteriormente y la porción modificadora comprende 1, 2 o 3 unidades de polietilenglicol y 1, 2 o 3 unidades de polipropilenglicol.

7.4 Componente catión metálico y características de los complejos

Los complejos de conjugado de compuesto de insulina-catión incluyen un catión metálico. Los cationes metálicos adecuados para usar como el componente catión incluyen cualquier catión metálico capaz de formar complejos, agregar, o cristalizar con el conjugado de compuesto de insulina. Se prefiere que el catión metálico forme un complejo con el conjugado de compuesto de insulina. Se pueden usar cationes simples o múltiples. El catión es preferentemente no significativamente oxidante para el conjugado de compuesto de insulina, es decir, no oxidante al extremo de que los complejos se inutilicen para sus propósitos previstos.

En algunas modalidades, el catión metálico es biocompatible. Un catión metálico es biocompatible si el catión presenta efectos perjudiciales no excesivamente significativos en el cuerpo del receptor, tales como una reacción inmunológica significativa en el sitio de reacción. Sin embargo, se apreciará que en algunas circunstancias, el riesgo de toxicidad y otros efectos perjudiciales pueden compensarse por los beneficios de la composición de conjugado de compuesto de insulina-catión, y por lo tanto pueden ser aceptables bajo tales circunstancias.

La idoneidad de los cationes metálicos para la estabilización de agentes biológicamente activos y la relación de catión metálico a agente biológicamente activo necesaria se puede determinar por el experto en la materia por la realización de una variedad de pruebas para estabilidad tales como electroforesis en gel de poliacrilamida, focalización isoelectrónica, cromatografía de fase reversa, y análisis HPLC sobre partículas de agentes biológicamente activos estabilizados por catión metálico antes de y a continuación de la reducción de tamaño y/o encapsulación de las partículas .

El componente catión metálico adecuado incluye uno o más cationes metálicos monovalentes, divalentes, o trivalentes, o combinaciones de estos. En una modalidad preferida, el catión metálico es un catión metálico del Group II o de transición. Ejemplos de cationes divalentes adecuados incluyen Zn^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} , Fe^{++} , Ni^{++} , Cu^{++} , Co^{++} y/o Mg^{++} . Donde se incluye un catión monovalente, es preferentemente Na^+ , Li^+ , o K^+ . El catión se adiciona preferentemente como una sal, tal como una sal cloruro o acetato, los más preferidos son $ZnCl_2$ y $ZnAc$.

La relación molar de conjugado de compuesto de insulina a catión es típicamente entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:100, preferentemente entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:12, y con mayor preferencia entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1: 7 o aproximadamente 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, o 1:7. En una modalidad particular, el Zn^{++} se usa como componente catión, se proporciona a una relación molar componente catión de zinc a conjugado de compuesto de insulina de aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:100, preferentemente entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:12, y con mayor preferencia entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:7 o aproximadamente 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, o 1:7.

El componente catión es preferentemente mayor que aproximadamente 90% un catión simple, tal como el Zn^{++} . Preferentemente, el catión es mayor que aproximadamente 95%, 99%, o 99.9% Zn^{++} .

Preferentemente la resistencia del conjugado de compuesto de insulina que forma complejo a la degradación por quimotripsina es mayor que la degradación por quimotripsina del conjugado de compuesto de insulina correspondiente *que no forma complejo*. Preferentemente la resistencia del conjugado de compuesto de insulina que forma complejo a la degradación por quimotripsina es mayor que la degradación por quimotripsina del compuesto de insulina correspondientes *que forma complejo pero no está conjugado*.

El conjugado de compuesto de insulina que forma complejo puede ser más biodisponible oralmente en un mamífero que

5 un control científicamente aceptable, tal como un conjugado de compuesto de insulina correspondiente *no complejo*. En otras modalidades, el conjugado de compuesto de insulina que forma complejo es más biodisponible oralmente en un humano que un control científicamente aceptable, tal como un conjugado de compuesto de insulina correspondiente que no forma complejo. En ciertas modalidades, la absorción del conjugado de compuesto de insulina que forma complejo, por ejemplo, según se mide por los niveles en el plasma del conjugado, es al menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, o 4 veces mayor que la absorción de un conjugado de compuesto de insulina que no forma complejo.

10 El conjugado de compuesto de insulina que forma complejo, puede ser más biodisponible oralmente en un mamífero que un control científicamente aceptable, tal como un compuesto de insulina correspondiente *que forma complejo pero no está conjugado*. En otras modalidades, el conjugado de compuesto de insulina que forma complejo es más biodisponible oralmente en un humano que un control científicamente aceptable, tal como un compuesto de insulina correspondiente que forma complejo pero no está conjugado. En ciertas modalidades, la absorción del conjugado de compuesto de insulina que forma complejo, por ejemplo, según se mide por los niveles en el plasma del conjugado, es al menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, o 4 veces mayor que la absorción de un compuesto de insulina que forma complejo pero no está conjugado.

7.5 Agentes formadores de complejos.

20 En algunas modalidades, las composiciones de conjugado de compuesto de insulina-cación incluyen uno o más agentes formadores de complejos. Ejemplos de agentes formadores de complejos adecuados para usar en la presente invención incluyen protaminas, surfen, proteínas globinas, espermina, espermidina albúmina, amino ácidos, ácidos carboxílicos, compuestos polímeros policatiónicos, polipéptidos catiónicos, polipéptidos aniónicos, nucleótidos, y antisentido. Ver Brange, J., Galénicos de compuesto de insulina, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1987), cuya descripción completa se incorpora en la presente descripción por referencia. La idoneidad de los agentes formadores de complejos para la estabilización de las composiciones se puede determinar por el experto en la materia a la luz de la presente descripción. En algunas modalidades, las composiciones de conjugado de compuesto de insulina-cación específicamente excluyen o están prácticamente desprovistos de un agente formador de complejos.

30 Un agente formador de complejos preferido es la protamina. En una forma sólida, la protamina estará presente preferentemente en una relación molar de compuesto de insulina a protamina aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:3, con mayor preferencia una relación molar de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2, idealmente una relación molar de aproximadamente 1:1. En algunas modalidades, las composiciones del conjugado de compuesto de insulina-cación específicamente excluyen o están prácticamente desprovistas de protamina.

35 Los amino ácidos se pueden usar además como agentes formadores de complejos, por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, fenil alanina, prolina, triptófano, asparagina, ácido glutámico, e histidina, y oligopéptidos, tales como diglicina.

40 Los ácidos carboxílicos son además adecuados para usar como agentes formadores de complejos; los ejemplos incluyen ácido acético, y ácidos hidroxicarboxílicos, tales como ácido cítrico, 3-ácido hidroxibutírico, y ácido láctico.

7.6 Agentes estabilizantes

45 En algunas modalidades, las composiciones conjugado compuesto de insulina-cación incluyen uno o más agentes estabilizantes. Los agentes estabilizantes que se prefieren incluyen compuestos fenólicos y compuestos aromáticos. Los compuestos fenólicos que se prefieren son fenol, m-cresol y m-parabeno o mezclas de los mismos. El agente estabilizante se puede proporcionar en cualquier cantidad que mejore la estabilidad de las composiciones conjugado compuesto de insulina-cación con relación a un control científicamente aceptable, tal como una composición conjugado compuesto de insulina-cación correspondiente en ausencia del agente estabilizante.

50 7.7 Presentación de Complejos

Los compuestos pueden proporcionarse como un sólido seco, tal como un polvo sustancialmente puro de conjugado compuesto de insulina-cación, o un polvo que incluye un conjugado compuesto de insulina-cación sólido junto con otros componentes farmacéuticamente aceptables. Los complejos pueden proporcionarse además en un estado disuelto en un medio acuoso u orgánico, y/o como sólidos no disueltos en tales medios.

7.7.1 Composiciones Sólidas

60 El complejo conjugado compuesto de insulina-cación puede proporcionarse como un sólido. El sólido puede, por ejemplo estar en un estado seco o en un estado no disuelto en una solución acuosa, disolvente orgánico, emulsión, microemulsión, o en otra forma no seca.

5 En una modalidad, el complejo conjugado compuesto de insulina-catión se proporciona como una composición sólida procesada pura. En una composición sólida procesada pura, la relación molar del conjugado de compuesto de insulina al catión es típicamente de aproximadamente 3:4 a aproximadamente 3:0.5 (conjugado de compuesto de insulina:catión), de aproximadamente 3:3.5 a aproximadamente 3:1, o de manera ideal de aproximadamente 3:1.

10 En una composición de tipo T sólida pura procesada (con catión, conjugado de compuesto de insulina y sin protamina), la relación molar del conjugado de compuesto de insulina al catión es típicamente de aproximadamente 3:4 a aproximadamente 3:0.5 (conjugado de compuesto de insulina:catión), de aproximadamente 3:3.5 a aproximadamente 3:1, o de manera ideal de aproximadamente 3:1. En una composición de protamina tipo T sólida pura procesada (con catión, conjugado de compuesto de insulina y protamina), la relación molar del conjugado de compuesto de insulina al catión es típicamente de aproximadamente 3:6 a aproximadamente 3:0.5 (conjugado de compuesto de insulina:catión), de aproximadamente 3:5 a aproximadamente 3:1, o de manera ideal de aproximadamente 3:2.

15 En una composición de tipo R sólida pura procesada (lenta) (con catión, composición de insulina y compuesto estabilizante (por ejemplo, un compuesto fenólico), y sin protamina), la relación molar del conjugado de compuesto de insulina al catión puede estar típicamente en el intervalo de aproximadamente 3:4.5 a aproximadamente 3:0.9, preferentemente de aproximadamente 3:3.9 a aproximadamente 3:2.4. En una composición de tipo R sólida pura procesada (ultralenta) (con catión, composición de insulina y compuesto estabilizante (por ejemplo, un compuesto fenólico), y sin protamina), la relación molar del conjugado de compuesto de insulina al catión puede estar típicamente en el intervalo de aproximadamente 3:12 a más de aproximadamente 3:4.5, preferentemente de aproximadamente 3:9 a aproximadamente 3:4.8, con mayor preferencia de aproximadamente 3:6 a aproximadamente 3:5.4. En una composición de protamina tipo R sólida pura procesada (con catión, composición de insulina y compuesto estabilizante (por ejemplo, un compuesto fenólico), y protamina), la relación molar del conjugado de compuesto de insulina al catión puede estar típicamente en el intervalo de aproximadamente 3:12 a aproximadamente 3:3, preferentemente de aproximadamente 3:9 a aproximadamente 3:4.5, con mayor preferencia de aproximadamente 3:6.9 a aproximadamente 3:5.4.

25 Para un catión monovalente, tal como Na^+ , el sólido se espera que tenga una relación conjugado de compuesto de insulina al catión de aproximadamente 3:6 a aproximadamente 3:3.

30 Las composiciones sólidas de la invención pueden, por ejemplo, incluir composiciones, tales como polvos, que incluyen conjugados de compuestos de insulina y/o complejos conjugados compuesto de insulina-catión de la invención. Preferentemente las composiciones sólidas se proporcionan a un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable, es decir, libres de contaminantes que podrían disminuir inaceptablemente la idoneidad de las composiciones para su uso en seres humanos.

35 En algunas modalidades, se proporcionan composiciones en las cuales el componente conjugado de compuesto de insulina-catión es en más de aproximadamente 90% cristalino, preferentemente en más de aproximadamente 95% cristalino, con mayor preferencia en más de aproximadamente 99% cristalino. En otras modalidades, se proporcionan composiciones en las cuales el componente conjugado de compuesto de insulina-catión es en más de aproximadamente 90% sólidos amorfos, preferentemente en más de aproximadamente 95% sólidos amorfos, con mayor preferencia en más de aproximadamente 99% sólidos amorfos.

40 Aún en otras modalidades, se proporcionan composiciones en las cuales el componente conjugado de compuesto de insulina-catión está presente en una mezcla de sólidos amorfos y sólidos cristalinos. Por ejemplo, la relación de sólido amorfo a sólido cristalino puede ser de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1, o aproximadamente 1:9 a aproximadamente 9:1, o aproximadamente 1:8 a aproximadamente 8:1, o aproximadamente 1:7 a aproximadamente 7:1, o aproximadamente 1:6 a aproximadamente 6:1, o aproximadamente 1:5 a aproximadamente 5:1, o aproximadamente 1:4 a aproximadamente 4:1, o aproximadamente 1:3 a aproximadamente 3:1, o aproximadamente 1:2 a aproximadamente 2:1, o aproximadamente 1:1.

45 Además, pueden proporcionarse composiciones mediante la utilización de mezclas de sólidos del compuesto de insulina-catión con diferentes compuestos de insulina, tales como un sólido que incluye el compuesto de insulina nativa con un sólido que incluye conjugados de compuesto de insulina, o sólidos que incluyen un conjugado de compuesto de insulina con un sólido que incluye un conjugado de compuesto de insulina diferente.

50 Por otra parte, el tipo de sólido y el compuesto de insulina/componente conjugado de compuesto de insulina pueden todos variar. Por ejemplo, pueden proporcionarse composiciones que incluyan cristales de compuestos de insulina-Zn mediante la utilización de conjugados de compuestos de insulina nativa y de compuestos de insulina amorfos, o pueden proporcionarse composiciones que incluyan sólidos de compuestos de insulina-Zn amorfos mediante la utilización de conjugados de compuestos de insulina-Zn cristalinos y de compuestos de insulina nativa. Tales mezclas se pueden utilizar para lograr variaciones en las características físicas, tales como el perfil de disolución y/o variaciones en el perfil farmacocinético.

5 El tamaño medio de partícula de los sólidos está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 micras, más preferentemente de 1-50 micras, aún más preferentemente de 1-25 micras, de manera ideal de 1-15 micras: Tamaños de partícula pequeños pueden obtenerse por condiciones de microcristalización, secado por aspersión, molienda, secado al vacío, liofilización y similares.

10 En una modalidad la composición, cuando se seca, contiene más de aproximadamente 96% p/p de conjugado de compuesto de insulina y de aproximadamente 0.05, 0.1, 0.15, o 0.2 a aproximadamente 4% p/p de zinc. En otra modalidad la composición, cuando se seca, contiene más de aproximadamente 91% p/p de conjugado de compuesto de insulina, de aproximadamente 0.05, 0.1, 0.15, o 0.2 a aproximadamente 4% p/p de zinc, y de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 5% p/p de fenol. Aún en otra modalidad la composición, cuando se seca, contiene más de aproximadamente 82% p/p de conjugado de compuesto de insulina, de aproximadamente 0.05, 0.1, 0.15, o 0.2 a aproximadamente 4% p/p de zinc, de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 14 % p/p de protamina. Aún en otra modalidad la composición, cuando se seca, contiene más de aproximadamente 71% p/p de conjugado de compuesto de insulina, de aproximadamente 0.05, 0.1, 0.15, o 0.2 a aproximadamente 4% p/p de zinc, de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 14 % p/p de protamina, y de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 15% p/p de fenol.

20 En otra modalidad la composición, cuando se seca, incluye de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2% p/p de Zn^{++} , y de aproximadamente 0.08 a aproximadamente 1% p/p de fenol, preferentemente de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 1.3% p/p de Zn^{++} , y de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.7% p/p fenol, con mayor preferencia de más de o igual a 1 a aproximadamente 3.5% p/p de Zn^{++} , y de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3% p/p de fenol, y aún con mayor preferencia de más de o igual a 1.3 a aproximadamente 2.2% p/p de Zn^{++} , y de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 2% p/p de fenol.

25 Los complejos pueden proporcionarse en una preparación tipo-lenta. Por ejemplo, en una preparación tipo lenta seca que se prefiere, el Zn se proporciona en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2% p/p y el fenol está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0.08 a aproximadamente 1% p/p, el % p/p restante es de conjugado de compuesto de insulina. De manera ideal, para una preparación tipo lenta seca que se prefiere, el Zn se proporciona en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 1.3% p/p y el fenol está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.7% p/p, el % p/p restante es conjugado de compuesto de insulina.

35 Los complejos pueden proporcionarse en una preparación tipo ultralenta. Por ejemplo, en una preparación tipo ultralenta seca que se prefiere, el Zn se proporciona en una cantidad en el intervalo de mayor que o igual a 1 a aproximadamente 3.5% p/p, y el fenol está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3% p/p, el % p/p restante es de conjugado de compuesto de insulina. De manera ideal, para una preparación tipo ultralenta seca el Zn se proporciona en una cantidad en el intervalo de mayor que o igual a 1.3 a aproximadamente 2.2% p/p, y el fenol está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 2% p/p, el % p/p restante es de conjugado de compuesto de insulina.

40 7.7.2 Composiciones Líquidas

45 Los complejos conjugado compuesto de insulina-cación pueden proporcionarse como componentes no disueltos de un líquido. Por ejemplo, el líquido puede ser una solución acuosa que incluye un conjugado compuesto de insulina-cación como un precipitado, o el conjugado compuesto de insulina-cación puede proporcionarse como un componente de una suspensión, emulsión o microemulsión. El líquido también puede incluir complejos o componentes disueltos, junto con los componentes no disueltos.

50 7.7.3 Mezclas y Co-cristales

Las composiciones de la invención pueden, por ejemplo, incluir mezclas complejas, mezclas sólidas, complejos híbridos y co-cristales.

55 Así, por ejemplo, la invención proporciona composiciones que incluyen dos o más conjugados de compuestos de insulina y/o compuestos de insulina no conjugados. Más aun, cuando las composiciones incluyen sólidos, los sólidos pueden tener diferentes formas. Así, por ejemplo, un sólido puede ser cristalino y otro sólido puede ser un sólido amorfo. Como se indicó en otros lugares, los sólidos se pueden proporcionar en una forma seca o se pueden proporcionar como componentes sólidos de una mezcla líquida. En una modalidad que se prefiere, la mezcla de la invención incluye dos o más conjugados de compuestos de insulina diferentes, y los conjugados de compuestos de insulina diferentes tienen diferentes solubilidades. En una modalidad, uno de los complejos comprende un conjugado de compuesto de insulina lipofílico y el otro comprende un conjugado de compuesto de insulina hidrofílico. En aún otra modalidad, los complejos pueden incluir diferentes conjugados de compuestos de insulina, donde uno o más de los complejos tiene una vida media de circulación de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 horas, y uno o más de los complejos tiene una vida

media de circulación que es significativamente mayor que la vida media de circulación del primer complejo. En una modalidad relacionada, uno de los complejos tiene un perfil de acción rápida y otro de los complejos tiene un perfil de acción media a prolongada. De manera adicional, uno de los complejos puede tener el perfil adecuado para el control basal del compuesto de insulina mientras que otro tiene un perfil adecuado para el control de glucosa post-prandial. Las mezclas que se prefieren son mezclas de insulina y HIM2, mezclas de HIM2 y IN105, mezclas de IN105 y de compuestos de insulina, mezclas de IN105 y de insulina acilada de ácido graso, mezclas de insulina acilada de ácido graso y HIM2. Las insulinas aciladas de ácido graso adecuadas se describen en las siguientes patentes de los Estados Unidos: patente de los Estados Unidos 6,531,448, titulada "Insoluble compositions for controlling blood glucose," concedida 11-Mar-03; patente de los Estados Unidos RE37,971, titulada "Selective acylation of epsilon-amino groups," concedida 28-Ene-03; patente de los Estados Unidos 6,465,426, titulada "Insoluble insulin compositions," concedida 15-Oct-02; patente de los Estados Unidos 6,444,641, titulada "Fatty acid-acylated insulin analogs," concedida 03-Sep-02; patente de los Estados Unidos 6,335,316, titulada "Method for administering acylated insulin," concedida 01-Ene-02; patente de los Estados Unidos 6,268,335, titulada "Insoluble insulin compositions," concedida 31-Jul-01; patente de los Estados Unidos 6,051,551, titulada "Method for administering acylated insulin," concedida 18-Abr-00; patente de los Estados Unidos 5,922,675, titulada "Acylated Insulin Analogs," concedida 13-Jul-99; patente de los Estados Unidos 5,700,904, titulada "Preparation of an acylated protein powder," concedida 23-Dic-97; patente de los Estados Unidos 5,693,609, titulada "Acylated insulin analogs Granted," concedida 02-Dec-97; patente de los Estados Unidos 5,646,242, titulada "Selective acylation of epsilon-amino groups," concedida 08-Jul-97; patente de los Estados Unidos 5,631,347, titulada "Reducing gelation of a fatty acid-acylated protein," concedida 20-May-97; patente de los Estados Unidos 6,451,974, titulada "Method of acylating peptides and novel acylating agents," concedida 17-Sep-02; patente de los Estados Unidos 6,011,007, titulada "Acylated insulin," concedida 04-Ene-00; patente de los Estados Unidos 5,750,497, titulada "Acylated insulin Granted: 12-May-98; patente de los Estados Unidos 5,905,140, titulada "Selective acylation method," concedida el 18 de mayo de 1999; patente de los Estados Unidos 6,620,780, titulada "Insulin derivatives," concedida el 16 de sep. de 2003; patente de los Estados Unidos 6,251,856, titulada "Insulin derivatives," concedida el 26 de junio de 2001; patente de los Estados Unidos 6,211,144, titulada "Stable concentrated insulin preparations for pulmonary delivery," concedida el 3 de abril de 2001; patente de los Estados Unidos 6,310,038, titulada "Pulmonary insulin cristales," concedida el 30 de octubre de 2001; y patente de los Estados Unidos 6,174,856, titulada "Stabilized insulin compositions," concedida el 16 de enero de 2001. De manera especial se prefieren insulinas aciladas de mono-ácidos grasos que tienen ácidos grasos de 12, 13, 14, 15, o 16 carbonos unidos covalentemente a la Lys (B29) de la insulina humana.

En una modalidad, la invención proporciona un co-cristal que tiene dos conjugados de compuestos de insulinas y/o compuestos de insulina diferentes. Preferentemente el co-cristal exhibe una o más de las siguientes características: disolución sustancialmente homogénea, una sola curva de disolución *in vivo*, y/o un solo pico en el perfil farmacodinámico. Los co-cristales que se prefieren son co-cristales de insulina y HIM 2, co-cristales de IN105 y HIM 2, co-cristales de IN105 y de compuesto de insulina.

En una modalidad, el co-cristal incluye insulina humana, y la co-cristalización con insulina humana reduce la solubilidad del cristal con relación a la solubilidad de un cristal correspondiente del conjugado de compuesto de insulina. En otra modalidad, el co-cristal incluye insulina humana, y la co-cristalización con insulina humana disminuye la solubilidad del cristal con relación a la solubilidad de un cristal correspondiente del conjugado de compuesto de insulina.

En otra modalidad, el co-cristal incluye un conjugado de compuesto de insulina de acción rápida, aclaramiento rápido, y/o altamente potente, y un conjugado de compuesto de insulina de acción prolongada, aclaramiento lento y/o poco potente. Preferentemente, el co-cristal tiene un perfil PK/PD adecuado para el control de glucosa post-prandial o para el control basal durante toda la noche del compuesto de insulina.

En otra modalidad, la invención proporciona una mezcla o co-cristal en la que un conjugado de compuesto de insulina se incluye con la insulina humana o la insulina lispro. Las mezclas de la invención pueden incluir dos conjugados de compuesto de insulina diferentes. Las mezclas pueden incluir un conjugado de compuesto de insulina y un compuesto de insulina no conjugado. Las mezclas pueden incluir diferentes conjugados de compuesto de insulina con diferentes compuestos de insulina.

Más aun, la invención proporciona complejos que tienen dos conjugados de compuesto de insulina diferentes y/o un conjugado de compuesto de insulina y un compuesto de insulina no conjugado. La invención proporciona co-cristales híbridos de dos, tres o más conjugados de compuesto de insulina diferentes. La invención proporciona un complejo que tiene un conjugado de compuesto de insulina con un compuesto de insulina no conjugado. La invención proporciona un co-cristal con dos o más conjugados de compuesto de insulina hidrofílicos diferentes; dos o más diferentes conjugados de compuesto de insulina hidrofóbicos diferentes; dos o más conjugados de compuesto de insulina anfífilicos diferentes; un conjugado de compuesto de insulina hidrofílico y un conjugado de compuesto de insulina lipofílico; un conjugado de compuesto de insulina hidrofílico y un conjugado de compuesto de insulina no conjugado; HIM2 junto con un compuesto de insulina no conjugado; IN105 junto con un compuesto de insulina no conjugado; HIM2 junto con IN105; HIM2 junto con un compuesto de insulina e IN105; y otras combinaciones de los elementos anteriores. Como se mencionó en otra

parte, los complejos pueden proporcionarse como sólidos secos, como complejos disueltos en solución y/o como complejos no disueltos en la solución. Varias combinaciones pueden, por ejemplo, emplearse para proporcionar un complejo o co-cristal que tenga un perfil extendido.

5 7.8 Solubilidad de los Complejos de la Invención

10 Preferentemente la solubilidad acuosa del complejo conjugado compuesto de insulina-cación a un pH de aproximadamente 7.4 es de aproximadamente 1/15, 1/14, 1/13, 1/12, 1/11, 1/10, 1/9, 1/8, 1/7, 1/6, 1/5 hasta aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o <10 veces la solubilidad acuosa del conjugado de compuesto de insulina que no forma complejo. Cualquier combinación de los límites superiores e inferiores anteriores está dentro del alcance de la invención. Sin embargo, se prefiere un intervalo de aproximadamente 1/15 a <5, se prefiere más de aproximadamente 1/10 a aproximadamente 2, lo ideal es de aproximadamente 1/10 a <0. En un aspecto particularmente sorprendente de la invención, la solubilidad acuosa del conjugado de compuesto de insulina-cación en solución a un pH de aproximadamente 7.4 a frecuentemente es sustancialmente menor que la solubilidad acuosa del conjugado de compuesto de insulina en solución a un pH de aproximadamente 7.4. Sin embargo, se apreciará que en ciertas modalidades, la solubilidad acuosa del conjugado de compuesto de insulina-cación en solución a un pH de aproximadamente 7.4 puede ser la misma que, mayor que, o sustancialmente mayor que, la solubilidad acuosa del conjugado de compuesto de insulina en solución a un pH de aproximadamente 7.4.

20 En una modalidad sorprendente, la solubilidad acuosa del complejo conjugado compuesto de insulina-cación a un pH de aproximadamente 7.4 es sustancialmente menor que la solubilidad del conjugado de compuesto de insulina que no forma complejo correspondiente en solución a un pH de aproximadamente 7.4, y el complejo conjugado compuesto de insulina-cación se mantiene soluble a más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 o 130 g/L en solución acuosa a través de un intervalo de pH que comienza a aproximadamente 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.1, o 6.9 y termina en aproximadamente 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, u 8.9. Aún en otra modalidad, la solubilidad acuosa del complejo conjugado compuesto de insulina-cación a un pH de aproximadamente 7.4 es sustancialmente menor que la solubilidad del conjugado de compuesto de insulina correspondiente en solución a un pH de aproximadamente 7.4, y el complejo conjugado compuesto de insulina-cación se mantiene soluble a más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 o 130 g/L en solución acuosa a través de un intervalo de pH de aproximadamente 5.8 a aproximadamente 8.5, preferentemente a través de un intervalo de pH de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8, con mayor preferencia a través de un intervalo de pH de aproximadamente 6.9 a aproximadamente 7.8.

35 Preferentemente, los conjugados de compuesto de insulina de la invención se seleccionan para producir cristales en solución acuosa a un pH que es igual a $pI \pm$ aproximadamente 2.5, donde la concentración del conjugado de compuesto de insulina es de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, con mayor preferencia de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, y la formulación del cristal comienza a ocurrir a aproximadamente 3, 4 o 5% p/p/ de cación al conjugado de compuesto de insulina, donde el cación es preferible Z^{++} . Preferentemente, los cristales están presentes para un monoconjugado sin protamina en una solución acuosa a un pH en el intervalo de aproximadamente 4, 4.1, 4.2, 4.3 o 4.4 a aproximadamente 5.2., 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 o 5.8, preferentemente a pH de aproximadamente 4 to <6.5, preferentemente de aproximadamente 4 a <5.8, preferentemente de aproximadamente 4.2 a aproximadamente 5.5, con mayor preferencia de aproximadamente 4.4 a aproximadamente 5.2. Preferentemente, los cristales están presentes para un diconjugado sin protamina a pH de aproximadamente 3.5 a <5.8, de preferencia de aproximadamente 3.8 a aproximadamente 5.5, con mayor preferencia de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 5.2. Preferentemente, los cristales están presentes para un triconjugado sin protamina a pH de aproximadamente 3 a <5.5, preferentemente de aproximadamente 3.3 a aproximadamente 5, con mayor preferencia de aproximadamente 3.8 a aproximadamente 4.8.

50 7.8.1 Complejos tipo R

Preferentemente, la solubilidad acuosa del complejo de Zn tipo R del conjugado de compuesto de insulina a un pH de aproximadamente 7.4 tiene un intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 20 a aproximadamente 130 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 30 a aproximadamente 110 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 35 a aproximadamente 60 g/L.

60 Preferentemente, la solubilidad acuosa del complejo de Zn tipo R del conjugado de compuesto de insulina *con protamina* a un pH de aproximadamente 7.4 tiene un intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 110 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 20 a aproximadamente 85 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 30 a aproximadamente 70 g/L.

7.8.2 Complejos tipo T

Preferentemente, la solubilidad acuosa del complejo de Zn tipo T del conjugado de compuesto de insulina a un pH de aproximadamente 7.4 tiene un intervalo de aproximadamente 30 a aproximadamente 175 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 160 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 70 a aproximadamente 150 g/L.

Preferentemente, la solubilidad acuosa del complejo de Zn tipo T del conjugado de compuesto de insulina *con protamina* a un pH de aproximadamente 7.4 tiene un intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 20 a aproximadamente 130 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 30 a aproximadamente 110 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 35 a aproximadamente 60 g/L.

7.8.3 Complejos Tipo NPH

Preferentemente, la solubilidad acuosa del complejo tipo NPH, del conjugado de compuesto de insulina a un pH de aproximadamente 7.4 tiene un intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 5 a aproximadamente 120 g/L, aún con mayor preferencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 90 g/L.

7.9 Propiedades Farmacéuticas

La complejación del conjugado de compuesto de insulina con un catión generalmente resulta en mejores propiedades farmacéuticas del conjugado de compuesto de insulina, en relación a un control científicamente aceptable, tal como un conjugado de compuesto de insulina que no forma complejo correspondiente.

En algunos casos, el conjugado de compuesto de insulina complejado exhibirá un perfil de PK extendido o alterado de otra manera en relación a un control científicamente aceptable, tal como un conjugado de compuesto de insulina que no forma complejo correspondiente. En ciertos casos, el perfil de pK exhibirá un perfil lispro-similar. El perfil de pK se puede evaluar mediante la utilización de experimentos estándares *in vivo*, por ejemplo, en ratones, ratas, perros y seres humanos. Los ensayos que se describen en la presente invención para evaluar los atributos de los complejos de conjugado de compuesto de insulina-catión son un aspecto de la invención.

Los complejos pueden exhibir una estabilidad química mejorada. Diversos atributos de estabilidad pueden evaluarse mediante la exposición del complejo a diversas condiciones de ensayo tales como presencia de plasma, presencia de proteasas, presencia de homogeneizado de hígado, presencia de condiciones ácidas, y presencia de condiciones básicas. La estabilidad se mejora con relación al conjugado de compuesto de insulina que no forma complejo cuando la estabilidad del conjugado de compuesto de insulina complejado en una cualquiera o más de estas condiciones de ensayo es mayor que la estabilidad del conjugado de compuesto de insulina que no forma complejo en las mismas condiciones. Un ensayo que se prefiere para determinar la estabilidad en un ambiente ácido implica la exposición del conjugado de compuesto de insulina complejado a una solución que tiene un pH de 2 durante al menos 2 horas, donde la disminución de la degradación del conjugado de compuesto de insulina complejado en relación a un control científicamente aceptable, tal como un conjugado de compuesto de insulina que no forma complejo correspondiente, es indicativo de una estabilidad mejorada. Los ensayos *in vivo* también se pueden utilizar para comprobar la estabilidad. Por ejemplo, la estabilidad del conjugado de compuesto de insulina complejado puede comprobarse por la exposición al tracto gastrointestinal de un sujeto y la comparación con un control adecuado.

7.10 Método de Fabricación

La invención además proporciona un método para fabricar las composiciones de conjugado de insulina-catión que se describen en la presente invención. El método generalmente implica poner en contacto uno o más conjugados de compuesto de insulina, como se describe en la presente invención, con uno o más cationes, como se describe en la presente invención, para formar un sólido.

Para un catión divalente, tal como Zn^{++} , la relación molar del conjugado de compuesto de insulina al catión que se utiliza para preparar la composición en una solución acuosa con una concentración de la composición de insulina en el intervalo de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml puede estar típicamente en el intervalo de aproximadamente 1:15 (conjugado de compuesto de insulina:catión) a aproximadamente 1:0.4, preferentemente de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 1:2.

Para preparar el sólido tipo T (con catión y conjugado de compuesto de insulina y sin protamina) en las condiciones de solución acuosa que se describen anteriormente, la relación molar del conjugado de compuesto de insulina al catión es preferentemente de aproximadamente 1:1.5 a 1:3, de manera ideal de aproximadamente 1:2. Para preparar el sólido tipo R (con catión, composición de insulina y compuesto estabilizante (por ejemplo, un compuesto fenólico), y sin protamina) en las condiciones de solución acuosa que se describen anteriormente, la relación molar del conjugado de

compuesto de insulina al catión es preferentemente de aproximadamente 1:4 a 1:9, preferentemente de aproximadamente 1:7 a aproximadamente 1:9, de manera ideal de aproximadamente 1:8.

5 Para preparar el sólido de protamina tipo T (con catión y conjugado de compuesto de insulina y protamina) en las condiciones de solución acuosa que se describen anteriormente, la relación molar del conjugado de compuesto de insulina al catión es preferentemente de aproximadamente 1:1.5 a 1:9, de manera ideal de aproximadamente 1:2. Para preparar el sólido de protamina tipo R (con catión, composición de insulina y compuesto estabilizante (por ejemplo, un compuesto fenólico), y protamina) en las condiciones de solución acuosa que se describen anteriormente, la relación molar del conjugado de compuesto de insulina al catión es preferentemente de aproximadamente 1:2 a 1:15, preferentemente de aproximadamente 1:7 a aproximadamente 1:9 de manera ideal de aproximadamente 1:8.

15 El conjugado de compuesto de insulina se añade preferentemente al tampón en una cantidad que se calcula para alcanzar una concentración en el intervalo de más de 2 a aproximadamente 100 g/L, preferentemente de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 a aproximadamente 40 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 g/L.

20 Cuando el catión es divalente (por ejemplo, Zn^{++} , Ca^{++}), este se añade preferentemente en una cantidad que se calcula para alcanzar una concentración en el intervalo de aproximadamente 0.04 a aproximadamente 10 g/L, preferentemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 4 g/L. Para los cristales tipo T o cristales de protamina tipo T, la concentración del catión está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0.04 a aproximadamente 1 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.3 g/L. Para los cristales tipo R o cristales de protamina tipo R, la concentración del catión está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 4 g/L.

25 Cuando el catión es monovalente, se añade preferentemente en una cantidad que se calcula para alcanzar una concentración en el intervalo de aproximadamente 0.08 a aproximadamente 40 g/L, preferentemente de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 20 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 0.8 a aproximadamente 16 g/L.

30 El método puede incluir además la combinación de un agente estabilizante con el catión y el conjugado de compuesto de insulina. Los agentes estabilizantes que se prefieren se describen anteriormente. Cuando se utiliza, el agente estabilizante se añade en una cantidad suficiente para proporcionar un mayor grado de formación de sólido que el que se consigue mediante la utilización de los mismos reactivos y condiciones de reacción en ausencia del agente estabilizante. Cuando el agente estabilizante es un compuesto fenólico (por ejemplo, fenol, m-cresol, m-parabeno), se puede añadir una cantidad en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente un 50% p/p, con mayor preferencia de aproximadamente 20 a aproximadamente 40% p/p, aún con mayor preferencia de 25 a aproximadamente 35% p/p. En una modalidad que se prefiere más, el agente estabilizante es un compuesto fenólico (por ejemplo, fenol, m-cresol, m-parabeno), puede añadirse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10% p/p, con mayor preferencia 0.01 a aproximadamente 5% p/p, aún con mayor preferencia de 0.01 a aproximadamente 1% p/p. Así, en una modalidad, el método implica la combinación de un conjugado de compuesto de insulina, un catión y un agente estabilizante en una solución acuosa para producir la composición de conjugado de compuesto de insulina-catión, donde la combinación puede producir complejos y/o sólidos cristalinos o no cristalinos.

45 El método puede incluir además el uso de un agente formador de complejos, tal como protamina, que se combina con el catión y el conjugado de compuesto de insulina, y opcionalmente además incluye un agente estabilizante.

50 Para preparar un sólido en una solución acuosa que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente la protamina se proporciona preferentemente en una cantidad con relación al conjugado de compuesto de insulina de aproximadamente 4 a aproximadamente 45% p/p (protamina/composición de insulina), preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 25% p/p, con mayor preferencia de aproximadamente 9 a aproximadamente 20% p/p, de manera ideal de aproximadamente 10 a aproximadamente 12% p/p. Para los sólidos tipo T, un intervalo que se prefiere de pH es de aproximadamente 5 a aproximadamente 6, con mayor preferencia de aproximadamente 5 a aproximadamente 5.5, aún con mayor preferencia de aproximadamente 5.1 a aproximadamente 5.3, de manera ideal aproximadamente 5.2. Para los sólidos tipo R, un intervalo preferido de pH es de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, con mayor preferencia de aproximadamente 6.2 a aproximadamente 6.8, aún con mayor preferencia de aproximadamente 6.4 a aproximadamente 6.6, de manera ideal aproximadamente 6.5.

60 Los inventores descubrieron sorprendentemente que los complejos de tipo T se pueden convertir en complejos tipo T de protamina en ausencia de un agente estabilizante, tal como fenol. El complejo tipo T se elabora por la complejación del Zn con la molécula de compuesto de insulina en solución acuosa en ausencia de fenol. La protamina se añade después para convertir el complejo tipo T en un complejo tipo T de protamina. Las cantidades y los intervalos de pH son como se describieron anteriormente.

5 Así, en una modalidad, el método implica la combinación del conjugado de compuesto de insulina, un catión y un agente formador de complejos en una solución acuosa para obtener la composición de conjugado de compuesto de insulina-catión, donde la combinación puede producir complejos solubilizados y/o sólidos cristalinos o amorfos. En otra modalidad, el método implica la combinación de un conjugado de compuesto de insulina, un catión, un agente formador de complejos, y un agente estabilizante en una solución acuosa para obtener la composición de conjugado de compuesto de insulina-catión, donde la combinación puede producir complejos solubilizados y/o sólidos cristalinos o amorfos.

10 En algunas modalidades, las composiciones pueden incluir conservantes. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen alcohol bencílico, ésteres del ácido p-hidroxibenzoico, glicerol. Agentes estabilizantes, tales como fenol, m-cresol, y m-parabeno, pueden además utilizarse como conservantes. El glicerol y el fenol se añaden convenientemente juntos para mejorar la efectividad antimicrobiana.

15 Otros componentes útiles en la preparación de los sólidos incluyen agentes isotónicos, tales como NaCl, glicerol, y monosacáridos.

20 Los sólidos de conjugado de compuesto de insulina catión se pueden formar típicamente con relativa rapidez. Por ejemplo, la formación del sólido generalmente se completa dentro de tres días, frecuentemente dentro de 24 horas. Puede ser deseable en algunos casos enlentecer la caída de la reacción con el fin de mejorar la formación de cristales.

25 En una modalidad de la invención, los sólidos se forman a temperatura ambiente (25 °C) sin que se requiera una reducción de la temperatura para inducir la precipitación de sólidos. Por ejemplo, la temperatura ambiente es efectiva para los cristales tipo T y tipo R. La temperatura para la formación del sólido es de aproximadamente 0 a aproximadamente 40 °C, con preferencia de aproximadamente 17 a aproximadamente 30 °C, y aún con mayor preferencia de aproximadamente 22 a aproximadamente 27 °C, de manera ideal aproximadamente 25 °C.

30 En una modalidad, el método incluye la combinación en una solución acuosa de un conjugado de compuesto de insulina y un catión de metal para proporcionar un sólido amorfo o cristalino. La solución acuosa que contiene el conjugado de compuesto de insulina al que el catión se añadirá es preferentemente una solución tamponada que tiene un pH en el intervalo de pI del conjugado de compuesto de insulina +/- aproximadamente 1.5, preferentemente pI +/- aproximadamente 1, con mayor preferencia pI +/- aproximadamente 0.75. Estos intervalos se aplican también a los complejos tipo T, tipo R y de protamina. Sin embargo, para los complejos de protamina neutrales (tipo NPH), el pH que se prefiere es de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.5, con mayor preferencia de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 8. Una vez que se añade el catión metálico, el pH puede cambiar ligeramente, y el pH puede ajustarse para dirigirse a los intervalos de pH que se describieron anteriormente. Con los compuestos fenólicos, puede haber un cambio menor de pH, y un ácido o base se puede utilizar para adaptarse a los intervalos que se prefieren.

40 Los valores de pI de los conjugados de compuesto de insulina requieren típicamente un pH de menos de aproximadamente 7, preferentemente de menos de aproximadamente 6, con mayor preferencia de menos de aproximadamente 5.5. Los monoconjugados de insulina humana con restos modificantes neutrales tienen típicamente un intervalo de pI de aproximadamente 4.75 +/- .25. Para los diconjugados de insulina humana, el intervalo de pI es típicamente 4.25 +/- .25. Para los triconjugados de insulina humana, el intervalo de pI es típicamente 3.5 +/- .25.

45 Ejemplos de sistemas tampón adecuados incluyen el tampón de acetato amónico, tampón de fosfato sódico, tampón tris, mezcla de fosfato sódico y acetato amónico, tampón de acetato sódico, mezcla de acetato sódico y acetato amónico, y tampón de ácido cítrico, y cualquiera de los sistemas tampón anteriores [A] que también contenga etanol y/o acetonitrilo [B] (por ejemplo, en una relación de porcentaje de A:B de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1). Es un aspecto sorprendente de la invención que el sólido de conjugado compuesto de insulina pueda formarse en una mezcla acuosa que contiene un disolvente orgánico, tal como etanol o acetonitrilo.

55 Una característica única de la invención es que adicionalmente a proporcionar complejos de conjugado de compuesto de insulina-catión útiles, la invención además proporciona un método para separar conjugados de compuesto de insulina-catión de compuestos de insulina no conjugados en el proceso de fabricación. En este proceso, los conjugados de compuesto de insulina-catión se pueden precipitar fuera de la solución y el compuesto de insulina no conjugado que se solubilizó puede eliminarse por filtración, por ejemplo. Esta característica elimina 2 pasos en la fabricación de conjugados de compuesto de insulina: la etapa de concentración y la etapa de liofilización.

60 La composición sólida pura que se procesó puede formarse mediante la utilización de técnicas estándares, tales como la centrifugación y/o filtración, seguidas de lavado (por ejemplo, con etanol/agua), y la liofilización o secado al vacío. Múltiples lavados se pueden utilizar para ajustar el contenido de fenol y/o de cationes.

7.11 Formulación

Los complejos se pueden formular para la administración en un vehículo farmacéutico de acuerdo con técnicas que se conocen. Véase, por ejemplo, Alfonso R. Gennaro, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (junio 2003), y Howard C. Ansel, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 7ª ed. (octubre 1999).

Los complejos, típicamente en la forma de un sólido cristalino o amorfo, se pueden combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente en la composición farmacéutica y no debe ser excesivamente perjudicial para el sujeto, con relación al beneficio que se proporciona por el(los) ingrediente(s) activo(s). El vehículo puede ser un sólido o un líquido, o ambos. Se formula preferentemente como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, una tableta. La forma de dosificación unitaria puede, por ejemplo, contener de aproximadamente 0.01 o 0.5% a aproximadamente 95% o 99% en peso del complejo compuesto de insulina-cación. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse por cualquiera de las técnicas que se conocen bien de farmacia, lo que incluye, pero sin limitarse a, la mezcla de los componentes, lo que incluye opcionalmente uno o más ingredientes accesorios.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas adecuadas incluyen las que se fabrican para la administración oral, rectal, por inhalación (por ejemplo, a través de un aerosol) bucal (por ejemplo, sub-lingual), vaginal, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarticular, intrapleural, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, o intravenosa), tópicas, superficies de las mucosas (incluyendo superficies de las vías respiratorias), superficies nasales, y administración transdérmica. La ruta más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y la gravedad de la afección que se trata y de la naturaleza de los complejos componente de insulina-cación particulares que se utilicen. Las composiciones orales que se prefieren son composiciones que se preparan para la ingestión por el sujeto. De manera ideal, las composiciones orales se preparan para sobrevivir o sobrevivir sustancialmente al paso a través del estómago y para disolverse de manera completa o sustancialmente de manera completa en el intestino para la entrega del ingrediente activo. Los ejemplos de sistemas transdérmicos adecuados incluyen ultrasonidos, iontoforética, y sistemas de suministro por parche.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones de ácidos grasos que comprenden uno o más ácidos grasos C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ or C₁₀ saturados o insaturados y/o sales de tales ácidos grasos. Los ácidos grasos que se prefieren son caprílico, cáprico, mirístico y láurico. Las sales de ácidos grasos que se prefieren son sales sódicas de ácido caprílico, cáprico, mirístico y láurico.

Las composiciones de ácidos grasos que se prefieren incluyen un único ácido graso o una sal de ácido graso única y no incluyen cantidades sustanciales de otros ácidos grasos o sales de ácidos grasos. En un aspecto de la invención, el contenido de ácido graso de la composición es mayor que aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, o 99.9% p/p de un solo ácido graso. En otra modalidad, el contenido de ácido graso de la composición está dentro de un intervalo que tiene un límite inferior de aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, or 3.0 % p/p, y tiene un límite superior de aproximadamente 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10.0, 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9, 11.0, 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5, 11.6, 11.7, 11.8, 11.9, o 12.0 % p/p. Aún en otra modalidad, el contenido de ácido graso de la composición está dentro de un intervalo que tiene un límite inferior de aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, o 3.0 % p/p, y tiene un límite superior de aproximadamente 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10.0, 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9, 11.0, 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5, 11.6, 11.7, 11.8, 11.9, o 12.0 % p/p, y el contenido de ácido graso de la composición es mayor que aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, o 99.9% p/p de un solo ácido graso.

Los componentes activos de estas formulaciones pueden incluir proteínas y/o péptidos complejados o no complejados, conjugados o no conjugados. Las proteínas y/o péptidos que se prefieren son los que se describen en la presente invención. Los conjugados que se prefieren son los que se describen en la presente invención. Los complejos que se prefieren son los que se describen en la presente invención. Las composiciones orales que se prefieren son composiciones que se preparan para el ingestión por el sujeto. De manera ideal, las composiciones orales se preparan para sobrevivir o sobrevivir sustancialmente al paso a través del estómago y para disolverse de manera completa o sustancialmente de manera completa en el intestino para el suministro del ingrediente activo. La formulación puede en algunos casos incluir un recubrimiento entérico, y en algunos casos, la formulación excluirá específicamente un recubrimiento entérico. La composición se proporciona preferentemente como una tableta, polvo, cápsula de gelatina dura o cápsula de gelatina blanda, aunque otras formas que se describen en la presente invención son adecuadas también.

Las composiciones de ácidos grasos de la invención pueden incluir insulinas aciladas de ácidos grasos. Los ejemplos de insulinas aciladas de ácidos grasos adecuadas se describen en las siguientes patentes de los Estados Unidos: patente de los Estados Unidos 6,531,448, titulada "Insoluble compositions for controlling blood glucose," concedida 11-Mar-03; patente de los Estados Unidos RE37,971, titulada "Selective acylation of epsilon-amino groups," concedida 28-Ene-03; patente de los Estados Unidos 6,465,426, titulada "Insoluble insulin compositions," concedida 15-Oct-02; patente de los Estados Unidos 6,444,641, titulada "Fatty acid-acylated insulin analogs," concedida 03-Sep-02; patente de los Estados Unidos 6,335,316, titulada "Method for administering acylated insulin," issued 01-Ene-02; patente de los Estados Unidos 6,268,335, titulada "Insoluble insulin compositions," concedida 31-Jul-01; patente de los Estados Unidos 6,051,551, titulada "Method for administering acylated insulin," concedida 18-Abr-00; patente de los Estados Unidos 5,922,675, titulada "Acylated Insulin Analogs," concedida 13-Jul-99; patente de los Estados Unidos 5,700,904, titulada "Preparation of an acylated protein powder," concedida 23-Dic-97; patente de los Estados Unidos 5,693,609, titulada "Acylated insulin analogs Granted," concedida 02-Dic-97; patente de los Estados Unidos 5,646,242, titulada "Selective acylation of epsilon-amino groups," concedida 08-Jul-97; patente de los Estados Unidos 5,631,347, titulada "Reducing gelation of a fatty acid-acylated protein," concedida 20-May-97; patente de los Estados Unidos 6,451,974, titulada "Method of acylating peptides and novel acylating agents," concedida 17-Sep-02; patente de los Estados Unidos 6,011,007, titulada "Acylated insulin," concedida 04-Ene-00; patente de los Estados Unidos 5,750,497, titulada "Acylated insulin Concedida: 12-May-98; patente de los Estados Unidos 5,905,140, titulada "Selective acylation method," concedida el 18 de mayo de 1999; patente de los Estados Unidos 6,620,780, titulada "Insulin derivatives," concedida el 16 de sep.de 2003; patente de los Estados Unidos 6,251,856, titulada "Insulin derivatives," concedida el 26 de junio de 2001; patente de los Estados Unidos 6,211,144, titulada "Stable concentrated insulin preparations for pulmonary delivery," concedida el 3 de abril de 2001; patente de los Estados Unidos 6,310,038, titulada "Pulmonary insulin cristales," concedida el 30 de octubre de 2001; y patente de los Estados Unidos 6,174,856, titulada "Stabilized insulin compositions," concedida el 16 de enero de 2001. Se prefieren de manera especial las insulinas monoaciladas de ácidos grasos que tienen ácidos grasos de 12, 13, 14, 15, o 16 carbonos unidos covalentemente a Lys(B29) de la insulina humana.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden presentarse en unidades discretas, tales como cápsulas, sellos para medicamentos, pastillas o tabletas, que contienen cada uno una cantidad predeterminada de la mezcla de conjugados de compuesto de insulina; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión aceite-en-agua o agua-en-aceite. Tales formulaciones se pueden preparar por cualquier método adecuado de farmacia que incluya la etapa de poner en asociación la mezcla de conjugados de compuesto de insulina y un vehículo adecuado (que puede contener uno o más ingredientes accesorios como se señaló anteriormente). Las formulaciones pueden incluir suspensiones de sólidos, conjugados de compuesto de insulinas-cación complejados, ingrediente activo no complejado (por ejemplo, componente de insulina nativa, conjugados de compuesto de insulina), y mezclas de los anteriores.

En general, las composiciones farmacéuticas de la invención se preparan por mezcla uniforme e íntima los complejos con un vehículo sólido o líquido, o ambos, y después, si es necesario, conformando la mezcla resultante. Por ejemplo, una tableta puede prepararse mediante la compresión o moldeo de un polvo o gránulos que contengan la mezcla de conjugados de compuesto de insulina, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas se pueden preparar al comprimir en una máquina adecuada, la mezcla en una forma de flujo libre, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglomerante, lubricante, diluyente inerte, y/o agente(s) activo(s) de superficie/dispersantes. Las tabletas moldeadas pueden fabricarse por moldeo, en una máquina adecuada, de la composición en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración bucal (sublingual) incluyen pastillas que comprenden la mezcla de conjugados de compuesto de insulina en una base saborizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; y pastillas que comprenden la mezcla de conjugados de compuesto de insulina en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia. Ejemplos de formulaciones adecuadas se pueden encontrar en la publicación de las patentes de los Estados Unidos núms. 20030229022 ("Pharmaceutical formulation"); 20030236192 ("Method of modifying the release profile of sustained release compositions"); 20030096011 ("Method of producing submicron particles of a labile agent and use thereof"); 20020037309 ("Process for the preparation of polymer-based sustained release compositions"); 20030118660 ("Residual solvent extraction method and microparticles produced thereby"); así como también las patentes de los Estados Unidos 6,180,141 ("Composite gel microparticles as active principle carriers"); 6,737,045 ("Methods and compositions for the pulmonary delivery of insulin compound"); 6,730,334 ("Multi-arm block copolymers as drug delivery vehicles"); 6,685,967 ("Methods and compositions for pulmonary delivery of insulin compound"); 6,630,169 ("Particulate delivery systems and methods of use"); 6,589,560 ("Stable glassy state powder formulations; 6,592,904 ("Dispersible macromolecule compositions and methods for their preparation and use"); 6,582,728 ("Spray drying of macromolecules to produce inhaleable dry powders"); 6,565,885 ("Methods of spray drying pharmaceutical compositions"); 6,546,929 ("Dry powder dispersing apparatus and methods for their use"); 6,543,448 ("Apparatus and methods for dispersing dry powder medicaments"); 6,518,239 ("Dry powder compositions having improved dispersivity"); 6,514,496 ("Dispersible antibody compositions and methods for their preparation and

5 use"); 6,509,006 ("Devices compositions and methods for the pulmonary delivery of aerosolized medicaments"); 6,433,040("Stabilized bioactive preparations and methods of use"); 6,423,344("Dispersible macromolecule compositions and methods for their preparation and use"); 6,372,258 ("Methods of spray-drying a drug and a hydrophobic amino acid"); 6,309,671 ("Stable glassy state powder formulations"); 6,309,623 ("Stabilized preparations for use in metered dose inhalers"); 6,294,204 ("Method of producing morphologically uniform microcapsules and microcapsules produced by this method"); 6,267,155("Powder filling systems, apparatus and methods"); 6,258,341 ("Stable glassy state powder formulations"); 6,182,712 ("Power filling apparatus and methods for their use"); 6,165,463 ("Dispersible antibody compositions and methods for their preparation and use"); 6,138,668 ("Method and device for delivering aerosolized medicaments"); 6,103,270 ("Methods and system for processing dispersible fine powders"); 6,089,228 ("Apparatus and methods for dispersing dry powder medicaments"); 6,080,721 ("Pulmonary delivery of active fragments of parathyroid hormone"); 6,051,256("Dispersible macromolecule compositions and methods for their preparation and use"); 6,019,968 ("Dispersible antibody compositions and methods for their preparation and use"); 5,997,848 ("Methods and compositions for pulmonary delivery of insulin compound"); 5,993,783("Method and apparatus for pulmonary administration of dry powder.alpha.1-antitrypsin"); 5,922,354 ("Methods and system for processing dispersible fine powders"); 5,826,633 ("Powder filling systems, apparatus and methods"); 5,814,607 ("Pulmonary delivery of active fragments of parathyroid hormone"); 5,785,049 ("Method and apparatus for dispersion of dry powder medicaments"); 5,780,014 ("Method and apparatus for pulmonary administration of dry powder alpha 1-antitrypsin");5,775,320 ("Method and device for delivering aerosolized medicaments");5,740,794 ("Apparatus and methods for dispersing dry powder medicaments"); 5,654,007 ("Methods and system for processing dispersible fine powders"); 5,607,915 ("Pulmonary delivery of active fragments of parathyroid hormone"); 5,458,135 ("Method and device for delivering aerosolized medicaments"); 6,602,952 ("Hydrogels derived from chitosan and poly(ethylene glycol) or related polymers"); y 5,932,462("Multiarmed, monofunctional, polymer for coupling to molecules and surfaces"). Más aun, formulaciones de liberación sostenida adecuadas se describen en la Patente de los Estados Unidos 5,968,554 de Cardinal Health, titulada "A sustained release pharmaceutical preparation," concedida 19-oct-99. Formulaciones de micropartículas adecuadas se describen en la Publicación de Patente Internacional de Spherics, Inc. WO/2003-049,701, titulada "Methods and products useful in the formation and isolation of microparticles," publicada 30-oct-03. Formulaciones bioadhesivas adecuadas se describen en la Publicación de Patente Internacional de Spherics, Inc. WO/2003-051,304, titulada "Bioadhesive drug delivery system with enhanced gastric retention", publicada 06-mayo-04.

30 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con modalidades de la invención adecuadas para la administración parenteral comprenden soluciones de inyección acuosas y no acuosas estériles de los complejos, cuyas preparaciones son preferentemente isotónicas con la sangre del receptor previsto. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la composición isotónica con la sangre del receptor previsto. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones pueden presentarse en contenedores de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo frascos y ampulas selladas, y pueden almacenarse en una condición seca por congelación (liofilizada) que requiere solamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyección inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo que se describió previamente. Por ejemplo, se puede proporcionar una composición estéril inyectable, estable, con una mezcla de complejos en una forma de dosificación unitaria en un recipiente sellado. La mezcla de complejos se puede proporcionar en forma de un liofilizado que es capaz de reconstituirse con un vehículo adecuado farmacéuticamente aceptable para formar una composición líquida adecuada para inyectar en un sujeto. La forma de dosificación unitaria parenteral comprende típicamente de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 10 mg de la mezcla de complejos. Cuando los complejos son sustancialmente insolubles en agua, una cantidad suficiente de agente emulsionante que es fisiológicamente aceptable puede emplearse en cantidad suficiente para emulsionar los complejos en un vehículo acuoso. Uno de tales agentes emulsionantes útiles es la fosfatidilcolina.

50 Una forma de dosificación sólida para la administración oral incluye típicamente de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 500 mg, con preferencia de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 250 mg, de manera ideal de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 110 mg de los complejos.

55 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal se presentan preferentemente como supositorios de dosis unitaria. Estos se pueden preparar mediante la mezcla de los complejos con uno o más vehículos sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y después conformando la mezcla resultante.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la aplicación tópica a la piel toman preferentemente la forma de un ungüento, crema, loción, pasta, gel, rocío, aerosol, o aceite. Los vehículos que pueden utilizarse incluyen vaselina, lanolina, PEGs, alcoholes, potenciadores transdérmicos, y combinaciones de dos o más de los mismos.

60 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos que se adaptan para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Las composiciones adecuadas para la administración transdérmica pueden suministrarse además mediante iontoforesis (véase, por ejemplo, *Pharmaceutical Research* 3 (6):318 (1986)) y adoptarán típicamente

la forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada de la mezcla de conjugados de compuesto de insulina. Las formulaciones adecuadas comprenden tampón citrato o bis/tris (pH 6) o etanol/agua y contienen de 0.1 a 0.2 M de ingrediente activo.

5 En una modalidad que se prefiere, los complejos se administran como componentes de formulaciones de ácidos grasos sólidas como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos núm. 60/494,821, presentada el 13-Ag-03, por Opawale y otros.

10 En ciertas modalidades, el conjugado de compuesto de insulina se puede proporcionar por separado del catión y/o de otros componentes necesarios para formar los sólidos. Por ejemplo, el conjugado de compuesto de insulina puede proporcionarse como un sólido seco, y la solución tamponada que incluye al catión, agente estabilizante, conservante y/u otro componente puede proporcionarse por separado, de modo que el usuario puede combinar los componentes separados para producir los complejos conjugado de compuesto de insulina-catión.

15 7.12 Métodos de tratamiento

Las composiciones de conjugado de compuesto de insulina-catión y formulaciones de las mismas son útiles en el tratamiento de condiciones en las que el aumento de la cantidad de compuesto de insulina en circulación (con relación a la cantidad proporcionada por el sujeto en ausencia de la administración de compuesto de insulina de una fuente exógena) produce un efecto terapéutico o fisiológico deseable. Por ejemplo, la condición que se trata puede ser diabetes Tipo I o tipo II, prediabetes y/o síndrome metabólico. En los ejemplos, las composiciones se administran para aliviar los síntomas de la diabetes. En otros ejemplos, las composiciones se administran a un sujeto prediabético con el fin de prevenir o retrasar la aparición de diabetes.

25 La cantidad eficaz de la composición conjugado de compuesto de insulina-catión para la administración variará algo de mezcla a mezcla, y de sujeto a sujeto, y dependerá de factores tales como la edad y condición del sujeto, la ruta de administración y la afección que se trate. Tales dosis se pueden determinar de acuerdo con procedimientos farmacológicos de rutina que se conocen por los expertos en la materia.

30 Como propuesta general, una dosificación oral de aproximadamente 0.025 a aproximadamente 10 mg/kg de ingrediente activo (es decir, del conjugado) tendrá eficacia terapéutica, con todos los pesos calculados con base en el peso de la mezcla de conjugados de compuestos de insulina. Un intervalo que se prefiere más es de aproximadamente 0.06 a aproximadamente 1 mg/kg, y un intervalo que aún se prefiere más es de aproximadamente 0.125 a aproximadamente 35 0.5 mg/kg

Una dosificación parenteral está típicamente en el intervalo de aproximadamente 0.5 µg/kg a aproximadamente 0.5 mg/kg, con todos los pesos calculados con base en el peso de la mezcla de conjugados de compuesto de insulina. Un intervalo que se prefiere más es de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg.

40 La frecuencia de administración suele ser de una, dos o tres veces al día o según sea necesario para controlar la enfermedad. Alternativamente, las composiciones conjugado de compuesto de insulina-catión se pueden administrar por infusión continua. La duración del tratamiento depende del tipo de deficiencia de compuesto de insulina que se trata y puede ser por tanto tiempo como la vida del sujeto. Los complejos pueden, por ejemplo, administrarse de 0 a 30 minutos antes de una comida. Los complejos pueden, por ejemplo, administrarse de 0 a 2 horas antes de acostarse.

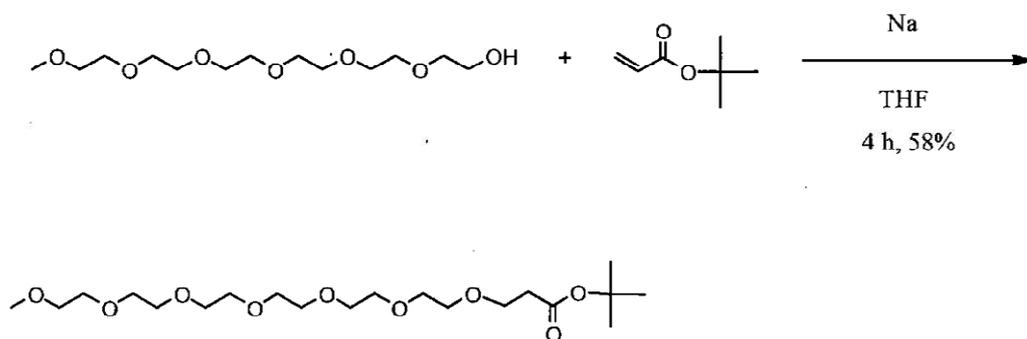
8 Experimentos y Ejemplos de Síntesis

Los siguientes ejemplos y experimentos se presentan para ilustrar y explicar la invención.

50 8.1 Síntesis de oligómero protegido MPEG₆C₃ ter-butil éster de ácido (3-{2-[2-(2-[2-(2-(Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-propiónico)

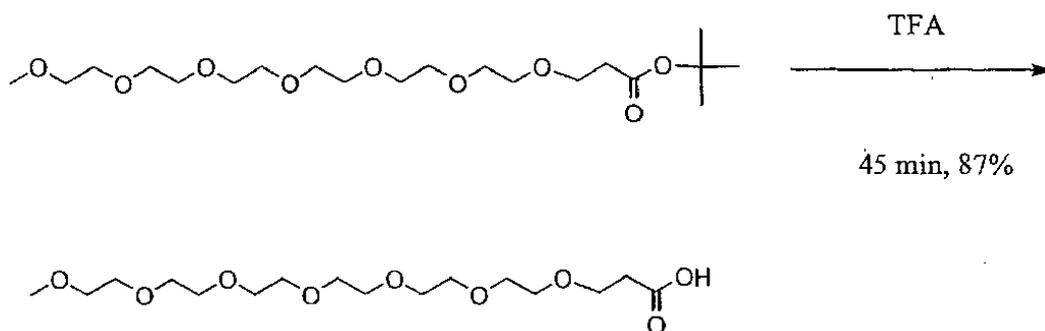
55

60



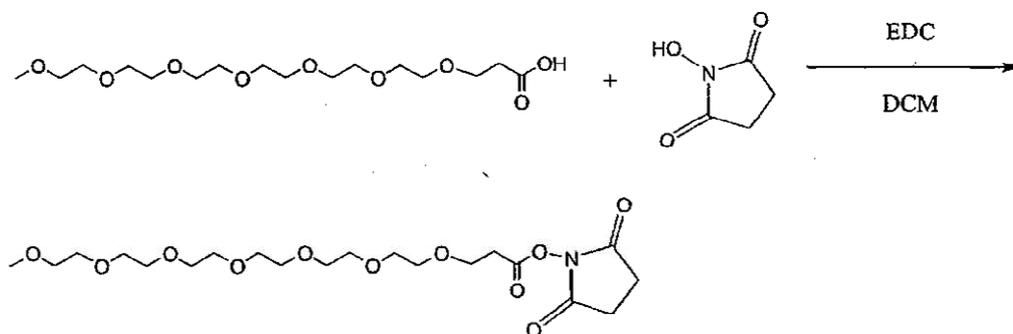
20 Se disolvieron metil hexaetilen glicol (1.0 g, 3.37 mmol) y *ter*-butil acrilato (0.216 g, 1.69 mmol) en THF seco (10 mL). Se añadieron a la solución 0.4 mg, 0.016 mmol de metal sódico). Después de agitar durante 4 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de HCl 1 M (15 mL). La mezcla de reacción inactivada se extrajo con CH₂Cl₂ (1 x 50 mL, 1 x 25 mL). La capa orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró. Después de la purificación por cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo como eluyente), se obtuvo el producto como un aceite (0.832 g, 58%).

25 8.2 Síntesis de ácido oligomérico MPEG₆C₃ ácido (3-{2-[2-(2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-propiónico)



40 El *ter*-butil éster (0.165 g, 0.0389 mmol) se desprotegió por agitación a temperatura ambiente en ácido trifluoroacético (2.0 mL). Los contenidos se concentraron después hasta un peso constante (0.125 g, 87%).

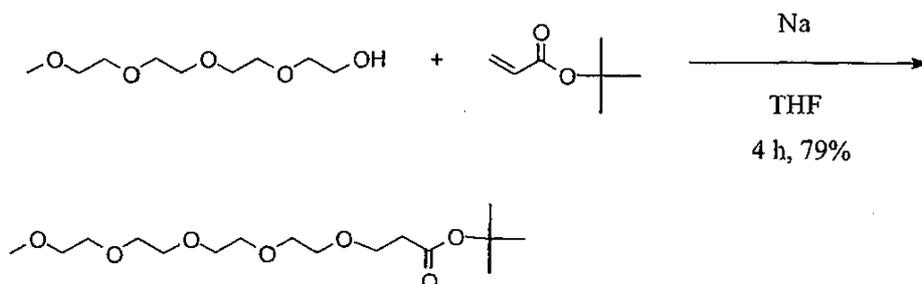
45 8.3 Síntesis de oligómero activado MPEG₆C₃ 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido (3-{2-[2-(2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propiónico)



60

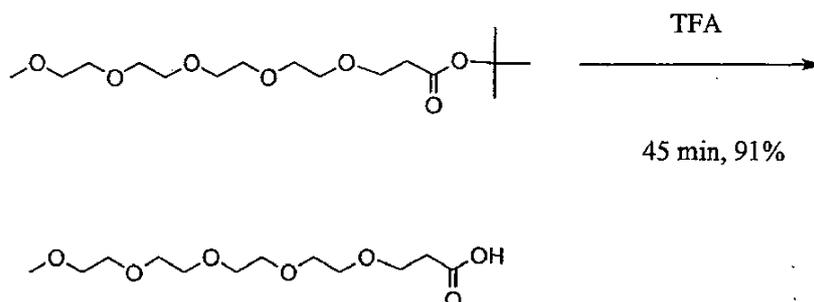
El ácido (0.660 g, 1.79 mmol) y la *N*-hidroxisuccinimida (0.2278 g, 1.97 mmol) se disolvieron en CH₂Cl₂ seco (15 mL). Se añadió hidrocloreuro de etil dimetilaminopropil carbodiimida (EDC, 0,343 g, 1,79 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con agua (2 x 45 mL). La capa orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró hasta un peso constante. El producto fue un aceite (0.441 g, 53%).

8.4 Síntesis de oligómero protegido MPEG₄C₃ *ter*-butil éster de ácido (3-(2-{2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-propiónico)



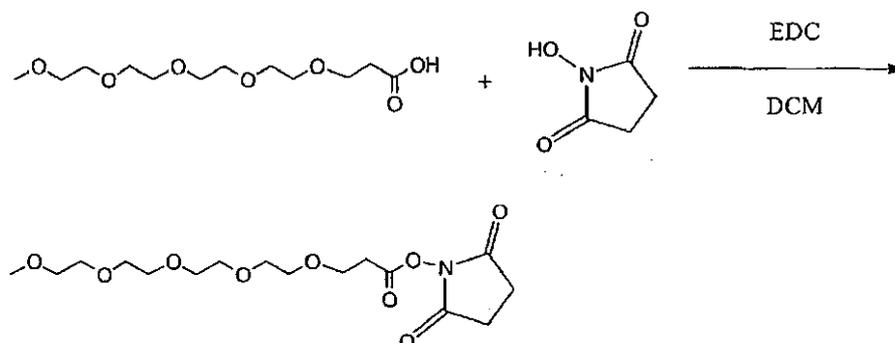
Se disolvieron metil tetraetilen glicol (1.0 g, 4.80 mmol) y *ter*-butil acrilato (0.308 g, 2.40 mmol) en THF seco (10 mL). Se añadieron 0.6 mg, 0.024 mmol de metal sódico a la solución. Después de agitar durante 4 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de HCl 1 M (15 mL). La mezcla de reacción que se inactivó se extrajo con CH₂Cl₂ (1 x 50 mL, 1 x 25 mL). La capa orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró. Después de la purificación por cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo como eluyente), se obtuvo el producto como un aceite (1.28 g, 79%).

8.5 Síntesis de ácido oligomérico MPEG₆C₃ ácido (3-(2-{2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-propiónico)



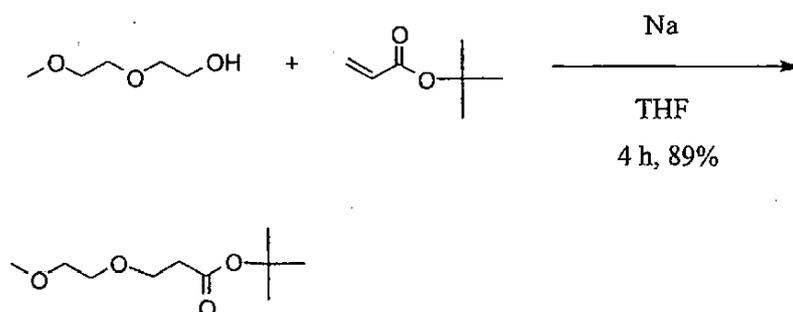
El *ter*-butil éster (1 g, 3.42 mmol) se desprotegió mediante agitación a temperatura ambiente en ácido trifluoroacético (6.0 mL). Los contenidos se concentraron hasta un peso constante (0.87 g, 91%).

8.6 Síntesis de oligómero activado MPEG₄C₃ 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido (3-(2-{2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-propiónico)



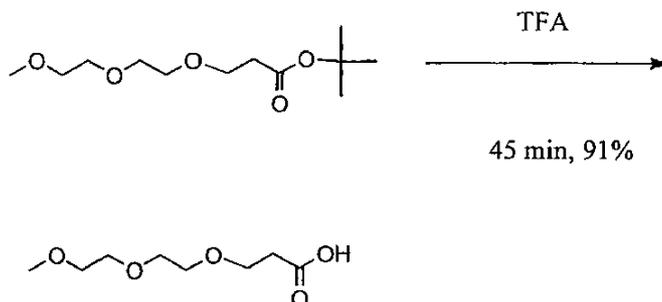
El ácido (0.6 g, 2.14 mmol) y la *N*-hidroxisuccinimida (0.271 g, 2.35 mmol) se disolvieron en CH₂Cl₂ seco (20 mL). Se añadió hidrocloreuro de etil dimetilaminopropil carbodiimida (EDC, 0.409 g, 2.14 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con agua (2 x 45 mL). La capa orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró hasta un peso constante. El producto fue un aceite (0.563 g, 69%).

8.7 Síntesis de oligómero protegido MPEG₄C₃ *ter*-butil éster de ácido (3-(2-Metoxi-etoxi)-propiónico)



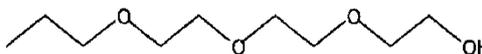
Se disolvieron metil tetraetilenglicol (5.0 g, 41.6 mmol) y *ter*-butil acrilato (2.66 g, 20.8 mmol) en THF seco (20 mL). Se añadió metal sódico 0.47mg, 20.8 mmol) a la solución. Después de agitar durante 4 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de HCl 1 M (30 mL). La mezcla de reacción inactivada se extrajo con CH₂Cl₂ (1 x 100 mL, 1 x 50 mL). La capa orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró. Después de la purificación por cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo como eluyente), se obtuvo el producto como un aceite (7.5 g, 89%).

8.8 Síntesis de ácido oligomérico MPEG₆C₃ ácido (3-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-propiónico)



El *ter*-butil éster (1 g, 4.90 mmol) se desprotegió por agitación a temperatura ambiente en ácido trifluoroacético (6.0 mL). Los contenidos se concentraron hasta un peso constante (0.652 g, 89%).

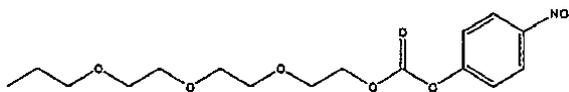
8.9 Síntesis de 2-[2-(2-propoxi-etoxi)-etoxi]-etanol (1)



Se disolvió trietilenglicol (19.5 g, 0.13 mol) en tetrahidrofurano (150 ml) y se añadió hidruro de sodio (2.60 g, 0.065 mol) en porciones durante 0.5 h y la reacción se agitó durante 1 h adicional. Después se añadió 1-bromopropano (8.0 g, 0.065 mol) disuelto en tetrahidrofurano (30 mL) gota a gota mediante un embudo de adición y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción bruta se filtró a través de Celita, se lavó con CH₂Cl₂, y se evaporó hasta que estuvo seca. El aceite resultante se disolvió en CH₂Cl₂ (250 mL), se lavó con NaCl (250 mL) saturado, H₂O (250 mL), se secó con MgSO₄, y se evaporó hasta que estuvo seco. La cromatografía en columna (sílice, acetato de etilo) proporcionó 1 un aceite amarillento (2.24 g, 18% de rendimiento).

8.10 Síntesis de ácido carbónico 4-nitro-fenil éster 2-[2-(2-propoxi-etoxi)-etoxi]-etil éster

5



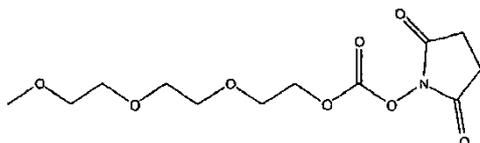
10

Se disolvieron 4-Nitroclorofonnato (3.45 g, 17.1 mmol) y 1 (2.2 g, 11.4 mmol) en CH_2Cl_2 (20 mL). Después de agitar durante 10 min, se añadió TEA (2.1 ml, 15 mmol) y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción en bruto se diluyó con CH_2Cl_2 (50 mL), se lavó con HCl 1M (50 mL), H_2O (50 mL), se secó con MgSO_4 , y se evaporó hasta que estuvo seca. La cromatografía en columna (sílice, acetato de etilo / hexanos, 3: 2) proporcionó 2 un aceite amarillento (2.57 g, 63% de rendimiento).

15

8.11 Síntesis de ácido carbónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster 2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil éster

20



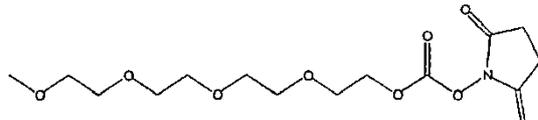
25

Se disolvieron trietilenglicol monometil éter (1.0 g, 6.1 mmol) y carbonato de N, N' -disuccinimidilo (1.87 g, 7.3 mmol) en acetonitrilo (10 mL). Después se añadió trietilamina (1.3 mL, 9.15 mmol) y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción en bruto se evaporó hasta que estuvo seca, se disolvió en NaHCO_3 (50 mL) saturado, se lavó con etil acetato (2 x 50 mL), se secó con MgSO_4 , y se evaporó hasta que estuvo seca. La cromatografía en columna (sílice, acetato de etilo) proporcionó 1 de un aceite transparente (0.367 g, 20% de rendimiento).

30

8.12 Síntesis de ácido carbónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster 2-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etil éster (1).

35



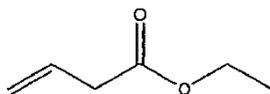
40

Se disolvieron tetraetilen glicol monometil éter (1.0 g, 4.8 mmol) y carbonato de N, N'-disuccinimidilo (1.48 g, 5.8 mmol) en acetonitrilo (10 mL). Después se añadió trietilamina (1.0 mL, 7.2 mmol) y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción en bruto se evaporó hasta que estuvo seca, se disolvió en NaHCO_3 (30 mL) saturado, se lavó con etil acetato (2 x 30 mL), se lavó con MgSO_4 , y se evaporó hasta que estuvo seca. La cromatografía en columna (sílice, acetato de etilo / MeOH, 20:1) proporcionó 1 de un aceite transparente (0.462 g, 28% de rendimiento).

45

8.13 Síntesis de etil éster de ácido but-3-enoico

50

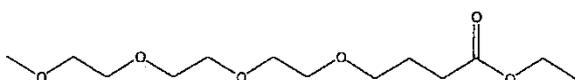


55

Se disolvió ácido vinilacético (10.0 g, 0.12 mol) en etanol (200 mL) y se añadió ácido sulfúrico concentrado (0.75 mL, 0.014 mol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo por 4 h. La reacción en bruto se diluyó con acetato de etilo (200 mL), se lavó con H_2O (200mL), NaHCO_3 saturado (200 mL), se secó con MgSO_4 , y se evaporó hasta que estuvo seca para proporcionar 1 de un aceite transparente (3.17 g, 23%).

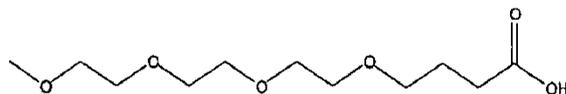
60

8.14 Síntesis de etil éster de ácido 4-{2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-butírico



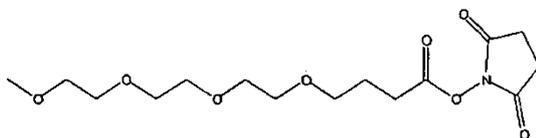
Se disolvieron trietilenglicol monometil éter (4.27 g, 0.026 mol) y etil éster de ácido but-3-enoico (1.5 g, 0.013 mol) en tetrahidrofurano (10 mL). Después se añadió Na^0 (0.030 g, 0.013 mol) en terrones y la reacción se agitó durante 4 h. La reacción en bruto se inactivó con HCl 1 M (20 mL), se lavó acetato de etilo (3 x 20 mL). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con H_2O (2 x 10 mL), se secaron con MgSO_4 , y se evaporaron hasta que estuvieron secas para proporcionar 2 un aceite amarillento (1.07 g, 30% de rendimiento).

8.15 Síntesis de ácido 4-{2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-butírico



Se disolvió etil éster de ácido 4-{2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-butírico (1.07 g, 4.0 mmol) en NaOH 1M (10 mL) y la reacción se agitó por 2 h. La reacción en bruto se diluyó con NaCl (40 mL) saturado, se acidificó hasta pH ~2 con HCl concentrado, se lavó con CH_2Cl_2 (2 x 50 mL), se secó con MgSO_4 , y se evaporó hasta sequedad para obtener 3 de un aceite transparente (0.945 g, 94% de rendimiento).

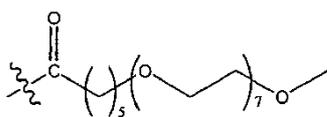
8.16 Síntesis de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 4-{2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-butírico



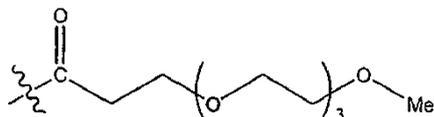
Se disolvieron N-hidroxisuccinimida (0.55 g, 4.8 mmol) y EDCI (1.15 g, 6.0 mmol) en CH_2Cl_2 (7 mL). Después se añadió ácido 4-{2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-butírico (0.940 g, 3.8 mmol), disuelto en CH_2Cl_2 (2 mL). La reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente. La reacción en bruto se diluyó en CH_2Cl_2 (21 mL), se lavó con HCl 1M (30 mL), H_2O (30 mL), se secó con MgSO_4 , y se evaporó hasta que estuvo seca. La cromatografía en columna (Sílice, acetato de etilo) proporcionó 4, un aceite transparente (0.556 g, 43% de rendimiento).

9 Preparación de Complejos

Se investigaron los métodos para la preparación de complejos de zinc de conjugados de compuesto de insulina. Nuevos métodos, excepcionales a los métodos publicados que se utilizan para la formación de complejos/cristalización de compuestos de insulina y de análogos de compuesto de insulina, se desarrollaron para fabricar complejos de zinc de HIM 2. HIM2 es un monoconjugado de insulina humana con un resto modificador acoplado en B29, donde el resto modificador tiene la siguiente estructura:



Otros complejos se prepararon mediante la utilización de IN105, un monoconjugado de insulina humana con un resto modificador acoplado en B29, donde el resto modificador tiene la siguiente estructura:



Los métodos proporcionan tres tipos principales, complejos catiónicos "tipo T" y "tipo R" y "protamina" de sólidos conjugados de compuesto de insulina.

9.1 Preparación y Análisis de Sólidos Tipo T

9.1.1 Intento de Preparación de Complejo de Zn tipo T de HIM 2 (2 g/L)

Una solución de HIM2 a aproximadamente 2 g/L se preparó con un pH final ~3 con HCl 10%. El ácido acético glacial se añadió a una alícuota de 10 mL (20 mg de proteína) de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Veinte (o cuarenta) µL de una solución de ZnCl₂ 2% p/p se añadió a la muestra. El pH se ajustó a 5.1 (o 5.5) con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente (o +5°C) y luego se mantuvo durante un día a temperatura ambiente (o +5°C) para permitir la formación del sólido. No se formaron cristales o precipitación después de dejar que la reacción reposara un día a temperatura ambiente (o al +5°C). Véase el Ejemplo 2 de la patente de los Estados Unidos 5,504,188, titulada "Preparation of stable zinc insulin compound analog crystals."

9.1.2 Complejo de Zn tipo T de HIM2 (Concentración 10 g/L)

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/L con un pH final ~3 con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 10 mL (100 mg de proteína) de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Cuarenta µL de una solución de ZnCl₂ 10% p/p se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 5.20 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó durante 15 minutos a +5°C y luego se dejó reposar durante cinco días a +5°C para permitir la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2000 RPM durante 10 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 mL de agua DI fría. Esta solución se centrifugó a 2000 RPM durante 10 minutos antes de que se decantara el agua y los sólidos se lavaron con otro 5 mL de agua DI fría. Una vez más, la muestra se centrifugó a aproximadamente 2000 rpm durante aproximadamente 10 minutos antes de que el H₂O se decantara. La muestra se lavó con 5 mL de EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2000 RPM durante 10 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se secó en un liofilizador para proporcionar un sólido blanco.

9.1.3 Complejo de Zn tipo T de HIM2 (Concentración 20 g/L)

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 20 g/L con un pH final ~3 con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 10 mL (200mg de proteína) de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Se añadieron ochenta µL de una solución de ZnCl₂ 10% p/p a la muestra. El pH se ajustó a 5.37 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó durante 15 minutos a +5°C y luego se dejó reposar durante cuatro días a +5°C para permitir la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 mL de agua DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que se decantara el agua y los sólidos se lavaron con otros 5 mL de agua DI fría. Una vez más, la muestra se centrifugó a aproximadamente 2600 RPM durante aproximadamente 20 minutos antes de que el H₂O se decantara. La muestra se lavó con 5 mL de EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se secó en un liofilizador para proporcionar un sólido blanco.

9.1.4 Complejo de Zn tipo T de HIM2 (Concentración 30 g/L)

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 30 g/L con un pH final ~3 con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 50 mL (1.5g de proteína) de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Se añadieron seiscientos µL de una solución de ZnCl₂ 10% p/p a la muestra.

El pH se ajustó a 5.34 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se dejó reposar a +5°C durante cinco días para permitir la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó tres veces con 10 mL de agua DI fría, centrifugando y decantando el H₂O en cada lavado. La muestra se lavó después tres veces con 10 mL de EtOH 200 proof frío. La muestra se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos y se decantó después de cada lavado. La muestra se secó en un liofilizador para proporcionar un sólido blanco.

Las Figuras 1 y 2 son fotomicrografías que se tomaron mediante la utilización de un microscopio Zeiss Axiovert que muestran cristales crecidos durante 24 horas. En la **Figura 1**, el tamaño del cristal es de aproximadamente 11.3 µM de longitud y de aproximadamente 5.3 µM de diámetro. En la **Figura 2**, el tamaño del cristal de la izquierda es de aproximadamente 15.1 µM de longitud y de aproximadamente 5.9 µM de diámetro, y el tamaño del cristal de la derecha es de aproximadamente 9.1 µM de longitud y de aproximadamente 5.3 µM de diámetro. La **Figura 3** es una fotomicrografía que se tomó mediante la utilización de un microscopio Zeiss Axiovert que muestra cristales crecidos durante 5 días. En un aspecto, la invención incluye cristales que tienen una morfología como se muestra en la **Figura 1, 2 o 3.**

9.1.5 Complejo de Zn tipo-T de HIM2 (concentración 50 g/l)

5 Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 50 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 10 ml de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Doscientos µl de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 5.23 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó a +5 °C durante 15 minutos y después se mantuvo a +5 °C durante cuatro días para permitir que ocurriera la formación del sólido.

10 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H₂O se decantara y el sólido se lavara con otros 5 ml de H₂O DI fría. De nuevo, la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H₂O se decantara. La muestra se lavó con 5 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se secó en un liofilizador durante tres días.

15 9.1.6 Complejo de Zn tipo-Tde HIM2 (escala 1 g)

20 Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 50 ml (proteína 500 mg) de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Doscientos µl de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 5.49 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó a +5 °C durante 15 minutos y después se mantuvo a +5 °C durante siete días para permitir que ocurriera la formación del sólido.

25 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 10 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H₂O se decantara. Los lavados de agua se repitieron dos veces más. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador para secar durante cuatro días.

30 9.1.7 Complejo de Zn tipo-T de HIM2 a pH neutro (escala 5 g)

35 Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Dos mililitros de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 7.05 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó a temperatura ambiente toda la noche para permitir que ocurriera la formación del sólido.

40 La mezcla de reacción lechosa Zn-HIM2 (500 ml) se añadió, en partes, a un embudo de disco fritado fino (4.5-5 µm) de 350 ml (ChemGlass CG1402-28, diámetro de 90mm). El filtrado se recogió en un frasco de brazo lateral mientras se aplicaba vacío durante aproximadamente 4-6 horas. Como una opción, la torta se puede lavar con 100 ml de ZnCl₂ 1% frío y el filtrado se puede recoger por separado. La torta se lavó con 100 ml agua helada, y el filtrado se recogió de nuevo. La torta además se lavó con 100 ml adicionales de etanol 100% helado y el filtrado se recogió una vez más. El lavado final de la torta fue 100 ml de agua helada fresca y se recogió el filtrado final. La torta se secó bajo vacío y/o se secó al aire durante 12-18 horas. Después del secado, la torta se raspó del embudo, se pesó, y los contenidos de humedad/proteína se midieron a través de HPLC. Los filtrados recogidos a partir de las diversas etapas de lavado además se analizaron por medio del uso del HPLC para determinar la concentración del Zn-HIM2 perdido durante el proceso. La filtración produjo un 2.5% p/p de contenido de Zn con un rendimiento global de 98%.

45 9.1.8 Complejo de Zn tipo-T de HIM2 a pH neutro (escala 500 mg)

50 Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Doscientos µl de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 7.06 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó a +5 durante 15 minutos y después se mantuvo a +5 durante dos días para permitir que ocurriera la formación del sólido.

55 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 10 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el H₂O se decantara. Los lavados de agua se repitieron dos veces más. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador para secar durante dos días.

60 9.1.9 Resultados para composiciones sólidas tipo-T

Reacción	Observaciones de los animales	Solubilidad (mg/ml)	% p/p Zn
9.1.1	Sin formación de sólido	N/A	N/A
9.1.2	Sólido blanco	NEM	NEM
9.1.3	Sólido blanco	NEM	NEM
9.1.4	Sólido blanco	NEM	0.53
9.1.5	Sólido blanco	146	0.66
9.1.6	Sólido blanco	109	0.55
9.1.7	Sólido blanco	ND	2.50
9.1.8	Sólido blanco	ND	1.63
NEM = No suficiente material ND = Sin datos			

20 9.2 Preparación y análisis de sólidos tipo-R

9.2.1 Complejo de Zn tipo-R de HIM2 con fenol a 2 g/l

25 Una solución de HIM2 a aproximadamente 2 g/l se preparó a un pH ~3 final con ácido acético glacial. Treinta y tres microlitros de fenol licuado se añadieron a una alícuota de 10 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 5.89 con hidróxido de amonio concentrado. Ciento sesenta μ l de una solución de $ZnCl_2$ 10% p/p se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente durante tres días para permitir que se formara más precipitado.

30 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 3400 RPM durante 15 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de agua DI fría. Esta solución se centrifugó a 3200 RPM durante 15 minutos antes de que el H_2O se decantara. La muestra se lavó después con 5 ml de EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 3200 RPM durante 15 minutos antes de que el EtOH se decantara. De nuevo la muestra se lavó con 5 ml de EtOH frío, sin embargo, no se centrifugó. El sólido se dejó sedimentar en el fondo del tubo y después se colocó en el vacío a velocidad para secar.

35 9.2.2 Preparación del complejo de Zn tipo-R de HIM2 a 20 g/l

40 Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 20 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Sesenta y seis microlitros de fenol licuado se añadieron a una alícuota de 10 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 6.43 con hidróxido de amonio concentrado. Trescientos veinte μ l de una solución de $ZnCl_2$ 10% se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente durante cuatro días para permitir que se formara más precipitado.

45 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de H_2O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H_2O se decantara y el sólido se lavara con otros 5 ml de H_2O DI fría. De nuevo, la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H_2O se decantara. La muestra se lavó con 5 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se liofilizó durante tres días.

50 9.2.3 Preparación del complejo de Zn tipo-R de HIM2 a 30 g/l

55 Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 30 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Noventa y nueve microlitros de fenol licuado se añadieron a una alícuota de 10 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 6.47 con hidróxido de amonio concentrado. Después, 480 μ l de una solución de $ZnCl_2$ 10% se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente durante cuatro días para permitir que se formara más precipitado.

60 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de H_2O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H_2O se decantara y el sólido se lavara con otros 5 ml de H_2O DI fría. De nuevo, la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H_2O se decantara. La muestra se lavó con 5 ml EtOH 200 proof frío y

se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se liofilizó durante tres días.

La Figura 4 muestra el crecimiento del sólido durante 4 días. La foto se tomó por medio del uso de un microscopio Zeiss Axiovert. La longitud media de los cristales es aproximadamente 9.7µM.

9.2.4 Preparación del complejo de Zn tipo-R de HIM2 a 50 g/l

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 50 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Ciento sesenta y cinco microlitros de fenol licuado se añadieron a una alícuota de 10 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 6.82 con hidróxido de amonio concentrado. Ochocientos µl de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente durante cuatro días para permitir que se formara más precipitado.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó, y el sólido se lavó con 5 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H₂O se decantara y el sólido se lavara con otros 5 ml de H₂O DI fría. De nuevo, la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H₂O se decantara. La muestra se lavó con 5 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se liofilizó durante tres días.

9.2.5 Preparación del complejo de Zn tipo-R de HIM2 a escala 1 g

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Ciento sesenta y cinco microlitros de fenol licuado se añadieron a una alícuota de 50 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 6.42 con hidróxido de amonio concentrado. Ochocientos µl de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente durante siete días para permitir que se formara más precipitado.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 10 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H₂O se decantara. Dos lavados de agua más se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador durante cuatro días.

9.2.6 Complejo de Zn tipo-R de HIM2 a escala 5 g

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Ciento quince microlitros de fenol licuado se añadieron a 450 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 7.1 con hidróxido de amonio concentrado. Ciento dieciocho µl de una solución de 10% ZnCl₂ se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente toda la noche para permitir que se formara más precipitado.

La reacción que se realizó anteriormente se dividió en tres ensayos de filtración. En el ensayo uno, la mezcla de reacción se filtró a través de un embudo fritado fino y después se lavó con una solución de ZnCl₂ 1%. El material se secó toda la noche a través de filtración al vacío. El segundo ensayo se filtró sobre un filtro fritado medio que además contenía papel de filtro. La sustancia después se lavó con etanol y agua y se secó toda la noche a través de filtración al vacío. Por último, el tercer ensayo se filtró a través de un embudo fritado fino, se lavó con una solución de ZnCl₂ 1% y además se lavó con etanol y agua. Este material además se secó toda la noche bajo filtración al vacío.

	Ensayo 1 (frita fina, lavado de ZnCl₂, sin lavado de H₂O/EtOH)	Ensayo 2 (papel de filtro, frita media, lavado de EtOH/H₂O)	Ensayo 3 (frita fina, lavados de EtOH/H₂O)
Rendimiento	74%	93%	58%
%p/p Zn	1.99	2.83	2.06%
%p/p fenol	0.033	0.45	1.28

9.2.7 Complejo de Zn tipo-R de HIM2 a pH neutro

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Ciento sesenta y cinco microlitros de fenol licuado se añadieron a 50 ml de la solución anterior. Después, doscientos microlitros de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 7.18 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante dos días para permitir que el precipitado se formara.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 20 minutos. Sin embargo, el material no se sedimentó en el fondo del tubo inicialmente y por lo tanto, se centrifugó durante aproximadamente 2 horas. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2800 RPM durante 60 minutos antes de que el H₂O se decantara. El lavado de agua se repitió dos veces más. La muestra se lavó después con 5 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2800 RPM durante 60 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera. El material era turbio después del tercer lavado de EtOH y se colocó en el refrigerador toda la noche para permitir que las reacciones se sedimentaran más. El disolvente se decantó y el material se colocó en el liofilizador durante 2 días.

9.2.8 Resultados para composiciones sólidas tipo-R

Reacción	Observaciones de los animales	Solubilidad (mg/ml)	% p/p Zn	fenol
9.2.1	Sólido blanco	NEM	NEM	NEM
9.2.2	Sólido blanco	44.75	1.21	0.097
9.2.3	Sólido blanco	50.49	1.74	0.41
9.2.4	Sólido blanco	36.24	2.32	0.52
9.2.5	Sólido blanco	47.7	1.06	0.16
9.2.6	Sólido blanco	ND	<i>Ver anteriormente</i>	<i>Ver anteriormente</i>
9.2.7	Sólido blanco	ND	1.74	1.62
NEM = No suficiente material ND = Sin datos				

9.3 Preparación y análisis de sólidos de protamina

9.3.1 Preparación del complejo de Zn tipo-T de HIM2 con protamina a pH ácido

La protamina se añadió a una solución madre de HIM2 10 g/l que tenía un pH ~3 final con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 10 ml (proteína 100 mg) de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Doscientos microlitros de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó con hidróxido de amonio concentrado a un pH ~5. La solución se agitó a +5 °C durante 15 minutos y después se mantuvo a +5 °C durante dos días para permitir que ocurriera la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 10 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H₂O se decantara. Dos lavados más de H₂O se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador durante dos días.

9.3.2 Preparación del complejo de Zn tipo-T de HIM2 con protamina a pH neutro

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 30 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Un mililitro de ácido acético glacial se añadió a una alícuota de 50 ml (proteína 1.5 g) de la solución anterior. Seiscientos microlitros de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la reacción seguido por la adición de 225 miligramos de protamina. El pH se ajustó a 6.95 con hidróxido de amonio concentrado y la reacción se mantuvo durante dos días a +5 °C para permitir que ocurriera la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución

se decantó y el sólido se lavó con 10 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H₂O se decantara. Dos lavados más de H₂O se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador durante tres días

9.3.3 Preparación del complejo de Zn tipo-R de HIM2 con protamina a pH ácido

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Se añadió fenol licuado (2.48 ml) a una alícuota de 150 ml (proteína 1.5 g) de la solución anterior. El pH de la reacción se ajustó con hidróxido de amonio concentrado a un pH ~ 6.57. Doce microlitros de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la reacción seguido por la adición de 225 miligramos de protamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de mantenerla durante dos días temperatura ambiente para permitir que ocurriera la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 50 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el H₂O se decantara. Dos lavados más de H₂O se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador durante dos días.

9.3.4 Preparación del complejo de Zn tipo-R de HIM2 con protamina a pH neutro

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Se añadió fenol licuado (495 ml) a 150 ml de reacción. Después, 600 mililitros de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la reacción seguido por la adición de 75 mg de protamina. El pH se ajustó con hidróxido de amonio concentrado a un pH 7.01. La reacción se mantuvo durante tres días a temperatura ambiente para permitir la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 50 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el H₂O se decantara. Dos lavados más de H₂O se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 50 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2800 durante 15 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador durante dos días.

9.3.5 Resultados para las composiciones sólidas de protamina

Reacción	Observaciones de los animales	Solubilidad (mg/ml)	% p/p Zn	fenol
9.3.1	Sólido blanco	ND	0.66	N/A
9.3.2	Sólido blanco	ND	2.47	N/A
9.3.3	Sólido blanco	36.78	1.22	9.87
9.3.4	Sólido blanco	NEM	NEM	NEM
NEM = No suficiente material ND = Sin datos				

9.4 Preparación y análisis de complejos de diconjugados de compuestos de insulina

9.4.1 Complejo de Zn tipo-T en el diconjugado de compuesto de insulina A1 y B29

Un diconjugado de compuesto de insulina que tiene una porción modificadora -C(O)(CH₂)₅(OCH₂CH₂)₇OCH₃ acoplado a B29 y A1 de la insulina humana (DICON-1) se añadió a la solución a aproximadamente 10 g/l y se preparó a un pH 3.15 final con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 3.75 ml de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Después 15 µl de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 4.90 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó durante 15 minutos a +5°C y después se mantuvo durante seis días a +5°C para permitir la formación del sólido (produjo un sólido blanco).

9.4.2 Complejo de Zn tipo-R en el diconjugado de compuesto de insulina A1 y B29

5 Se añadió DICON-1 a la solución a aproximadamente 10 g/l y se preparó a un pH 3.15 final con HCl 10%. Aproximadamente 12 µl de fenol licuado se añadieron a una alícuota de 3.75 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 5.75 con hidróxido de amonio concentrado. Sesenta µl de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente durante seis días para permitir que se formara más precipitado (produjo un sólido blanco).

10 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H₂O se decantara y el sólido se lavara con otros 5 ml de H₂O DI fría. De nuevo, la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H₂O se decantara. La muestra se lavó con 5 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se liofilizó durante seis días.

15 9.4.3 Diconjugado B1, B29 (1.0 mg/ml)

Se añadió DICON-1 a la solución a aproximadamente 10 g/l y se añadieron 33 µl de fenol licuado. El pH se ajustó a 5.34 con hidróxido de amonio concentrado. Después 160 µl de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante dos semanas para permitir que ocurriera la formación del sólido (produjo un sólido blanco).

20 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó tres veces con 5 ml H₂O DI fría. La solución se centrifugó durante 15 minutos a 2800 RPM y se decantó después de cada lavado. La muestra después se lavó tres veces con 5 ml de EtOH 200 proof frío. De nuevo la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 15 minutos y se decantó después de cada lavado. La muestra se liofilizó durante dos días.

25 9.4.4 Diconjugado B1, B29 (20 mg/ml)

30 Se añadió DICON-1 a la solución a aproximadamente 20 g/l y se añadieron 66 microlitros de fenol licuado. El pH se ajustó a 7.65 con hidróxido de amonio concentrado. Después 320 µl de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante dos semanas para permitir que ocurriera la formación del sólido (produjo un sólido blanco).

35 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó tres veces con 5 ml H₂O DI fría. La solución se centrifugó durante 15 minutos a 2800 RPM y se decantó después de cada lavado. La muestra después se lavó tres veces con 5 ml de EtOH 200 proof frío. De nuevo la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 15 minutos y se decantó después de cada lavado. La muestra se liofilizó durante dos días.

40 9.5 Preparación y análisis de sólidos IN105 tipo-T

Complejo de Zn tipo-T de IN105 monoconjugado (concentración 10 g/l)

45 Una solución de IN105 a aproximadamente 10 g/l (100 mg) se preparó que tiene un pH ~3 final con HCl 10%. 50 µl de una solución de ZnCl₂ 10% p/p se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 7.52 con hidróxido de amonio concentrado. La solución turbia se agitó y después se dejó reposar durante cinco días a temperatura ambiente para permitir la formación de sólido.

50 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2900 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 3x10 ml de agua DI fría. Esta solución se centrifugó 2900 RPM durante 10 minutos antes de que el agua se decantara y los sólidos se lavaran con otra porción de agua DI fría. La muestra después se lavó con 3x10 ml de EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2900 RPM durante 10 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se secó al vacío para proporcionar sólido blanco (90 mg).

55 9.5.2 Complejo de Zn tipo-T de IN105 monoconjugado (escala 1 g)

60 Una solución de IN105 a aproximadamente 10 g/l (1 g) se preparó a un pH ~3 final con HCl 10%. Quinientos µl de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 7.4 con hidróxido de amonio concentrado. La solución turbia se agitó durante 15 minutos y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante ~2 días antes de la filtración.

La mezcla de reacción se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado (fino) bajo vacío. El embudo de vidrio

sinterizado con el material filtrado se colocó bajo vacío en un desecador de vidrio toda la noche para dar como resultado un polvo fino blanco (900 mg).

9.5.3 Complejo de Zn tipo-T de IN105 monoconjugado a pH neutro (escala 5 g)

Una solución de IN105 a aproximadamente 10 g/l (5 g, lot#Nobex040706L) se preparó a un pH ~3 final con HCl 10%. Dos ml de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 7.4 con hidróxido de amonio concentrado. La solución turbia después se dejó reposar a temperatura ambiente toda la noche para permitir la formación del sólido antes de la filtración.

La reacción realizada anteriormente se dividió en 4x50 ml tubos de centrifuga y se centrifugaron inicialmente a 3200 RPM durante un total de 2 horas. El material después se centrifugó a 9000 RPM durante 20 minutos y se almacenó a 5°C toda la noche. El sobrenadante se decantó y el sólido de cada tubo se lavó con 10 ml de H₂O DI fría. Los tubos se invirtieron y se centrifugaron a 3200 RPM durante ~ 1 hora antes de que el H₂O se decantara y los sólidos se lavaran con otros 10 ml de H₂O DI fría. De nuevo, la muestra se centrifugó a 3200 RPM durante ~ 1 hora antes de que el H₂O se decantara. La muestra se lavó con 2x10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 3200 RPM durante 1 hora antes de que el EtOH se decantara. La muestra se secó al vacío durante dos días para dar 1.64 g (lot#Nobex040730L-A) de polvo blanco.

9.5.4 Resultados para las composiciones sólidad IN105 tipo-T

Reacción	Observaciones de los animales	Solubilidad (mg/ml) en un amortiguador fosfato 0.1M de pH de aproximadamente 7.4	% p/p Zn
9.5.1	Sólido blanco	80-85	0.0
9.5.2	Sólido blanco	10-20	1.67
9.5.3	Sólido blanco	ND	1.88

9.6 Preparación y análisis de sólidos IN105 tipo-R

9.6.1 Complejo de Zn tipo-R en el conjugado IN105 con fenol a pH neutro

Una solución de IN105 a aproximadamente 10 g/l (500 mg) se preparó a un pH ~3 final con HCl 10%. Doscientos µl de ZnCl₂ 10% y 165 µl de fenol licuado se añadieron a la solución anterior. El pH se ajustó a 7.37 con hidróxido de amonio concentrado. La solución turbia se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 días para permitir la formación del sólido antes de la filtración.

La mezcla de reacción se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado (fino) bajo vacío. El embudo de vidrio sinterizado con el material filtrado se colocó bajo vacío en un desecador de vidrio toda la noche para dar como resultado un polvo fino blanco (440 mg).

9.6.2 Complejo de Zn tipo-R del conjugado IN105 a escala 5 g

Una solución de IN105 a aproximadamente 10 g/l (4.2 g, lot#Nobex040706L) se preparó a un pH ~3 final con HCl 10%. Fenol licuado 1.5 y 1.8 ml de la solución ZnCl₂ 10% se añadieron a la solución anterior. El pH se ajustó a 7.4 con hidróxido de amonio concentrado. La solución turbia se mantuvo a temperatura ambiente toda la noche para permitir que se formara más precipitado.

La reacción realizada anteriormente se dividió en 4x50 ml tubos de centrifuga y se centrifugaron inicialmente a 3200 RPM durante 2 horas. El material después se centrifugó a 9000 RPM durante 20 minutos y se almacenó a 5°C toda la noche. El sobrenadante se decantó y el sólido de cada tubo se lavó con 10 ml de H₂O DI fría. Los tubos se invirtieron y se centrifugaron a 3200 RPM durante ~ 1 hora antes de que el H₂O se decantara y los sólidos se lavaran con otros 10 ml de H₂O DI fría. De nuevo, la muestra se centrifugó a 3200 RPM durante ~ 1 hora antes de que el H₂O se decantara. La muestra se lavó con 2x10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 3200 RPM durante 1 hora antes de que el EtOH se decantara. La muestra se secó al vacío durante 2 días para dar 2.34 g de polvo blanco.

9.6.3 Resultados para las composiciones sólidad IN105 tipo-R

Reacción	Observaciones de los animales	Solubilidad (mg/ml)*	% p/p Zn	% p/p fenol
9.6.1	Sólido blanco	ND	1.85	2.37
9.6.2	Sólido blanco	10-25	1.71	2.66
ND = Sin datos				
*En un amortiguador fosfato de pH aproximadamente 7.4				

9.7 Preparación y análisis de sólidos IN105 de protamina

9.7.1 Preparación del complejo de Zn tipo-R de IN105 monoconjugado con protamina a pH ácido

Una solución de IN105 a aproximadamente 10 g/l se preparó a pH ~ 3 final con HCl 10%. Se añadió fenol licuado (248 ul) a una alícuota de 15 ml (150 mg de proteína) de la solución anterior. El pH de la reacción se ajustó con hidróxido de amonio concentrado a un pH ~ 6.50. Un microlitro de una solución de ZnCl₂ 10% se añadió a la reacción seguido por la adición de 22.5 miligramos de protamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de mantenerla durante dos días temperatura ambiente para permitir que ocurriera la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el H₂O se decantara. Dos lavados más de H₂O se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el EtOH se decantara. Se llevaron a cabo dos lavados más de EtOH de la misma manera antes de que la muestra se seicara al vacío durante dos días.

9.7.2 Preparación del complejo de Zn tipo-R de IN105 conjugado con protamina a pH neutro

Una solución de IN105 a aproximadamente 10 g/l se preparó a pH ~ 3 final con HCl 10%. Se añadió fenol licuado (49.5 ul) a 15 ml de reacción. Después, 60 microlitros de una solución de ZnCl₂ 10% se añadieron a la reacción seguido por la adición de 7.5 mg de protamina. El pH se ajustó con hidróxido de amonio concentrado a un pH 7.00. La reacción se dejó reposar durante tres días a temperatura ambiente para permitir la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5.0 ml de H₂O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el H₂O se decantara. Dos lavados más de H₂O se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 50 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el EtOH se decantara. Se llevaron a cabo dos lavados más de EtOH de la misma manera antes de que la muestra se seicara al vacío durante dos días.

9.7.3 Preparación del complejo de Zn cristalino tipo-R de IN105

Una solución cruda de IN105 15 mg/ml que contenía 25% orgánico se ajustó pH a 3.47 por medio del uso de HCl 1M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua a 40-60°C y se añadieron 0.218 ml al frasco de reacción. Después, 0.4 ml de la solución ZnCl₂ 4% acuosa acidificada se añadieron a la reacción. El pH de la solución se ajustó con NaOH 1M a un pH 6.6 final. Mientras se ajustaba el pH, se sacaron alícuotas de 10 ml a los siguientes valores de pH: 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.4 y 6.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Cristales tipo aguja se observaron bajo el microscopio.

9.7.4 Preparación del complejo de Zn cristalino tipo-R de IN105 que contenía 30% orgánico

Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo MPEG₃ se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.81 con HCl 1M. Fenol licuado, 0.040 ml, y EtOH 95%, 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 0.400 ml de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.7 a 5.4 por medio del uso de NaOH 50% y se sacaron alícuotas de 1 ml a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.0, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja (ver **la Figura 5**) a partir del intervalo de pH 4.0 a 5.2.

9.7.5 Preparación del complejo de Zn cristalino tipo-R de IN105 en amortiguador acetato de amonio 100 mM (EtOH 30, 20 y 10%)

5 Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo MPEG₃ se preparó en amortiguador acetato de amonio 100 mM y el pH se ajustó a 2.8 con HCl 5M. Fenol licuado, 0.040 ml, y EtOH 95%, 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 0.400 ml de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.9 a 5.6 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.5 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja a partir del intervalo de pH 4.4 a 4.8.

10 Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo MPEG₃ se preparó en amortiguador acetato de amonio 100mM y el pH se ajustó a 2.8 con HCl 5M. Fenol licuado, 0.040 ml, y EtOH 95%, 2.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 0.400 ml de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.9 a 5.6 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.5 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo círculo a partir del intervalo de pH 4.8 a 5.4.

20 Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo MPEG₃ se preparó en amortiguador acetato de amonio 100mM y el pH se ajustó a 2.8 con HCl 5M. Fenol licuado, 0.040 ml, y EtOH 95%, 1.15 ml, se añadieron a la solución. Después, 0.400 ml de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.8 a 5.6 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.5 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja a partir del intervalo de pH 5.0 a 5.6.

25 9.7.6 Preparación del complejo de Zn cristalino tipo-R de IN105 en 20% orgánico con 0.1 y 0.2% de fenol

30 Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo MPEG₃ se preparó en amortiguador acetato de amonio 100 mM y el pH se ajustó a 3.0 con HCl 5M. Fenol licuado, 0.010 ml, y EtOH 95%, 2.5 ml, se añadieron a la solución. Después, 0.400 ml de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.2 a 5.6 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.5 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo círculo a partir del intervalo de pH 4.4 a 5.4.

35 Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo MPEG₃ se preparó en amortiguador acetato de amonio 100 mM y el pH se ajustó a 3.0 con HCl 5M. Fenol licuado, 0.020 ml, y EtOH 95%, 2.5 ml, se añadieron a la solución. Después, 0.400 ml de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.3 a 5.6 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.5 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo círculo a partir del intervalo de pH 4.4 a 5.2.

45 9.7.7 Preparación del complejo de Zn cristalino tipo-R de IN105 a escala 8.0 gramos, pH 4.8 y temperatura ambiente

50 Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo MPEG₃ se preparó en amortiguador acetato de amonio 250 mM y el pH se ajustó a 2.0 con HCl 5M. Fenol licuado, 2.13 ml, y EtOH 95%, 225 ml, se añadieron a la solución. Después, 21.3 ml de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a 4.8 por medio del uso de NH₄OH 5M. La solución se dejó asentar sin agitación durante 24 horas antes de que los cristales se recogieran. Se observaron cristales tipo-aguja en la foto del microscopio a T=0.

55 Los cristales se recogieron por separación de la mezcla de reacción en 6X250 ml tubos de centrifuga. Los tubos se centrifugaron a 10,000RPM durante 8 minutos a 10°C antes de que el sobrenadante se decantara. Después, a cada tubo, se le añadieron 10 ml de H₂O fría antes de concentrar los 6 tubos en 2 tubos. El proceso de centrifuga se repitió una vez más con agua fría y dos veces más con EtOH frío. Los cristales después se secaron con un liofilizador de sobremesa durante 2 días. El procedimiento produjo 93% de rendimiento (p/p) relativo al material de partida.

9.7.8 Preparación del complejo de Zn cristalino tipo-R de IN105 a escala 1.5 gramos, pH 4.8 y temperatura ambiente

60 Una solución fresca del compuesto de insulina propionilo MPEG₃ (IN105) se preparó por disolución de 1.52 g de IN105 sólido en 100 ml de acetato de amonio 250 mM pH 7.5. La solución se ajustó a 2.8 por medio del uso de HCl 5M / NH₄OH 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60 °C. Se añadieron al frasco de reacción 400 µl fenol fundido y 42.5 ml de EtOH 95%. Después 4 ml de ZnCl₂ 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción.

La solución resultante después se ajustó a pH 4.8 por medio del uso de NH_4OH 5M. La reacción después se dejó asentar sin agitación durante 48 horas antes de que los cristales se recogieran. Se observó la formación de cristales tipo aguja después de 21 horas a través del microscopio.

5 Los cristales se recogieron por separación de la suspensión acuosa de reacción entre 4 x 50 ml tubos de centrífuga. Los tubos se centrifugaron inicialmente a 1000 RPM durante 8 min. El sobrenadante después se decantó. Los cristales en cada tubo se lavaron con 1 x 5 ml alícuota de H_2O helada después se centrifugaron a 3000 RPM durante 8 min. El sobrenadante después se decantó. Se repitió el procedimiento de lavado/centrifugado con 1 x 5 ml alícuota de H_2O helada después con 1 x 5 ml alícuota de EtOH helado. Los cristales después se secaron en un desecador de vacío toda la noche. El procedimiento produjo 73% de rendimiento (p/p) relativo al material de partida.

9.7.9 Preparación del complejo de Zn cristalino tipo-R de IN105 a escala 1.5 gramos, pH 4.4 y temperatura ambiente

15 Una solución fresca del compuesto de insulina propionilo MPEG3 (IN105) se preparó por disolución de 1.50 g de IN105 sólido en 100 ml de acetato de amonio 250 mM pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.6 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 400µl fenol fundido y 42.5 ml de EtOH 95%. Después 4 ml de ZnCl_2 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. La solución resultante después se ajustó a pH 4.4 por medio del uso de NH_4OH 5M. La reacción después se dejó asentar sin agitación durante 22 horas antes de que los cristales se recogieran. Una mezcla de formación y precipitación de cristales tipo aguja se observó después de 2 horas a través del microscopio. La mezcla de reacción parecía ser completamente cristalina después de 21 horas a través del microscopio.

20 Los cristales se recogieron por transferencia de la suspensión acuosa de reacción a 1 x 250 ml tubo de centrífuga. El tubo se centrifugó inicialmente a 10,000 RPM durante 8 min. El sobrenadante después se decantó. Los cristales se lavaron con 1 x 20 ml alícuota de H_2O helada después se centrifugaron a 10,000 RPM durante 8 min. El sobrenadante después se decantó. Se repitió el procedimiento de lavado/centrifugado con 1 x 20 ml alícuota de H_2O helada después con 2 x 20 ml alícuotas de EtOH helado y una alícuota final 1 x 20 ml de H_2O helada. Los cristales después se secaron en un desecador de vacío toda la noche. El procedimiento produjo 67% de rendimiento (p/p) relativo al material de partida.

25 9.7.10 Preparación del complejo de Zn cristalino tipo-R de IN105 a escala 8.0 gramos, pH 4.8 y temperatura ambiente

30 Una solución fresca del compuesto de insulina propionilo MPEG3 (IN105) se preparó por disolución de 7.98 g de IN105 sólido en 533 ml de acetato de amonio 250 mM pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.4 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 2.13 ml fenol fundido y 225 ml de EtOH 95%. Después 21.3 ml de ZnCl_2 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. La solución resultante después se ajustó a pH 4.8 por medio del uso de NH_4OH 5M. La reacción después se dejó asentar sin agitación durante 21 horas antes de que los cristales se recogieran. La mezcla de reacción parecía ser completamente cristalina después de 2 horas a través del microscopio.

35 Los cristales se recogieron por separación de la suspensión acuosa de reacción entre 6 x 250 ml tubos de centrífuga. Los tubos se centrifugaron inicialmente a 10,000 RPM durante 8 min. El sobrenadante después se decantó. Los cristales en cada tubo se lavaron con 1 x 10 ml alícuota de H_2O helada después se centrifugaron a 10,000 RPM durante 8 min. El sobrenadante después se decantó, se repitió el procedimiento de lavado/centrifugado con 1 x 10 ml alícuota de H_2O helada después con 2 x 10 ml alícuotas de EtOH helado y una alícuota final 1 x 10 ml de H_2O helada. Los cristales después se secaron en un desecador de vacío toda la noche. El procedimiento produjo 87% de rendimiento (p/p) relativo al material de partida.

40 9.7.11 Preparación del complejo de Zn cristalino tipo-R de IN105 a escala 10.0 gramos, pH 4.8 y temperatura ambiente

45 Una solución fresca del compuesto de insulina propionilo MPEG3 (IN105) se preparó por disolución de 10.06 g de IN105 sólido en 670 ml de acetato de amonio 250 mM pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.6 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 2.7 ml fenol fundido y 285 ml de EtOH 95%. Después 27 ml de ZnCl_2 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. La solución resultante después se ajustó a pH 4.8 por medio del uso de NH_4OH 5M. La reacción después se dejó asentar sin agitación durante 21 horas antes de que los cristales se recogieran. La mezcla de reacción parecía ser completamente cristalina después de 2.5 horas a través del microscopio.

50 Los cristales se recogieron por separación de la suspensión acuosa de reacción entre 6 x 250 ml tubos de centrífuga. Los tubos se centrifugaron inicialmente a 10°C, 10,000 RPM durante 8 min. El sobrenadante después se decantó. Los cristales en cada tubo se lavaron con 1 x 10 ml alícuota de H_2O helada, y se concentraron en 2 x 250 ml tubos de centrífuga después se centrifugaron a 10°C, 10,000 RPM durante 8 min. El sobrenadante después se decantó, se repitió el procedimiento de lavado/centrifugado con 1 x 30 ml alícuota de H_2O helada después con 2 x 30 ml alícuotas de EtOH

helado y una alícuota final 1 x 30 ml de H₂O helada. Los cristales después se secaron en un desecador de vacío toda la noche. El procedimiento produjo 89% de rendimiento (p/p) relativo al material de partida.

9.8 Preparación y análisis del complejo de Zn cristalino de HIM2 por medio del uso de disolvente orgánico

9.8.1 Preparación del complejo de Zn tipo-R de HIM2

Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.95 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 3.5 ml, se añadieron a la solución. Después, 600ul de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.14 a 6.0 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4 (Ver [la Figura 6A](#)), 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 (Ver [la Figura 6B](#)), 5.6, 5.8, 6.0. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja a pH 4.4. El intervalo de pH a partir de 4.6- 6.0 mostró sólidos tipo cristalinos grandes de diversas formas y tamaños.

Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.95 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 3.5 ml, se añadieron a la solución. Después, 400ul de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.22 a 6.0 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2 (Ver [la Figura 7A](#)), 5.4, 5.6, 5.8, 6.0. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron sólidos tipo cristalinos a partir de pH 4.2-6.0 de diversas formas y tamaños.

Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.95 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 3.5 ml, se añadieron a la solución. Después, 200ul de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.19 a 6.0 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 (Ver [la Figura 7B](#)), 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron sólidos tipo cristalinos a partir de pH 4.4-4.6 de diversas formas y tamaños. El intervalo de pH 4.8-5.2 mostró cristales tipo aguja más uniformes.

Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.95 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 2.6 ml, se añadieron a la solución. Después, 600ul de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.04 a 6.0 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 (Ver [la Figura 8A](#)), 5.6, 5.8, 6.0. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo copo de nieve plano a partir de pH 4.6-5.4.

Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.95 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 2.6 ml, se añadieron a la solución. Después, 400ul de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.05 a 6.0 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 (Ver [la Figura 8B](#)), 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja a pH 5.0, sólidos tipo cristales a pH 5.2 y cristales tipo copo de nieve planos a pH 5.4.

Rxn 6 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.95 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95%, 2.6 ml, se añadieron a la solución. Después, 200ul de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.09 a 6.0 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 (Ver [la Figura 9A](#)), 5.6, 5.8, 6.0. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja y sólido tipo cristal a pH 4.8-5.6.

Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 250ul de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.97 a 5.8 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron precipitación tipo cristal a partir de pH 4.6-5.8

Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95%, 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 200 ul de una solución ZnCl₂ 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.06 a 5.8 por

medio del uso de NH_4OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 (Ver **la Figura 9B**), 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron precipitación tipo cristal a partir de pH 4.6-5.6

5 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 150ul de una solución ZnCl_2 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.09 a 5.8 por medio del uso de NH_4OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio
10 tomadas después de 24 horas mostraron cristales de diversos tamaños y formas a partir de pH 5.0-5.2.

Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95%, 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 100ul de una solución ZnCl_2 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.09 a 5.8 por
15 medio del uso de NH_4OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 (Ver **la Figura 10A**), 5.2, 5.4 (Ver **la Figura 10B**), 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja a pH 5.0 y diversas formas y tamaños del material cristalino a partir de pH 5.2-5.6.

20 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 20ul, y EtOH 95% , 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 250ul de una solución ZnCl_2 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.08 a 5.8 por medio del uso de NH_4OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio
25 tomadas después de 24 horas mostraron precipitación tipo cristal a partir de pH 4.8-5.8

Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 20ul, y EtOH 95%, 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 200ul de una solución ZnCl_2 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.05 a 5.8 por
30 medio del uso de NH_4OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron muy pocos sólidos tipo cristal.

35 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 20ul, y EtOH 95% , 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 200ul de una solución ZnCl_2 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.05 a 5.8 por medio del uso de NH_4OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio
40 tomadas después de 24 horas mostraron muy pocos sólidos tipo cristal.

Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 20ul, y EtOH 95% , 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 100ul de una solución ZnCl_2 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.06 a 5.8 por
45 medio del uso de NH_4OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron muy pocos sólidos tipo cristal.

9.9 Co-cristalización de HIM2 e IN105 con zinc

50 9.9.1 Preparación de complejos de Zn co-cristalizados tipo-R de HIM2 e IN105

9.9.2 50:50 (HIM2:IN105)

55 Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó por disolución de 37.3 mg de HIM2 y 36.4 mg de IN105 en 4 ml de acetato de amonio 250mM, pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.84 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60 °C. Se añadieron al frasco de reacción 16ul de fenol fundido y 1.75 ml de EtOH 95%. Después, 80ul de ZnCl_2 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.19 a 5.60 por medio del uso de NH_4OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.500 ml en cada uno de los
60 siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 4 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 4 horas mostraron diversos tamaños y formas de los cristales a partir del intervalo de pH 4.4 a 5.6.

Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó por disolución de 37.1 mg de HIM2 y 35.9 mg de IN105 en 4 ml de

acetato de amonio 250 mM, pH 7.5. La solución se ajustó a pH 3.03 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 16µl fenol fundido y 1.75 ml de EtOH 95% . Después, 40ul de ZnCl₂ 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. El pH de la solución después se ajustó a partir de 3.38 a 5.60 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.500 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 (Ver [la Figura 11A](#)), 5.2 (Ver [la Figura 11B](#)), 5.4 y 5.6 (Ver [la Figura 12A](#)). Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 4 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 4 horas mostraron cristales tipo aguja, en su mayoría cortos a partir del intervalo de pH 4.6 a 5.6.

9.9.3 70:30 (HIM2:IN105)

Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó por disolución de 53.4 mg de HIM2 y 23.2 mg de IN105 en 4 ml de acetato de amonio 250 mM, pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.62 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 16µl fenol fundido y 1.75 ml de EtOH 95% . Después, 80ul de ZnCl₂ 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.02 a 5.60 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.500 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2 (Ver [la Figura 12B](#)), 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 1 hora. Las fotos del microscopio tomadas después de 1 hora mostraron diversos tamaños y formas de precipitación tipo cristal a partir del intervalo de pH 4.4 a 5.6.

Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó por disolución de 53.6 mg de HIM2 y 24.5 mg de IN105 en 4 ml de acetato de amonio 250 mM, pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.89 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 16µl de fenol fundido y 1.75 ml de EtOH 95% . Después, 40ul de ZnCl₂ 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.28 a 5.60 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.500 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2 (Ver [la Figura 13A](#)), 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 1 hora. Las fotos del microscopio tomadas después de 1 hora mostraron en su mayoría diversos tamaños y formas de precipitación tipo cristal a partir del intervalo de pH 4.6 a 4.8 y muchos, cristales tipo aguja cortas a partir del intervalo de pH 5.0 a 5.4.

9.9.4 30:70 (HIM2:IN105)

Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó por disolución de 23.3 mg de HIM2 y 54.7 mg de IN105 en 4 ml de acetato de amonio 250 mM, pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.84 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 16µl fenol fundido y 1.75 ml de EtOH 95% . Después, 80µl de ZnCl₂ 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.27 a 5.60 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.500 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 1 hora. Las fotos del microscopio tomadas después de 1 hora mostraron en su mayoría diversos tamaños y formas de precipitación tipo cristal a partir del intervalo de pH 4.4 a 5.0 y pocos cristales tipo aguja a partir del intervalo de pH 5.2 a 5.6.

Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó por disolución de 24.8 mg de HIM2 y 54.9 mg de IN105 en 4 ml de acetato de amonio 250 mM, pH 7.5. La solución se ajustó a pH 3.09 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 16µl fenol fundido y 1.75 ml de EtOH 95% . Después, 40µl de ZnCl₂ 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.47 a 5.60 por medio del uso de NH₄OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.500 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 y 5.6 (Ver [la Figura 13B](#)). Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 1 hora. Las fotos del microscopio tomadas después de 1 hora mostraron en su mayoría diversos tamaños de precipitación tipo cristal circular a partir del intervalo de 4.4 a 5.0 y cristales de diversas formas y tamaños a partir de del intervalo de pH 5.2 a 5.6.

9.9.5 Preparación de Complejos de Zn co-cristalizado tipo R de HIM2 y IN105

9.9.6 50:50 (HIM2:IN105)

Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó al disolver 37.4mg de HIM2 y 35.9mg de IN105 en 4 mL de 250 mM acetato amónico pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.60 usando HCl 5M. Fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40 a 60° C. 16µL de fenol fundido y 1.75mL de EtOH 95% se añadieron al matraz de reacción. Después, 40uL de ZnCl₂ acuoso acidificado al 4% se añadió al matraz de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.15 a 5.60 mediante el uso de 5M NH₄OH y extrayendo alícuotas de 0.500mL a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6,4.8, 5.0, 5.2, 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron reposar sin agitación durante 24 horas. Las imágenes del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron sólidos de cristal de varias formas y tamaños desde pH=4.6-5.6.

9.9.7 70:30 (HIM2:IN105)

Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó al disolver 57.0mg de HIM2 y 24.5mg de IN105 en 4 mL de 250 mM acetato amónico pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.43 usando HCl 5M. Fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40 a 60° C. 16µL de fenol fundido y 1.75mL de EtOH 95% se añadieron al matraz de reacción. Después, 40µL de ZnCl₂ acuoso acidificado al 4% se añadió al matraz de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.92 a 5.60 mediante el uso de 5M NH₄OH y extrayendo alícuotas de 0.500mL a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6 (Ver **Figura 14A**), 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron reposar sin agitación durante 24 horas. Las imágenes del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja desde pH 5.0-5.2.

9.9.8 30:70 (HIM2:IN105)

Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó al disolver 24.1mg de HIM2 y 53.8mg de IN105 en 4 mL de 250 mM acetato amónico pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.35 usando HCl 5M. Fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40 a 60° C. 16µL de fenol fundido y 1.75mL de EtOH 95% se añadieron al matraz de reacción. Después, 40µL de ZnCl₂ acuoso acidificado al 4% se añadió al matraz de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.60 a 5.60 mediante el uso de 5M NH₄OH y extrayendo alícuotas de 0.500mL a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 (Ver **Figura 14B**), 5.2, 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron reposar sin agitación durante 24 horas. Las imágenes del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja desde pH 5.0-5.2.

9.9.9 Preparación de Complejos de Zn co-cristalizado tipo R de HIM2 e insulina humana

9.9.10 50:50 (IHM2:Insulina)

Una solución fresca de HIM2 e insulina se preparó al disolver 39.2mg de HIM2 y 36.7mg de insulina en 4 mL de 250 mM acetato amónico pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.53 usando HCl 5M. Fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40 a 60° C. 16µL de fenol fundido y 1.75mL de EtOH 95% se añadieron al matraz de reacción. Después, 40µL de ZnCl₂ acuoso acidificado al 4% se añadió al matraz de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.82 a 5.60 mediante el uso de 5M NH₄OH y extrayendo alícuotas de 0.500mL a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2 (Ver **Figura 15A**), 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron reposar sin agitación durante 24 horas. Las imágenes del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron varias formas y tamaños de sólido tipo cristal desde pH 5.2 y 5.4. Se observaron muchas diminutos cristales, en forma de aguja a pH 5.6.

9.9.11 70:30 (IHM2:Insulina)

Una solución fresca de HIM2 e insulina se preparó al disolver 56.5mg de HIM2 y 20.2mg de insulina en 4 mL de 250 mM acetato amónico pH 7.5. La solución se ajustó a pH 3.23 usando HCl 5M. Fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40 a 60° C. 16µL de fenol fundido y 1.75mL de EtOH 95% se añadieron al matraz de reacción. Después, 40µL de ZnCl₂ acuoso acidificado al 4% se añadió al matraz de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.82 a 5.60 mediante el uso de 5M NH₄OH y extrayendo alícuotas de 0.500mL a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron reposar sin agitación durante 24 horas. Las imágenes del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron varias formas y tamaños de sólido tipo cristal desde pH 5.2 and 5.6.

9.9.12 30:70 (IHM2:Insulina)

Una solución fresca de HIM2 e insulina se preparó al disolver 21.8mg de HIM2 y 49.2mg de insulina en 4 mL de 250 mM acetato amónico pH 7.5. La solución se ajustó a pH 3.23 usando HCl 5M. Fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40 a 60° C. 16µL de fenol fundido y 1.75mL de EtOH 95% se añadieron al matraz de reacción. Después, 40µL de ZnCl₂ acuoso acidificado al 4% se añadió al matraz de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.93 a 5.60 mediante el uso de 5M NH₄OH y extrayendo alícuotas de 0.500mL a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 (Ver **Figura 15B**) y 5.6. Las muestras se dejaron reposar sin agitación durante 24 horas. Las imágenes del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo copo de nieve, planos a pH 4.8. A pH 5.0, hubo una mezcla de cristales tipo agujas y copo de nieve. A partir de pH 5.2-5.6 se observaron muchos cristales pequeños, similares a agujas.

10 Solubilidad acuosa de los complejos de Zn

Doscientos microlitros de 0.1M de amortiguador de fosfato salino (PBS, filtrado, pH = 7.4) se añadieron a un frasco de reacción cónico de 1 mL. A este frasco, se añadió una pequeña cantidad de muestra lentamente hasta que se observa la saturación. Periódicamente, la solución se agitó en vórtex. Después de la saturación, el frasco se colocó en un tubo centrífuga pequeño y la muestra se centrifugó a 2000RPM por 3min a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, 10µL de la muestra se eliminó del sobrenadante y se diluyó en 490 µL de amortiguador (0.1M PBS). Esta muestra diluida se analizó a través de HPLC para determinar su concentración.

Conjugado	Solubilidad	Zn	fenol
IN105	~26mg/mL	N/A	N/A
ZnIN105	15mg/mL - 20mg/mL	0.44%	0.76%
ZnIN105	~24mg/mL	0.61%	1.11%
ZnIN105	15mg/mL - 20mg/mL	0.63%	1.04%

11 Ejemplos de resistencia enzimática *in vitro* para los complejos de Zn IN105

Los conjugados de compuestos de insulina (IN105) se proporcionaron en 10 mM de regulador de fosfato sódico (a pH de aproximadamente 7.4) y sus concentraciones se determinaron por HPLC (las soluciones se diluyen con amortiguador de manera que las comparaciones equimolares pueden realizarse entre parentales and conjugados ~0.6 mg/mL). La enzima quimotripsina liofilizada se resuspendió en HCl 1 mM a una concentración de ~7.53 U/mL. Una alícuota de 1.53 mL de cada muestra se añadió a tubos de muestra y 0.850 mL en tubos de control. Las muestras se probaron por duplicado junto con cuatro tubos de control por muestra. Las alícuotas se incubaron a 37°C en un termomezclador por 15 minutos. Después 17 µL de enzima quimotripsina se añadió a cada tubo de muestra. Cinco µL de HCl 1 mM se añadió a cada tubo de control. Inmediatamente después de las adiciones, se eliminaron 200 µL de la muestra y los tubos de control y se colocaron en 50 µL de TFA al 1% previamente en alícuotas en los tubos de centrifuga. Esta muestra sirve como T=0.

El procedimiento de muestreo para la compuesto de insulina (libre de Zn), IN105 (libre de Zn) y compuesto de insulina (compuesto de insulina regular) se repitió en los siguientes intervalos: 0, 2, 5, 8, 12, 15, y 30 minutos. El procedimiento de control se repitió en los siguientes intervalos: 0, 8, 15, 30 minutos. Para las muestras de tipo T y tipo R, el procedimiento se repitió en los siguientes intervalos: 0, 5, 8, 12, 30, 40 y 60 minutos. El procedimiento de control para los complejos de Zn se repitió en los siguientes intervalos: 0, 12, 40 y 60 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el análisis que puede ocurrir a través de HPLC. HPLC se llevó a cabo para determinar el porcentaje degradación relativo a la T= 0 minuto respectiva para cada digestión. El logaritmo natural del porcentaje restante se graficó contra el tiempo y se ejecutó una regresión lineal para cada digestión. La media vida se calculó mediante el uso de la ecuación: $t_{1/2} = -0.693/\text{pendiente}$.

Resultados a 0.6 mg/ml proteína:

Muestra	T media	Contenido de Zinc	Contenido de fenol
Compuesto de insulina (libre de zinc)	4.9 min	0.0	--
IN105 (libre de zinc)	12.5 min	0.0	--
IN105 (libre de zinc)	11.1 min	0.0	--
Compuesto de insulina, USP (Compuesto de insulina regular)	11.6 min	0.3 a 1% p/p	---
IN105 (complejo de zinc tipo R)	55.3 min	1.85 % p/p	2.37 % p/p
IN105 (complejo de zinc tipo T)	54.8 min	1.88 % p/p	---

12 Ejemplos y Experimentos de Formulación

12.1 Ejemplos y Experimentos de Formulación líquida

5 12.1.1 Solución amortiguadora para el estudio del amortiguador Zn-HIM2 tipo R6

Componentes	Cantidad en 1mL solución
Fosfato sódico dibásico	1.88 mg
Componente de insulina	3.7 mg (100 unidades)
Glicerina	16.0 mg
Fenol (o m-Cresol)	3.0 mg
Zinc	0.037mg (1 % p/p de insulina)*
pH	7.4 a 7.8**
* Ajuste de la cantidad de Zinc a 0.037mg/ml por 3.7mg/ml de insulina por adición de cloruro de zinc y basarse el contenido de zinc en el sólido de Zinc HIM 2.	
** pH puede ajustarse con HCl 10% y/o hidróxido sódico 10%	

12.1.2 Preparación del formulación líquida oral diluyente de ácido cáprico/ácido láurico

Se transfirieron aproximadamente 60% del volumen requerido de agua estéril en un contenedor adecuado. Se añadió la cantidad adecuada (como se indica en la tabla más abajo) de trometamina, trolamina, ácido cítrico anhidro, y bolitas de hidróxido sódico al contenedor y se mezcló bien hasta disolverse. Se ajustó la temperatura a 21 – 25 °C (o temperatura ambiente) y se midió el pH del líquido. Se ajustó el pH a 7.7 - 7.9 según fuera necesario mediante el uso de hidróxido sódico 1N o ácido clorhídrico 1N. Después, se ajustó la temperatura a 45 – 50 °C por calentamiento sobre una placa calefactora y se mantiene esta temperatura. A continuación, se añadió el ácido cáprico a la solución caliente y se mezcló hasta que el ácido cáprico se disolvió. Se ajustó la temperatura a 21 - 25° C (o temperatura ambiente) y se midió el pH del líquido. Según fuera necesario, se ajustó el pH a 7.7 - 7.9 mediante el uso de hidróxido sódico 1N o ácido clorhídrico 1N. Después se mezcló la solución por 5 minutos. Se añadió una cantidad adecuada de agua estéril a igual a 100% del volumen requerido y se mezcló bien.

Componente	Porcentaje (%p/v)
trometamina	4.24
trolamina	5.22
Ácido cítrico anhidro	6.72
Bolitas de hidróxido sódico	1.88
ácido cáprico	0.50
ácido láurico	0.50
hidróxido sódico, 1N	<i>según sea necesario para ajustar pH 7.7 - 7.9</i>
ácido clorhídrico, 1N	<i>según sea necesario para ajustar pH 7.7 - 7.9</i>
agua estéril	Diluir hasta el volumen requerido

IN105, HIM2 o ZnHIM2 se pesó en las cantidades necesarias para alcanzar la concentración apropiada para los estudios de dosificación, por ejemplo, 1 mg IN105 (de proteína) se pesó y se combinó con 1 mL de formulación para producir un 1 mg/mL de IN105 en la formulación.

12.1.3 Preparación de la formulación líquida oral diluyente de ácido oleico/ácido cáprico/ácido láurico/colato

Una formulación líquida oral de Zn HIM2 tipo R se preparó con los componentes mostrados en la siguiente tabla:

Componente	Porcentaje (%p/v)
trometamina	4.24
trolamina	5.22
Ácido cítrico anhidro	6.72
Bolitas de hidróxido sódico	1.88
colato de sodio	3.00
Ácido oléico	1.00
ácido cáprico	0.50
ácido láurico	0.50
Solución de sucralosa, 25%	0.80
sabor fresa	0.40
hidróxido sódico, 1N	<i>según sea necesario para ajustar pH 7.7 - 7.9</i>
ácido clorhídrico, 1N	<i>según sea necesario para ajustar pH 7.7 - 7.9</i>
agua estéril	Diluir hasta el volumen requerido

Se prepararon muestras líquidas orales que contenían 1 mg/mL de proteína equivalente de Zn HIM2 tipo R (ZnHIM2-R). El ZnHIM2-R se eliminó del congelador (-20 °C), se colocó en un desecador y se dejó llegar a temperatura ambiente. Un 1 mg/mL de proteína equivalente de ZnHIM2-R se preparó en solución diluyente líquida oral como sigue. Se pesaron 6.4 mg de ZnHIM2-R. Después, 5.0 mL de diluyente líquido oral se transfirió en el contenedor y se agitó suavemente para mezclar. La solución demoró aproximadamente 45 minutos en disolverse. La solución resultante fue una suspensión (aparición turbia). Antes de la dosificación, la solución se agitó suavemente por 60 segundos para asegurar que la solución fuera una solución homogénea. Para ZnHIM2-R, el contenido de proteína fue 78.6%, 1 mg/mL de proteína equivalente, cantidad = 5 mL. Cantidad de ZnHIM2-R = $(1 \text{ mg/mL}) / (0.786) \times (5.0 \text{ mL}) = 6.4 \text{ mg}$. concentración de ZnHIM2-R = $(6.4 \text{ mg}) / (5.0 \text{ mL}) = 1.28 \text{ mg/mL}$ (equivalente para 1 mg/mL ajustado al contenido de proteína).

12.1.4 Preparación de formulaciones líquidas de ácido cáprico

Se transfirieron aproximadamente 60% del volumen requerido de agua estéril en un contenedor adecuado. Se añadió la cantidad adecuada (como se indica en la tabla más abajo) de trometamina, trolamina, ácido cítrico anhidro, y bolitas de hidróxido sódico al contenedor y se mezcló bien hasta disolverse. Se ajustó la temperatura a 21 - 25° C (o temperatura ambiente) y se midió el pH del líquido. Se ajustó el pH a 7.7 - 7.9 según fuera necesario mediante el uso de hidróxido sódico 1N o ácido clorhídrico 1N. Después, se ajustó la temperatura a 45 - 50° C por calentamiento sobre una placa calefactora y se mantiene esta temperatura. A continuación, se añadió el ácido cáprico a la solución caliente y se mezcló hasta que el ácido cáprico se disolvió. Se ajustó la temperatura a 21 - 25° C (o temperatura ambiente) y se midió el pH del líquido. Según fuera necesario, se ajustó el pH a 7.7 - 7.9 mediante el uso de hidróxido sódico 1N o ácido clorhídrico 1N. Después se mezcló la solución por 5 minutos. Se añadió una cantidad adecuada de agua estéril a igual a 100% del volumen requerido y se mezcló bien.

Componente	% p/v
trometamina	4.24
trolamina	5.22
Ácido cítrico anhidro	6.72
Bolitas de hidróxido sódico	1.88
ácido cáprico	0.9, 1.5, 3.0 o 6.0
hidróxido sódico, 1N	<i>según sea necesario para ajustar pH</i>
ácido clorhídrico, 1N	<i>según sea necesario para ajustar pH</i>
agua estéril	hasta el volumen requerido

IN105 se pesó en las cantidades necesarias para alcanzar la concentración apropiada para los estudios de dosificación, por ejemplo, 1 mg IN105 (de proteína) se pesó y se combinó con 1 mL de la formulación para producir un 1 mg/mL de IN105 en la formulación.

5 12.1.5 Caprato y/o laurato en formulaciones líquidas de amortiguador de fosfato

10 Preparación de 100 mM de amortiguador de fosfato sódico, pH 7.8 o 8.2. Se transfirieron 1.17 gramos de fosfato monosódico monohidrato a un matraz de 1-L. Aproximadamente 500 mL de agua estéril se añadieron y se mezcló bien hasta que se disolvió. Después se añadieron 24.58 gramos de fosfato dibásico sódico heptahidrato y se mezcló bien hasta que se disolvió. Se diluyó hasta volumen con agua estéril y se mezcló bien. Se filtró a través de un filtro de 0.22 µm. Se ajustó el pH a 7.8 o 8.2 con HCl 1N o NaOH 1N.

15 Para IN105, se transfirieron 60% del volumen adecuado del amortiguador de fosfato pH 7.8 u 8.2 en un contenedor adecuado. Después se añadió una cantidad de caprato calculada para producir 3% p/v de la solución final y se mezcló bien hasta que se disolvió. Después, se ajustó el pH a 7.8 u 8.2 con HCl 1N o NaOH 1N. Se diluyó hasta el volumen adecuado (por ejemplo, 100 mL) con amortiguador de fosfato pH 7.8 u 8.2.

Componente	% p/v
Caprato de sodio	3.0
100 mM amortiguador de fosfato sódico, pH 7.8 o 8.2	Csp para 100%

25 Para BN-054, se pesaron 400 gramos de amortiguador de fosfato sódico 100 mM, pH 7.8 en un contenedor adecuado. Se añadieron 9.7 gramos de caprato de sodio y 11.1 gramos de laurato de sodio y se mezcló bien hasta que se disolvió. Se añadió una cantidad adecuada de 100 mM amortiguador de fosfato sódico, pH 7.8, para igualar un peso neto de 500 gramos.

Componente	% p/p
Caprato de sodio	1.94
Laurato de sodio	2.22
100 mM amortiguador de fosfato sódico, pH 7.8	Csp para 100%

12.1.6 Formulación líquida con arginina o trolamina

40 Preparación de amortiguador de fosfato sódico 100 mM, pH 7.8. Se transfirieron 1.17 gramos de fosfato monosódico monohidrato a un matraz de 1-L. Aproximadamente 500 mL de agua estéril se añadieron y se mezcló bien hasta que se disolvió. Después se añadieron 24.58 gramos de fosfato dibásico sódico heptahidrato y se mezcló bien hasta que se disolvió. Se diluyó hasta volumen con agua estéril y se mezcló bien. Se filtró a través de un filtro de 0.22 µm. Se ajustó el pH a 7.8 con HCl 1N o NaOH 1N.

45 60% del volumen adecuado se transfirió al amortiguador de fosfato pH 7.8 en un contenedor adecuado. Se añadió la cantidad adecuada (como se indica en la tabla más abajo) de arginina o trolamina al contenedor y se mezcló bien hasta que se disolvió. Después se añadió una cantidad de caprato calculada para producir 3% p/v de la solución final y se mezcló bien hasta que se disolvió. Después, se ajustó el pH a 7.8 con HCl 1N o NaOH 1N. Se diluyó hasta el volumen adecuado (por ejemplo, 100 mL) con amortiguador de fosfato pH 7.8.

Componente	% p/v
Caprato de sodio	3.0
Arginina o trolamina	0.4 o 1.2
100 mM amortiguador de fosfato sódico, pH 7.8	Csp para 100%

60

IN105 se pesó en las cantidades necesarias para alcanzar la concentración apropiada para los estudios de dosificación, por ejemplo, 1 mg IN105 (de proteína) se pesó y se combinó con 1 mL de la formulación para producir un 1 mg/mL de IN105 en la formulación.

5 12.1.7 Formulación líquida con ácido caprílico

10 Se transfirieron aproximadamente 60% del volumen requerido de agua estéril en un contenedor adecuado. Se añadió la cantidad adecuada (como se indica en la tabla más abajo) de trometamina, trolamina, ácido cítrico anhidro, y bolitas de hidróxido sódico al contenedor y se mezcló bien hasta disolverse. Se ajustó la temperatura a 21 - 25° C (o temperatura ambiente) y se midió el pH del líquido. Se ajustó el pH a 7.7 - 7.9 según fuera necesario mediante el uso de hidróxido sódico 1N o ácido clorhídrico 1N. Después, se ajustó la temperatura a 45 - 50° C por calentamiento sobre una placa calefactora y se mantiene esta temperatura. Después añadió el ácido cáprico a la solución caliente y se mezcló hasta que el ácido cáprico se disolvió. Se ajustó la temperatura a 21 - 25° C (o temperatura ambiente) y se midió el pH del líquido. Según fuera necesario, se ajustó el pH a 7.7 - 7.9 mediante el uso de hidróxido sódico 1N o ácido clorhídrico 1N. Después se mezcló la solución por 5 minutos. Se añadió una cantidad adecuada de agua estéril a igual a 100% del volumen requerido y se mezcló bien.

Componente	% p/v
trometamina	4.24
trolamina	5.22
Ácido cítrico anhidro	6.72
Bolitas de hidróxido sódico	1.88
ácido caprílico	3.0
hidróxido sódico, 1N	según sea necesario para ajustar pH
ácido clorhídrico, 1N	según sea necesario para ajustar pH
agua estéril	hasta el volumen requerido

35 IN105 se pesó en las cantidades necesarias para alcanzar la concentración apropiada para los estudios de dosificación, por ejemplo, 1 mg IN105 (de proteína) se pesó y se combinó con 1 mL de la formulación para producir un 1 mg/mL de IN105 en la formulación.

12.1.8 Formulación líquida con ácido linoleico

40 Preparación de amortiguador de fosfato sódico 100 mM, pH 7.8. Se transfirieron 1.17 gramos de fosfato monosódico monohidrato a un matraz de 1-L. Aproximadamente 500 mL de agua estéril se añadieron y se mezcló bien hasta que se disolvió. Después se añadieron 24.58 gramos de fosfato dibásico sódico heptahidrato y se mezcló bien hasta que se disolvió. Se diluyó hasta volumen con agua estéril y se mezcló bien. Se filtró a través de un filtro de 0.22 µm. Se ajustó el pH a 7.8 con HCl 1N o NaOH 1N.

45 60% del volumen adecuado se transfirió al amortiguador de fosfato pH 7.8 en un contenedor adecuado. Después se añadió una cantidad de sal sódica de ácido linoleico calculada para producir 3% p/v de la solución final y se mezcló bien hasta que se disolvió. Después, se ajustó el pH a 7.8 con HCl 1N o NaOH 1N. Se diluyó hasta el volumen adecuado (por ejemplo, 100 mL) con amortiguador de fosfato pH 7.8.

Componente	% p/v
Sal sódica de ácido linoleico	3.0
100 mM amortiguador de fosfato sódico, pH 7.8	Csp para 100%

12.1.9 Preparación de formulaciones líquidas de ácido cáprico y ácido láurico

60 Se transfirieron aproximadamente 60% del volumen requerido de agua estéril en un contenedor adecuado. Se añadió la cantidad adecuada (como se indica en la tabla más abajo) de trometamina, trolamina, ácido cítrico anhidro, y bolitas de hidróxido sódico al contenedor y se mezcló bien hasta disolverse. Se ajustó la temperatura a 21 - 25° C (o temperatura ambiente) y se midió el pH del líquido. Se ajustó el pH a 7.7 - 7.9 según fuera necesario mediante el uso de hidróxido

sódico 1N o ácido clorhídrico 1N. Después, se ajustó la temperatura a 45 - 50° C por calentamiento sobre una placa calefactora y se mantiene esta temperatura. Después añadió el ácido cáprico y/o ácido láurico a la solución caliente y se mezcló hasta que el ácido cáprico y/o ácido láurico se disolvieron. Se ajustó la temperatura a 21 - 25° C (o temperatura ambiente) y se midió el pH del líquido. Según fuera necesario, se ajustó el pH a 7.7 - 7.9 mediante el uso de hidróxido sódico 1N o ácido clorhídrico 1N. Después se mezcló la solución por 5 minutos. Se añadió una cantidad adecuada de agua estéril a igual a 100% del volumen requerido y se mezcló bien.

Componente	% p/v
trometamina	4.24
trolamina	5.22
Ácido cítrico anhidro	6.72
Bolitas de hidróxido sódico	1.88
ácido cáprico	0, 0.1 o 0.9
ácido láurico	0, 0.9 o 0.1
hidróxido sódico, 1N	según sea necesario para ajustar pH
ácido clorhídrico, 1N	según sea necesario para ajustar pH
agua estéril	hasta el volumen requerido

IN105 se pesó en las cantidades necesarias para alcanzar la concentración apropiada para los estudios de dosificación, por ejemplo, 1 mg IN105 (de proteína) se pesó y se combinó con 1 mL de la formulación para producir un 1 mg/mL de IN105 en la formulación.

12.2 Ejemplos y experimentos de formulación de dosificación sólida

12.2.1 Preparación y perfil de disolución de la formulación de dosificación sólida de caprato/laurato mediante el uso de Nobex-IN105-[854]-

Transferir aproximadamente 58 mg de caprato de sodio, 57 mg de laurato de sodio, 286 mg manitol, 30 mg de glicolato sódico de almidón, y 6 mg (proteína) de Nobex-IN105 sobre un pedazo de papel pesado y se mezclan a fondo. Transferir la mezcla a la prensa y comprimir a aproximadamente 350 psi para formar una tableta.

Forma de dosificación sólida (Tabletas) Formulación Nobex-IN105-[854] 58 mg de caprato y 57 mg de laurato por Tableta

Componente	mg por Tableta
Caprato de sodio	58
Laurato de sodio	57
Manitol	286
Explotab (glicolato sódico de almidón)	30
Nobex-IN105 (proteína)	6

La prueba de disolución se llevó a cabo mediante el uso de una unidad de disolución del aparato USP 2. El medio era agua, velocidad de la paleta 50 rpm, y el volumen del medio fue 500 mL. Las muestras de disolución se analizaron por HPLC mediante el uso de un sistema gradiente. Las fases móviles fueron agua con 0.1% TFA (fase móvil A) y acetonitrilo con 0.1% TFA (fase móvil B). El gradiente utilizado fue: 0 minutos 100% fase móvil A, 11 minutos 65% fase móvil A, 15 minutos 20% fase móvil A, 16 minutos 20% fase móvil A, 17 minutos 100% fase móvil A. La longitud de onda fue 214 nm y la columna fue una C18 (150 x 2 mm). Las siguientes tablas y gráficos resumen los datos de disolución obtenidos para la prueba de disolución de la formulación de tabletas Nobex-Zn-IN105 [854] que contienen 6

ES 2 535 823 T3

mg de Zn-IN105 (proteína), 286 mg de manitol, 58 mg de caprato de sodio, 57 mg de laurato de sodio, y 30 mg de glicolato sódico de almidón (Explotab):

Resumen de datos para el perfil de disolución de tabletas Nobex-Zn-IN105 [854], % IN105 disuelto

5

Tiempo de la muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	71	72	72
10	86	94	90
15	87	96	92
30	89	96	93
45	90	96	93
60	87	96	92

10

15

20

Resumen de datos para el perfil de disolución de tabletas Nobex-Zn-IN105 [854], % caprato disuelto

25

Tiempo de muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	98	93	96
10	102	104	103
15	101	104	103
30	102	105	104
45	102	104	103
60	102	105	104

30

35

Resumen de datos para el perfil de disolución de Tabletass Nobex-Zn-IN105 [854], % de laurato disuelto

40

Tiempo de muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	72	75	74
10	90	89	90
15	91	90	91
30	88	91	90
45	89	91	90
60	91	90	91

45

50

55

12.2.2 Forma de dosificación sólida (Tableta) Preparación de la Formulación 143 mg de caprato y 140 mg de laurato por Tableta

Preparación de la formulación Nobex-IN105-[856]

60

Transferir aproximadamente 143 mg de caprato de sodio, 140 mg de laurato de sodio, 150 mg manitol, 30 mg de glicolato sódico de almidón, y 6 mg (proteína) de Nobex-IN105 sobre un pedazo de papel pesado y se mezclan a fondo. Transferir la mezcla a la prensa y comprimir a aproximadamente 350 psi para formar una tableta.

Forma de dosificación sólida (Tabletas) Formulación Nobex-IN105-[856] 143 mg de caprato y 140 mg de laurato por Tableta

5

Componente	mg por Tableta
Caprato de sodio	143
Laurato de sodio	140
Manitol	150
Explotab (glicolato sódico de almidón)	30
Nobex-IN105 (proteína)	6

10

15

20

25

La prueba de disolución se llevó a cabo mediante el uso de una unidad de disolución del aparato USP 2. El medio era agua, velocidad de la paleta 50 rpm, y el volumen del medio fue 500 mL. Las muestras de disolución se analizaron por HPLC mediante el uso de un sistema gradiente. Las fases móviles fueron agua con 0.1% TFA (fase móvil A) y acetonitrilo con 0.1% TFA (fase móvil B). El gradiente utilizado fue: 0 minutos 100% fase móvil A, 11 minutos 65% fase móvil A, 15 minutos 20% fase móvil A, 16 minutos 20% fase móvil A, 17 minutos 100% fase móvil A. La longitud de onda fue 214 nm y la columna fue una C18 (150 x 2 mm). Las siguientes tablas y gráficos resumen los datos de disolución obtenidos para la prueba de disolución de la formulación de tabletas Nobex-Zn-IN105 que contienen 6 mg Zn-IN105 (proteína), 150 mg de manitol, 143 mg de caprato de sodio, 140 mg laurato de sodio, y 30 mg de glicolato sódico de almidón (Explotab):

Resumen de datos para el perfil de disolución de tabletas Nobex-Zn-IN105 [856], % IN105 disuelto

30

Tiempo de muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	43	31	37
10	66	53	60
15	81	72	77
30	98	97	98
45	98	99	99
60	96	98	97

35

40

Resumen de datos para el perfil de disolución de tabletas Nobex-Zn-IN105 [856], % caprato disuelto

45

Tiempo de muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	36	32	34
10	68	57	63
15	89	79	84
30	105	103	104
45	105	103	104
60	105	104	105

50

55

60

Resumen de datos para el perfil de disolución de Tabletas Nobex-Zn-IN105 [856], % de laurato disuelto

Tiempo de muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	35	25	30
10	61	44	53
15	74	61	68
30	93	88	91
45	93	91	92
60	93	92	93

12.2.3 Forma de dosificación sólida (Tableta) Preparación de la Formulación 143 mg de caprato por Tableta

Preparación de la formulación Nobex-IN105-[859]

Transferir aproximadamente 143 mg de caprato de sodio, 150 mg de manitol, 30 mg de glicolato sódico de almidón, y 6 mg (proteína) de Nobex-IN105 sobre un pedazo de papel pesado y se mezclan a fondo. Transferir la mezcla a la prensa y comprimir a aproximadamente 350 psi para formar una tableta.

Forma de dosificación sólida (Tabletas) Formulación Nobex-IN105-[859] 143 mg de caprato por Tableta

Componente	mg por Tableta
Caprato de sodio	143
Manitol	150
Explotab (glicolato sódico de almidón)	30
Nobex-IN105 (proteína)	6

La prueba de disolución se llevó a cabo mediante el uso de una unidad de disolución del aparato USP 2. El medio era agua, velocidad de la paleta 50 rpm, y el volumen del medio fue 500 mL. Las muestras de disolución se analizaron por HPLC mediante el uso de un sistema gradiente. Las fases móviles fueron agua con 0.1% TFA (fase móvil A) y acetonitrilo con 0.1% TFA (fase móvil B). El gradiente utilizado fue: 0 minutos 100% fase móvil A, 11 minutos 65% fase móvil A, 15 minutos 20% fase móvil A, 16 minutos 20% fase móvil A, 17 minutos 100% fase móvil A. La longitud de onda fue 214 nm y la columna fue una C18 (150 x 2 mm). Las siguientes tablas y gráficos resumen los datos de disolución obtenidos para la prueba de disolución de la formulación de tabletas Nobex-Zn-IN105 que contienen 6 mg Zn-IN105 (proteína), 150 mg de manitol, 143 mg de caprato de sodio, y 30 mg de glicolato sódico de almidón (Explotab):

Resumen de datos para el perfil de disolución de tabletas Nobex-Zn-IN105 [859], % IN105 disuelto

Tiempo de muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	11	26	19
10	63	58	61
15	84	80	82
30	86	88	87
45	88	88	88
60	87	89	88

Resumen de datos para el perfil de disolución de tabletas Nobex-Zn-IN105 [859], % caprato disuelto

Tiempo de muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	61	43	52
10	93	72	83
15	99	95	97
30	99	100	100
45	99	100	100
60	99	100	100

12.2.4 Forma de dosificación sólida (Tableta) Preparación de la Formulación 286 mg de caprato por Tableta

Preparación de la formulación Nobex-IN105-[860]

Transferir aproximadamente 286 mg de caprato de sodio, 150 mg de manitol, 30 mg de glicolato sódico de almidón, y 6 mg (proteína) de Nobex-IN105 sobre un pedazo de papel pesado y se mezclan a fondo. Transferir la mezcla a la prensa y comprimir a aproximadamente 350 psi para formar una tableta.

Forma de dosificación sólida (Tabletas) Formulación Nobex-IN105-[860] 286mg de caprato por Tableta

Componente	mg por Tableta
Caprato de sodio	286
Manitol	150
Explotab (glicolato sódico de almidón)	30
Nobex-IN105 (proteína)	6

La prueba de disolución se llevó a cabo mediante el uso de una unidad de disolución del aparato USP 2. El medio era agua, velocidad de la paleta 50 rpm, y el volumen del medio fue 500 mL. Las muestras de disolución se analizaron por HPLC mediante el uso de un sistema gradiente. Las fases móviles fueron agua con 0.1% TFA (fase móvil A) y acetonitrilo con 0.1% TFA (fase móvil B). El gradiente utilizado fue: 0 minutos 100% fase móvil A, 11 minutos 65% fase móvil A, 15 minutos 20% fase móvil A, 16 minutos 20% fase móvil A, 17 minutos 100% fase móvil A. La longitud de onda fue 214 nm y la columna fue una C18 (150 x 2 mm). Las siguientes tablas y gráficos resumen los datos de disolución obtenidos para la prueba de disolución de la formulación de tabletas Nobex-Zn-IN105 que contienen 6 mg Zn-IN105 (proteína), 150 mg de manitol, 286 mg de caprato de sodio, y 30 mg de glicolato sódico de almidón (Explotab):

Resumen de datos para el perfil de disolución de tabletas Nobex-Zn-IN105 [860], % IN105 disuelto

Sample Time (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	28	19	24
10	53	44	49
15	70	68	69
30	92	90	91
45	92	92	92
60	92	93	93

Resumen de datos para el perfil de disolución de tabletas Nobex-Zn-IN105 [860], % caprato disuelto

Sample Time (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	29	35	32
10	52	66	59
15	70	84	77
30	99	99	99
45	99	99	99
60	99	100	100

12.2.5 Forma de dosificación sólida (Tableta) Preparación de la Formulación 100 mg de caprato por Tableta

Preparación de la formulación Nobex-IN105-[861]

Transferir aproximadamente 100 mg de caprato de sodio, 150 mg de manitol, 25 mg de glicolato sódico de almidón, y 6 mg (proteína) de Nobex-IN105 sobre un pedazo de papel pesado y se mezclan a fondo. Transferir la mezcla a la prensa y comprimir a aproximadamente 350 psi para formar una tableta.

Forma de dosificación sólida (Tabletas) Formulación Nobex-IN105-[861] 100 mg de caprato por Tableta

Componente	mg por Tableta
Caprato de sodio	100
Manitol	150
Explotab (glicolato sódico de almidón)	25
Nobex-IN105 (proteína)	6

La prueba de disolución se llevó a cabo mediante el uso de una unidad de disolución del aparato USP 2. El medio era agua; velocidad de la paleta 50 rpm, y el volumen del medio fue 500 mL. Las muestras de disolución se analizaron por HPLC mediante el uso de un sistema gradiente. Las fases móviles fueron agua con 0.1% TFA (fase móvil A) y acetonitrilo con 0.1% TFA (fase móvil B). El gradiente utilizado fue: 0 minutos 100% fase móvil A, 11 minutos 65% fase móvil A, 15 minutos 20% fase móvil A, 16 minutos 20% fase móvil A, 17 minutos 100% fase móvil A. La longitud de onda fue 214 nm y la columna fue una C18 (150 x 2 mm). Las siguientes tablas y gráficos resumen los datos de disolución obtenidos para la prueba de disolución de la formulación de tabletas Nobex-Zn-IN105 que contienen 6 mg Zn-IN105 (proteína), 150 mg de manitol, 100 mg de caprato de sodio, y 25 mg de glicolato sódico de almidón (Explotab):

Resumen de datos para el perfil de disolución de tabletas Nobex-Zn-IN105 [861], % IN105 disuelto

Sample Time (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	77	41	59
10	94	84	89
15	96	90	93
30	95	91	93
45	95	91	93
60	97	89	93

ES 2 535 823 T3

Resumen de datos para el perfil de disolución de tabletas Nobex-Zn-IN105 [861], % caprato disuelto

Sample Time (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	97	77	87
10	101	99	100
15	101	103	102
30	101	103	102
45	101	104	103
60	101	104	103

12.2.6 Forma de dosificación sólida (Tableta) Preparación de la Formulación 150 mg de caprato por Tableta

Preparación de la formulación Nobex-IN105-[862]

Transferir aproximadamente 150 mg de caprato de sodio, 150 mg de manitol, 25 mg de croscarmelosa de sodio, y 6 mg (proteína) de Nobex-IN105 sobre un pedazo de papel pesado y se mezclan a fondo. Transferir la mezcla a la prensa y comprimir a aproximadamente 350 psi para formar una tableta.

Forma de dosificación sólida (Tabletas) Formulación Nobex-IN105-[862] 150 mg de caprato por Tableta

Componente	mg por Tableta
Caprato de sodio	150
Manitol	150
Explotab (Croscarmelosa de sodio)	25
Nobex-IN105 (proteína)	6

La prueba de disolución se llevó a cabo mediante el uso de una unidad de disolución del aparato USP 2. El medio era agua, velocidad de la paleta 50 rpm, y el volumen del medio fue 500 mL. Las muestras de disolución se analizaron por HPLC mediante el uso de un sistema gradiente. Las fases móviles fueron agua con 0.1% TFA (fase móvil A) y acetonitrilo con 0.1% TFA (fase móvil B). El gradiente utilizado fue: 0 minutos 100% fase móvil A, 11 minutos 65% fase móvil A, 15 minutos 20% fase móvil A, 16 minutos 20% fase móvil A, 17 minutos 100% fase móvil A. La longitud de onda fue 214 nm y la columna fue una C18 (150 x 2 mm). Las siguientes tablas y gráficos resumen los datos de disolución obtenidos para la prueba de disolución de la formulación de tabletas Nobex-Zn-IN105 que contienen 6 mg Zn-IN105 (proteína), 150 mg de manitol, 150 mg de caprato de sodio, y 25 mg de croscarmelosa de sodio (Explotab):

Resumen de datos para el perfil de disolución de tabletas Nobex-Zn-IN105 [862], % IN105 disuelto

Sample Time (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	76	41	59
10	93	87	90
15	95	99	97
30	96	98	97
45	97	98	98
60	98	97	98

Resumen de datos para el perfil de disolución de tabletas Nobex-Zn-IN105 [862], % caprato disuelto

Sample (minutos)	Time	Recipiente 1 (%)	Recipiente 2 (%)	Promedio (%)
5		84	51	68
10		98	88	93
15		98	97	98
30		98	98	98
45		98	98	98
60		98	98	98

13 Ejemplos y experimentos *in vitro* de resistencia a enzimas

Los conjugados de compuestos de insulina (HIM2) se proporcionaron en 10 mM de amortiguador de fosfato sódico (a pH de aproximadamente 7.4) y sus concentraciones se determinaron por HPLC (las soluciones se diluyen con amortiguador de manera que puedan realizarse comparaciones equimolares entre parentales y conjugados ~0.6 mg/mL). La enzima quimotripsina liofilizada se resuspendió en HCl 1 mM a una concentración de 7.53 U/mL. Una alícuota de 1.53 mL de cada muestra se añadió a tubos de muestra y 0.850 mL en tubos de control. Las muestras se probaron por duplicado junto con cuatro tubos de control por muestra. Las alícuotas se incubaron a 37°C en un termomezclador por 15 minutos. Después 17 µL de enzima quimotripsina se añadió a cada tubo de muestra. Cinco µL de HCl 1 mM se añadió a cada tubo de control. Inmediatamente después de las adiciones, se eliminaron 200 µL de la muestra y los tubos de control y se colocaron en 50 µL de TFA al 1% previamente en alícuotas en los tubos de centrifuga. Esta muestra sirve como T=0.

El procedimiento de muestreo para insulina (libre de Zn), HIM2 (libre de Zn) e insulina (compuesto de insulina regular) se repitió en los siguientes intervalos: 0, 2, 5, 8, 12, 15, y 30 minutos. El procedimiento de control se repitió en los siguientes intervalos: 0, 8, 15, 30 minutos. Para las muestras de tipo T y tipo R, el procedimiento se repitió en los siguientes intervalos: 0, 5, 8, 12, 30, 40 y 60 minutos. El procedimiento de control para los complejos de Zn se repitió en los siguientes intervalos: 0, 12, 40 y 60 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el análisis que puede ocurrir a través de HPLC. HPLC se llevó a cabo para determinar el porcentaje degradación relativo a la T= 0 minuto respectiva para cada digestión. El logaritmo natural del porcentaje restante se graficó contra el tiempo y se ejecutó una regresión lineal para cada digestión. La media vida se calculó mediante el uso de la ecuación: $t_{1/2} = -0.693/\text{pendiente}$.

Resultados a 0.6 mg/ml proteína

Muestra	T media	Contenido de Zinc	Contenido de fenol
Insulina (libre de zinc)	7-9 mins	--	--
HIM2 (libre de zinc)	12-15 mins	--	--
Insulina, USP (compuesto de insulina regular)	26-29 mins	0.3 a 1% p/p	--
HIM2 (complejo de zinc tipo R)	51-78 mins	1.1% p/p	0.1 a 0.25% p/p
HIM2 (complejo de zinc tipo T)	51 min	0.55 % p/p	--
HIM2 (complejo zinc/protamina tipo R)	95-120 mins	2.0 a 2.1% p/p	5.3 a 6.2% p/p
DICON-1 (complejo de zinc tipo R)	24-26 mins	ND	ND

Resultados a 0.3 mg/mL proteína

	T media	Contenido de Zinc	Contenido de fenol
5	Insulina (libre de zinc)	4-5 mins	--
	HIM2 (libre de zinc)	7-9 mins	--
10	Insulina, USP (compuesto de insulina regular)	7-8 mins	0.4 a 1% p/p
	HIM2 (complejo de zinc tipo R)	19-21 mins	1.1% p/p
15	HIM2 (complejo de zinc tipo T)	12-15 mins	0.55 % p/p

14 Ejemplos y Experimentos In vivo

20 14.1 Ensayo extendido de glucosa en sangre en ratón (MBGA)

Seis grupos de dosis pareadas 5 ratones CF-1macho (Charles River Laboratories; 25-30 g) recibieron inyecciones subcutáneas del conjugado de compuesto de insulina (artículo de prueba) o ser insulina humana recombinante. El artículo de prueba se reconstituyó con amortiguador de fosfato (0.01M, a pH de aproximadamente 7.4) que contiene 0.1% p/p de albúmina sérica bovina y se dosificó a 100, 66.6, 43.3, 30, 20, y 13.3 µg/kg. La insulina se reconstituyó con amortiguador de fosfato (0.01 M, a pH of aproximadamente 7.4) que contiene 0.1% p/p albúmina sérica bovina y se dosificó a, 33.3, 21.7, 15, 10, y 6.7 µg/kg. Después de recibir una dosis subcutánea en el cavidad formada por el muslo y la ingle, los animales fueron devueltos a sus jaulas por 30 minutos a temperatura ambiente y después fueron anestesiados rápidamente y sangrados terminalmente. Las muestras de sangre se recogieron en tubos de heparina para ensayo de glucosa. Si el ensayo de glucosa se retrasaba, los tubos se almacenaron en agua con hielo y se recalentaron a temperatura ambiente antes del ensayo.

La glucosa en plasma se midió con un glucómetro (por ejemplo, One Touch® Basic; Lifescan), que se calibró al comienzo de cada día de uso de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La potencia del conjugado del compuesto de insulina se calculó después con relación a la curva estándar que se generó para la respuesta insulina humana recombinante. Los cálculos se basaron en el supuesto de que la insulina humana recombinante tiene una potencia de 27.4 IU/mg.

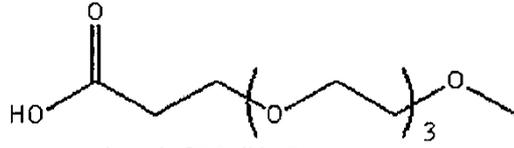
Los resultados se muestran en las **Figuras 16-20**. **La Figura 16** muestra los perfiles de la biopotencia de MBGA para HIM2. **La Figura 17** muestra los perfiles de la biopotencia de MBGA para el producto del compuesto de insulina Zn-HIM2 tipo R. **La Figura 18** muestra los perfiles de la biopotencia de MBGA para el producto del compuesto de insulina Zn-HIM2 tipo T. **La Figura 19** muestra los perfiles de la biopotencia de MBGA para el producto del compuesto de insulina Zn-HIM2 con protamina. **La Figura 20** muestra efecto reductor de glucosa del complejo de protamina tipo R a 30 y 90 minutos post-dosis. Estos resultados muestran que la biopotencia de HIM2 no se reduce significativamente por complejación con Zn⁺⁺. El complejo de protamina tipo R (Ver **Figura 17 [7]**) shows greater glucose reduction at 30 minutos than 90 minutos.

Adicionalmente, **las Figuras 21-24** muestran los perfiles de la biopotencia de MBGA para IN-186, IN-192, IN-190, IN-191, IN-189, IN-178, IN-193, IN-194, IN-185, IN-196 e IN-197 con las estructuras como sigue:

monoconjugado B1, IN-186:

5

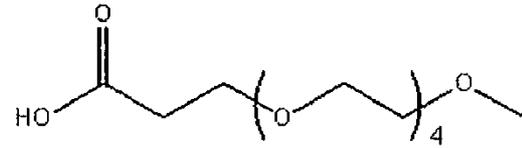
10



monoconjugado B29, IN-194:

15

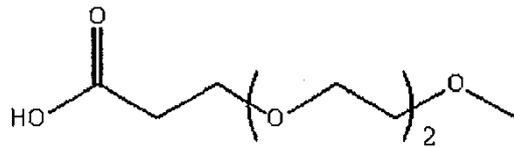
20



monoconjugado B29, IN-197:

25

30



monoconjugado B29, IN-178:

35

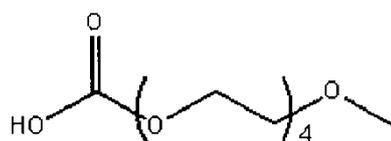
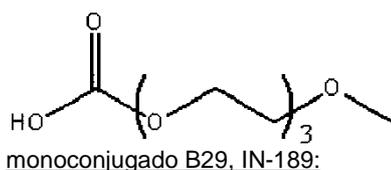
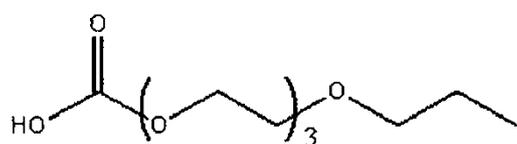
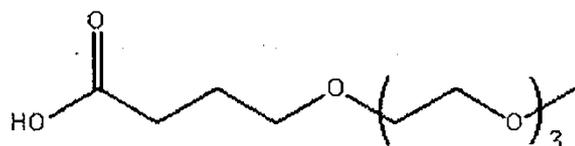
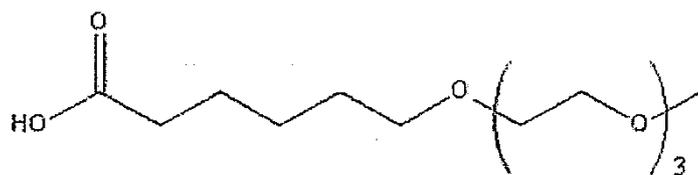
40

45

50

55

60



14.2 Estudios de pinzamiento en perros

14.2.1 Estudios de HIM2 iniciales

Perros (n=3 o 6) se prepararon quirúrgicamente (anestesia de isoflurano) mediante la colocación de un catéter en una arteria femoral. A los animales se les permitió recuperarse por 16-17 días después de lo cual se mantuvieron en ayunas durante la noche y estudiados en el estado consciente. Después de un periodo de equilibrio de 60 min, hubo un período de control de 20 min después de lo cual el fármaco se administra por vía oral. El compuesto de insulina Zn⁺⁺-HIM2 tipo R se probó en solución amortiguadora. Además, los complejos de tipo R y de tipo NPH se ensayaron en formulación líquida oral que contiene caprato ácido y laurato ácido.

Las 3 muestras de prueba se probaron en un solo nivel de dosis (los niveles de dosis se identificaron sobre la base de los resultados experimentales anteriores). El nivel de glucosa en plasma se fijó después en un valor euglicémico por infusión de D-20 a través de la vena de la pata por 4 h. muestras de sangre (4 ml) se tomaron a -20, 0, 5, 10, 20, 30, 45, 90, 120, 180 y 240 min para la medición de glucosa, compuesto de insulina y C-péptido. Las muestras de sangre de las

arterias se obtuvieron según se requirió para fijar el nivel de glucosa en plasma. Un total de 72 ml de sangre se tomó en cada experimento.

5 Se realizaron las siguientes mediciones: tasa de infusión de glucosa, concentración del compuesto de insulina, concentración de C-péptido, y niveles de C-péptido en plasma (para permitir un estimado de la liberación del compuesto de insulina endógeno). La tasa de infusión de glucosa requerida para mantener euglicemia proporciona un índice de acción del compuesto de insulina.

10 Tras el experimento, el extremo libre del catéter fue enterrado por vía subcutánea y a los perros se les permitió recuperarse por dos semanas antes del otro estudio en el cual se usó un artículo de prueba diferente. Los animales fueron aleatorizados a la dosis y se usó un total de 3 veces. El número total de perros fue 6.

Las Figuras 25 y 26 muestran los resultados.

15 14.2.2 Estudios IN105 iniciales

Es estudio se condujo en seis (6) perros mestizos conscientes ayunados durante la noche que habían sido alimentados con una dieta de 34% de proteína, 46% de carbohidrato, 14.5% de grasa y 5.5% de fibra basado en el peso seco. Cada animal tuvo un catéter de Silastic insertado en la arteria femoral como se describe en otra parte (1) aproximadamente tres semanas antes del experimento. El día del experimento, el catéter se eliminó de su cavidad subcutánea con anestesia local. Artículo de prueba: Nobex-IN105 (Lot.# KJ-173-095 & KJ-173-116) se proporcionó en la formulación oral de ácido graso (Nobex-IN-[753]-040422) a una concentración de 1.0 mg/ml. Cada perro recibió 0.25 mg/kg oral de dosis de Nobex-IN105 (1.0 mg/ml@0.25 ml/kg volumen de dosificación). Nobex-IN105 se administró a t=0 y glucosa (D-20) se infundió a través de la vena cefálica para mantener la euglicemia. Se extrajeron muestras de sangre de la arteria para la medición de insulina y glucosa como se describió previamente (1). Después que el experimento se completó, el catéter de la arteria fue enterrado por vía subcutánea como lo fue durante la cirugía inicial.

30 Durante el experimento, un perro vomitó inmediatamente después de la dosificación y sólo se administró una porción de la dosis. Por lo tanto, los resultados de este experimento se reportaron con y sin los datos obtenidos a partir de de este perro.

35 Los niveles de insulina plasmática en la arteria se elevaron en los seis perros, incluyendo el atípico (Oral-2i), después de la administración oral de Nobex-IN105. Insulina arterial promedio se elevó de $6.0 \pm 1.4 \mu\text{U/ml}$ ($6.3 \pm 1.7 \mu\text{U/ml}$, n=5) hasta un máximo de $109.4 \pm 31.4 \mu\text{U/ml}$ ($127.8 \pm 30.1 \mu\text{U/ml}$, n=5) a 10 min post-administración y después cayó de modo que para 150 min todos los perros retornaron a los niveles de insulina de línea base (**Figuras 27 y 28**).

40 La euglicemia se mantuvo por infusión de glucosa. La tasa de infusión de glucosa requerida para mantener la euglicemia como la mayor en los animales con mayor aumento de insulina arterial (**Figuras 27 y 28**). El área bajo la curva de la tasa de infusión de glucosa promedio (AUC₀₋₂₄₀) fue $578.5 \pm 144.5 \text{ mg/kg/min}$ ($669.4 \pm 137.7 \text{ mg/kg/min}$, n=5).

40 14.2.3 Formulaciones sólidas

45 Los estudios de tamizaje de la formulación mediante el uso del modelo de fijación de glucosa se condujeron en perros mestizos conscientes en ayunas durante la noche que se habían alimentado con una dieta de 34% de proteína, 46% de carbohidrato, 14.5% de grasa y 5.5% de fibra, basado en el peso seco. Cada animal tuvo un catéter de Silastic insertado en la arteria femoral como se describe en otra parte (referencia 1) aproximadamente tres semanas antes del experimento. El día del experimento, el catéter se eliminó de su cavidad subcutánea con anestesia local. El artículo de prueba contenía 1.0mg/mL de Zn IN105 en diferentes formulaciones líquidas o 5-6mg de IN105 por cápsula o tableta. Cada perro en cada experimento recibió una dosis líquida oral de aproximadamente 0.25 mg/kg o una cápsula o 50 tabletas que contiene 5 o 6mg de IN105 dos veces sucesivas, la primera a t = 0 y la segunda a t = 120 minutos. La glucosa (D-20) se infundió a través de la vena cefálica para mantener la euglicemia. En algunos casos el tiempo de estudio se extendió después de la dosificación donde el efecto duró más allá de 120 minutos. Se extrajeron muestras de sangre arteriales para la medición de la insulina, la glucosa y péptido-C como se ha descrito previamente (referencia 1). Después que el experimento se completó, el catéter de la arteria se reemplazó en el tejido subcutáneo.

60 Las formulaciones, tanto la solución y las formas de dosificación sólidas, se prepararon con diferentes niveles de ácidos grasos, amortiguadores, diluyentes y desintegrantes. Para minimizar las variables, las formulaciones líquidas y sólidas contenían niveles consistentes de IN105 y cada uno de los excipientes (cáprico, láurico, caprílico, mirístico, linoléico), variando solamente las cantidades relativas de contenido de ácido graso, amortiguador, diluyentes (manitol o celulosa microcristalina), y/o desintegrante (Explotab). Los datos de la tasa de infusión de glucosa y absorción de IN105 (inmuno-reactividad de insulina en plasma) se evaluaron y compararon con cada formulación dosificada.

5 Inicialmente, los experimentos se llevaron a cabo para simplificar y perfeccionar la formulación líquida optimizada (referencia 2) a una formulación líquida que se convertiría más fácilmente a una forma de dosificación sólida. Esto se llevó a cabo mediante la sustitución del ácido graso libre con la sal de sodio correspondiente (por ejemplo, ácido cáprico reemplazado con caprato de sodio) así como también la eliminación de los componentes amortiguadores (ácido cítrico, trolamina, trometamina, hidróxido sódico) que se consideraban ya no eran necesarios. Adicionalmente, el efecto de otros ácidos grasos tales como ácidos linoléico, caprílico and mirístico y el aminoácido, arginina, se examinaron para sus efectos en la absorción de IN105.

10 Después de una primera serie de tamices prototipo usando uno a dos perros por experimento se seleccionaron algunas formulaciones prototipo y se probaron en perros adicionales para determinar mejor la variabilidad y la consistencia entre las formulaciones y animales individuales.

15 Un método de disolución se desarrolló y los estudios de disolución se llevaron a cabo en una variedad de formulaciones candidato para evaluar los perfiles de disolución de IN105 y los contenidos de ácidos grasos.

Resultados

20 En los **experimentos iniciales**, los perros dosificados con IN105 en 3% p/v de sal sódica de ácido cáprico en una amortiguador de fosfato sin excipientes adicionales, mostraron (**Figuras 29-30**) una respuesta similar comparada con la formulación líquida optimizada que contiene 3% p/v de ácido cáprico en amortiguador de trolamina/ácido cítrico/trometamina/hidróxido sódico. Esto demostró que la sal sódica de la forma de ácido graso se comporta de forma comparable a la forma de ácido y que los componentes del amortiguador adicionales no contribuyen a la formulación.

25 En estudios separados que evalúan los ácidos grasos alternativos la sustitución de 3% de caprato con 3% de ácido caprílico o 3% de ácido linoleico, ninguna de las alternativas exhibió efectos significativos. El uso de ácido caprílico resultó en la necesidad de niveles de bajo a moderado de glucosa mientras que el uso de ácido linoleico no dio lugar a requerir ninguna infusión de glucosa lo que sugiere falta de efecto. Ambas formulaciones mostraron niveles relativamente bajos de insulina arterial. Una formulación líquida que contiene arginina relativamente no mostró beneficio en los niveles de GIR o IN105.

30 En los **estudios primarios**, las formulaciones sólidas se evaluaron como mezcla de polvo rellena en cápsulas de gelatina dura y tabletas comprimida a mano mediante el uso de una prensa Carver. Las cápsulas de mezcla de polvo 6mg de IN105 (equivalente de insulina, 0.25mg/Kg) con 57mg de caprato / 57 mg de laurato no mostró efectos significativo en la primera dosificación hasta 120mins, y en la segunda dosificación un efecto significativo se observó con GIR concurrente con la absorción de IN105 donde los niveles estuvieron muy por encima de la forma de línea base de 0 a 120 mins. Estos datos sugieren una respuesta variable pero con retraso potencial en IN105 en la forma de dosificación en cápsula. La disolución sólo se retrasó ligeramente con la cápsula con respecto a las tabletas aunque puede haber poca o ninguna correlación in vitro/in vivo.

40 En los estudios de cribado de la tableta prototipo inicial, las tabletas que contienen 6mg de IN105 y 150mg de manitol, 30mg de glicolato sódico de almidón con 143mg de caprato con o sin 143 mg de laurato mostraron una absorción significativa mayor de GIR e IN105 que las mismas tabletas con 54mg de caprato o/ y 54mg de laurato (**Figuras 31, 32, y 33**). Esto sugiere una respuesta a la dosis razonable de niveles más altos de GIR e IN105 en relación con el aumento de los niveles de caprato y laurato. Las tablas mostraron un tiempo de respuesta a GIR temprano y consistente para las cápsulas de IN105 llenas. Adicionalmente, las tabletas de IN105 mostraron un aumento en plasma arterial de insulina en todos los perros dosificados.

50 En una serie de **estudios finales**, tres formulaciones de tableta protoipo (formulación [856] contenía 143 mg de caprato y 140 mg de laurato, [860] contenía 286 mg de caprato, y [862] contenía 150 mg de caprato) se seleccionaron para la evaluación en 5 perros (3 perros diferentes para cada formulación) para evaluar la consistencia de desempeño (**Figuras 34-37**). Los niveles de insulina plasmática de la arteria se elevaron en los 3 perros y a todas las 18 dosis (3 perros X 3 tabletas X 2 dosis cada uno) con la respuesta GIR correspondiente seguido de la administración oral de 6mg (insulina equivalente) de IN105 formulada en tabletas que contienen 150mg o 280 mg de caprato o 143mg/140mg de caprato/laurato (**Figuras 31-32 y 38-42**). Los niveles de péptido C (ng/ml), con tabletas de caprato de 150mg y 280mg, promedio (n=2), mostraron una disminución desde un nivel inicial de 0.30 ± 0.05 a 0.22 ± 0.02 durante la primera dosificación y 0.1 ± 0.05 a 0.02 ± 0.0 en la segunda dosificación, y con tabletas de caprato/laurato 140mg/140mg, mostraron 0.21 ± 0.05 a 0.05 ± 0.02 durante la primera dosificación y 0.18 ± 0.05 a 0.18 ± 0.01 . Esto es indicativo de la supresión de la secreción del péptido C del páncreas como resultado de la insulina IN105 exógena.

60 Las tres formulaciones de tabletas prototipo de IN105 mostraron niveles consistentes de absorción de IN105 y tasa de infusión de glucosa resultante entre dosis y dentro de y entre los perros, incluyendo en distintos días

Durante los estudios finales, en los cuales se utilizaron conjuntos de 6 perros, un perro (perro #3) experimentó menos

respuesta con todas las dosificaciones líquidas y sólidas. Para representar con mayor precisión los resultados, los datos se presentan con y sin resultados del perro # 3. Los datos de los perros que no recibieron la dosis completa (mala alimentación forzada, vómitos, etc) o tenían insulina endógena se omitieron.

- 5 Estudio de disolución: Las muestras representativas de tabletas y cápsulas se sometieron a pruebas de disolución (descritas anteriormente).

Discusión

- 10 Estos estudios demostraron que la tableta prototipo IN105 que contenía sales sódicas caprato o caprato y laurato con manitol y el glicolato sódico de almidón desintegrante y que contiene 6mg IN105 (aproximadamente 0.25 mg/kg) administra por vía oral resultó en una elevación significativa y consistente de la insulina plasmática de la arteria que la infusión de glucosa requerida para preservar la euglicemia.

- 15 Estos comprimidos prototipos resultaron en niveles de IN105 y tasas de GIR al menos tan buenas y probablemente mejores que las formulaciones líquidas que contienen niveles comparables de caprato o laurato. Las forma de tabletas prototipo mantienen el perfil de absorción de la formulación líquida oral. La bio-eficacia oral relativa de las formulaciones de tableta prototipo seleccionadas (por ejemplo, tabletas que contienen 280mg y 150mg de caprato, n=6, AUC para GIR= 496±117 y 500±275) parece tener mejores formulaciones líquidas (por ejemplo, 3% p/v de formulación líquida de ácido cáprico, n=5, AUC para GIR =182±92 y 198 ±119).

- 25 Los datos sugieren que las tabletas que contienen caprato de sodio como el único ácido graso junto con manitol y el desintegrante, glicolato sódico de almidón serían útiles en el desarrollo posterior de las formas de dosificación sólidas para usar en estudios clínicos. Los datos sugieren además que los niveles de insulina después de la administración oral de IN105 en las formas de tabletas de caprato prototipo seleccionadas (caprato de sodio a 150mg o 286mg) alcanzaron su pico de forma constante con una T_{máx} típica en post-dosis alrededor de 20 minutos y una C_{máx} de aproximadamente 59.0 ± 20.1 y 62.9. ± 25,4 μUnidades / ml, en ambas dosis. Los niveles de insulina en plasma permanecieron elevados cerca del nivel C_{máx} durante 10-15 minutos y por encima de los niveles basales a lo largo de 120 min después de cada dosis. El GIR requerido para mantener la euglicemia usando estas tabletas alcanzó una T_{máx} en o alrededor de 30 a 40 min en ambas dosis y GIR C_{máx} alcanzó un promedio de 8,4 ± 1,99 y 7,41 ± 2,18 mg / kg / min. Las formas de dosificación de las tabletas requirió un GIR C_{máx} superior (7.4-8.4 vs. 4.5-5.4) y requirió una infusión de glucosa por una duración más larga (100-120 mins vs. 60-90min) para mantener la euglicemia y entonces la formulación líquida optimizada.

- 35 En comparación con los niveles de insulina plasmática de la arteria de SQ historico e insulina inhalada, parece que estas tabletas prototipo proporcionan niveles de insulina máximos similares a SQ y el suministro inhalado y asemeja un perfil de insulina comparable con el de la insulina inhalada (**Figuras 34-37**).

- 40 Los experimentos de tableta prototipo sugieren que las tabletas prototipo seleccionadas son adecuadas como formulaciones de dosificación sólidas para la evaluación posterior de IN105 con desarrollo futuro para enfocar en la producción de una formulación clínica que puede producirse mediante el uso de una prensa para tabletas.

- 45 *Esta descripción se divide en secciones con temas para facilitar la consulta. Los encabezamientos de las secciones y temas no pretenden limitar el alcance de la invención. Las modalidades descritas en la presente descripción tienen el propósito de ilustrar Iso distintos aspectos y atributos de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.*

REIVINDICACIONES

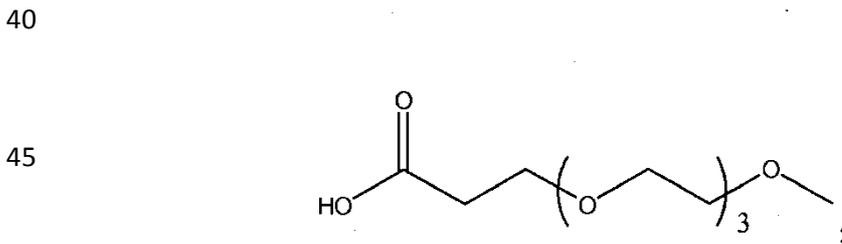
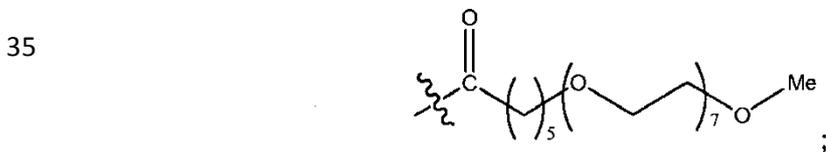
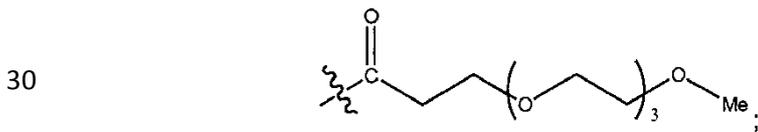
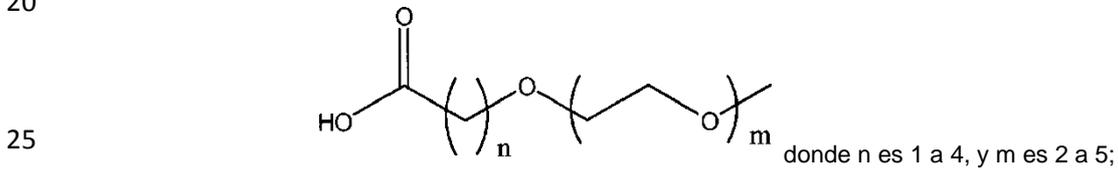
- 5 1. Un complejo que comprende:
un conjugado de insulina que comprende una insulina nativa conjugada a una porción modificadora, en donde la porción modificadora comprende desde 2 a 10 subunidades de polietilenglicol (OCH₂CH₂) que forman un componente PEG acoplado a un componente lipofílico, donde el componente lipofílico es un alquilo, en donde la porción modificadora se acopla a Lys^{B29} de ese modo proporciona un monoconjugado; y
10 un catión divalente seleccionado del grupo que consiste de Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Ca⁺⁺, Fe⁺⁺, Ni⁺⁺, Cu⁺⁺, Co⁺⁺ y Mg⁺⁺, en donde el conjugado de insulina forma un complejo con el catión divalente.
- 15 2. El complejo de la reivindicación 1 donde la porción modificadora se selecciona para producir el conjugado de insulina más hidrófilo o más anfifílico que una insulina no conjugada correspondiente.
- 20 3. El complejo de la reivindicación 1 donde la hidrofiliidad del conjugado de insulina disminuye por la adición de zinc.
- 25 4. El complejo de la reivindicación 3 donde:
la porción modificadora se selecciona para producir el conjugado de insulina igual o más soluble que una insulina no conjugada correspondiente; y
la solubilidad en agua del conjugado de insulina disminuye por la adición de zinc.
- 30 5. El complejo de la reivindicación 1 donde el conjugado de insulina tiene una lipofiliidad relativa de 1 o menos de 1 con relación a la insulina nativa correspondiente.
- 35 6. El complejo de la reivindicación 1 donde la solubilidad del complejo del conjugado catión-insulina a un pH de aproximadamente 7.4 es menor que, igual o mayor que la solubilidad del conjugado de insulina.
- 40 7. El complejo de la reivindicación 1 donde:
(a) la solubilidad del complejo del conjugado catión-insulina a un pH de aproximadamente 7.4 es sustancialmente menor que la solubilidad del conjugado de insulina en solución a un pH de aproximadamente 7.4, y
(b) el conjugado catión-insulina se mantiene soluble a más de aproximadamente 1 g/L en solución acuosa a través de un intervalo de pH de 5.8 a aproximadamente 8.5.
- 45 8. El complejo de la reivindicación 1 donde:
(a) el complejo es un complejo de Zn tipo R que comprende protamina; y
(b) a un pH de aproximadamente 7.4, la solubilidad acuosa del complejo es de aproximadamente 10 a aproximadamente 110 g/L, de aproximadamente 20 a aproximadamente 85 g/L, o de aproximadamente 30 a aproximadamente 70 g/L.
- 50 9. El complejo de la reivindicación 1 donde:
(a) el complejo es un un complejo de Zn tipo T que comprende protamina; y
(b) a un pH de aproximadamente 7.4, la solubilidad acuosa del complejo es de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 g/L, de aproximadamente 20 a aproximadamente 130 g/L, de aproximadamente 30 a aproximadamente 110 g/L, o de aproximadamente 35 a aproximadamente 60 g/L.
- 55 10. El complejo de la reivindicación 1 donde el conjugado de insulina produce cristales en solución acuosa a un pH que es igual al de pI más o menos 2.5.
- 60 11. El complejo de la reivindicación 1 donde el componente de catión divalente comprende Zn⁺⁺.

5 **12.** El complejo de la reivindicación 1 donde la relación molar del conjugado de insulina al componente de catión es entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:12, o aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:7.

10 **13.** El complejo de la reivindicación 1 donde la resistencia del conjugado de insulina que forma complejo a la degradación por quimotripsina es mayor que la degradación por quimotripsina del conjugado de compuesto de insulina correspondiente que no forma complejo.

15 **14.** El complejo de la reivindicación 1 donde la resistencia del conjugado de insulina que forma complejo a la degradación por quimotripsina es mayor que la degradación de quimotripsina de una insulina que forma complejo pero no conjugada correspondiente.

20 **15.** El complejo de la reivindicación 1 donde la porción modificadora que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:

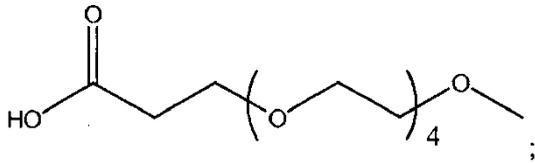


50

55

60

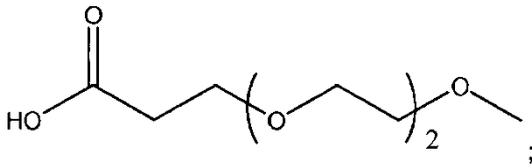
5



10

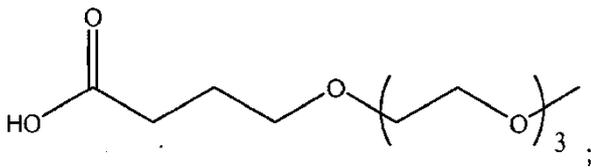
15

20



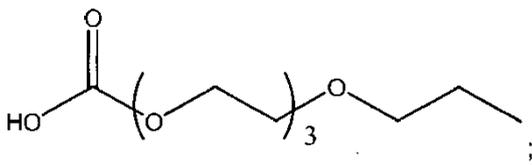
25

30



35

40

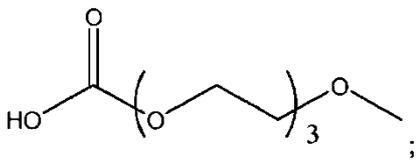


45

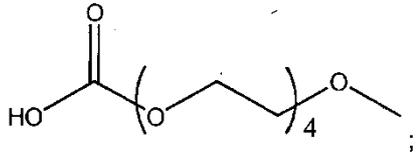
50

55

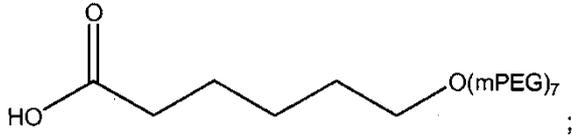
60



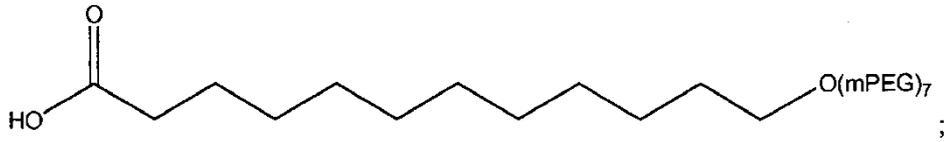
5



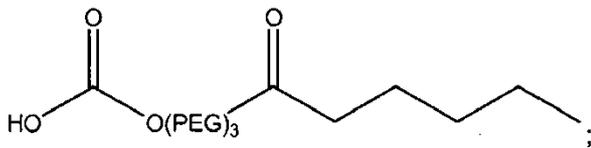
10



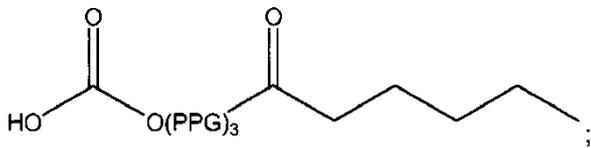
15



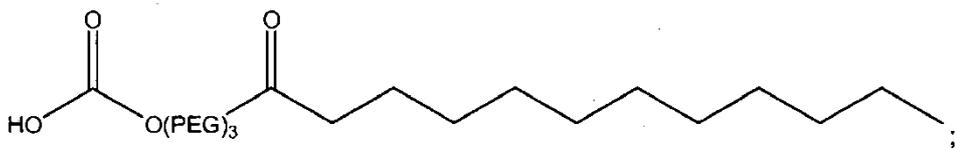
25



30

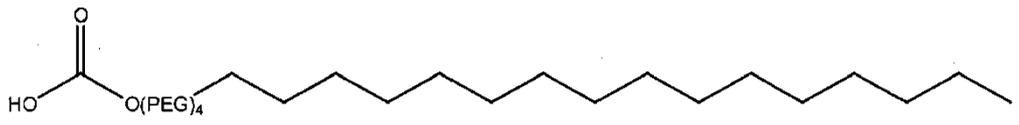


35



40

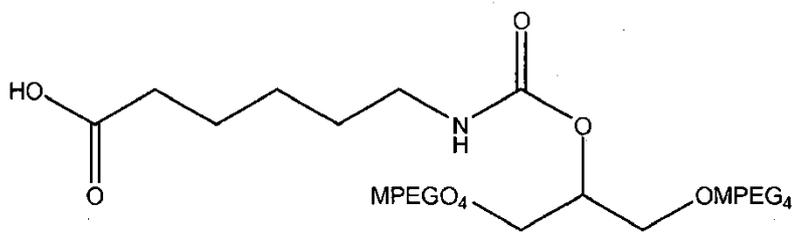
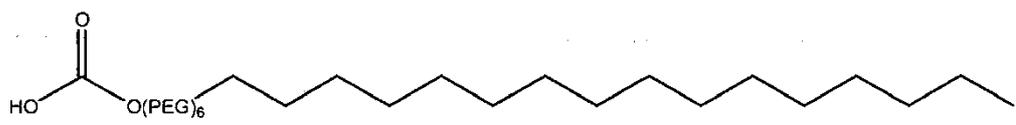
45



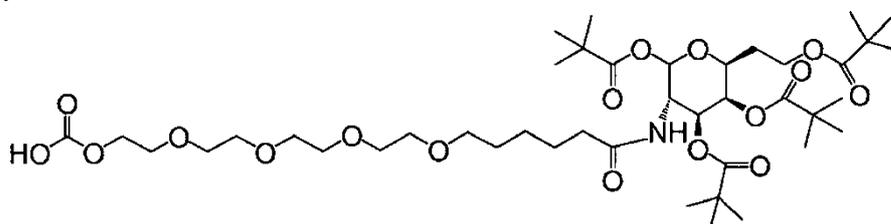
50

55

60



y



30

35

16. Una composición para el tratamiento de deficiencias de insulina en un humano que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los complejos de las reivindicaciones 1 a 15 y un portador farmacéuticamente aceptable.

17. La composición de la reivindicación 16, que además comprende un segundo componente que comprende un conjugado de insulina o un compuesto de insulina no conjugado.

18. La composición de la reivindicación 16 que comprende más de un complejo donde los conjugados de insulina de los complejos comprende diferentes compuestos de insulina o diferentes conjugados de insulina.

19. La composición de la reivindicación 18 en donde los diferentes conjugados de insulina tienen diferentes propiedades seleccionadas del grupo que consiste en diferentes solubilidades, diferente vida media en circulación, y diferentes porciones modificadoras.

20. La composición de la reivindicación 19 donde uno de los complejos tiene un perfil de acción rápido; y el otro de los complejos tiene un perfil de acción medio-a-prolongado.

21. La composición de la reivindicación 19 en donde uno de los complejos tiene un perfil adecuado para el control de insulina basal; y el otro de los complejos tiene un perfil adecuado para el control de glucosa post-prandial.

22. La composición de la reivindicación 17 donde la composición es un co-cristal de al menos dos componentes seleccionados del grupo que consiste en HIM2, insulina e IN105.

23. La composición de la reivindicación 17 donde la composición es un co-cristal que tiene un perfil PK/PD adecuado para el control de glucosa post-prandial o control de insulina basal durante la noche.

- 5 **24.** La composición de la reivindicación 17 que comprende una insulina no conjugada seleccionada del grupo que consiste en insulina human o compuesto de insulina lys-pro.
- 25.** La composición de la reivindicación 16 que además comprende un agente formador de complejos.
- 10 **26.** La composición de la reivindicación 25 donde el agente formador de complejos se selecciona del grupo que consiste en protaminas, surfen, proteínas globina, espermina, espermidina albúmina, aminoácidos, ácidos carboxílicos, compuestos poliméricos policatiónicos, polipéptidos catiónicos, polilisina, polipéptidos aniónicos, nucleótidos, y antisentido.
- 15 **27.** La composición de la reivindicación 16 sustancialmente desprovista de protamina.
- 20 **28.** La composición de la reivindicación 16 en forma de un polvo que comprende un conjugado catión-insulina sólido y uno o más componentes adicionales farmacéuticamente aceptables.
- 29.** La composición de la reivindicación 16 donde en un estado seco, el sólido comprende:
- 25 más que aproximadamente 71% p/p de conjugado de insulina, y
 de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 4% p/p Zn⁺⁺ y opcionalmente de aproximadamente 0.1 a
 aproximadamente 5% p/p de fenol.
- 30 **30.** La composición de la reivindicación 28, que comprende un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en fenol, m-cresol y parabén.
- 35 **31.** Los complejos o composiciones de las reivindicaciones 1 a 30 para usar en el tratamiento de la diabetes.
- 32.** Los complejos o composiciones de la reivindicación 31 que se fabrican para suministro por una ruta seleccionada del grupo que consiste en oral, ingestión oral, parenteral, bucal, sublingual, nasal, inhalación y transdérmica.

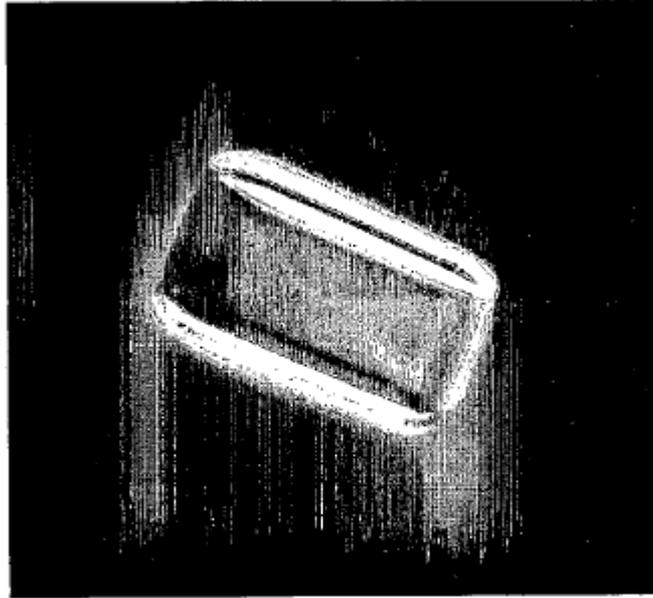


Figura 1

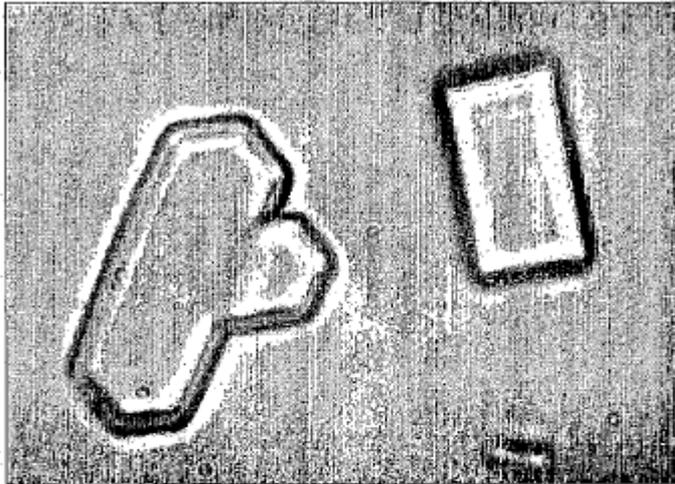


Figura 2

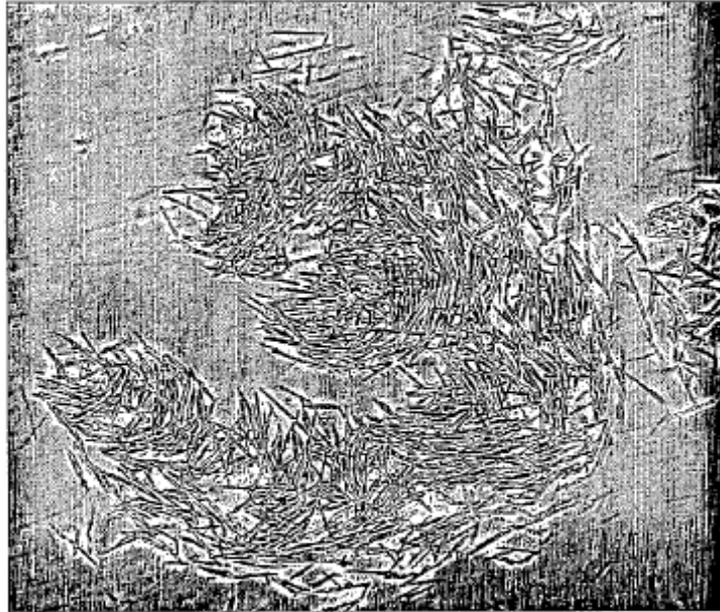


Figura 3

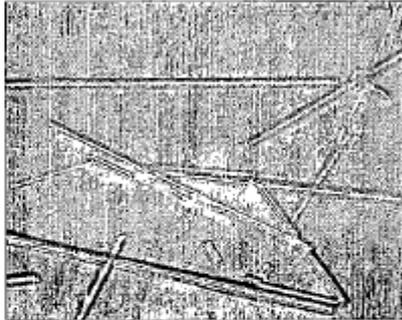


Figura 4

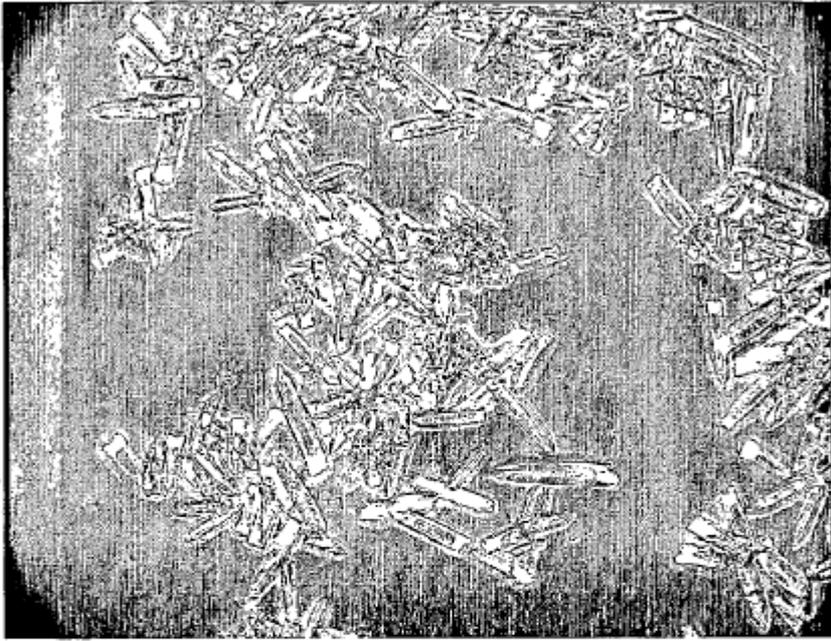


Figura 5

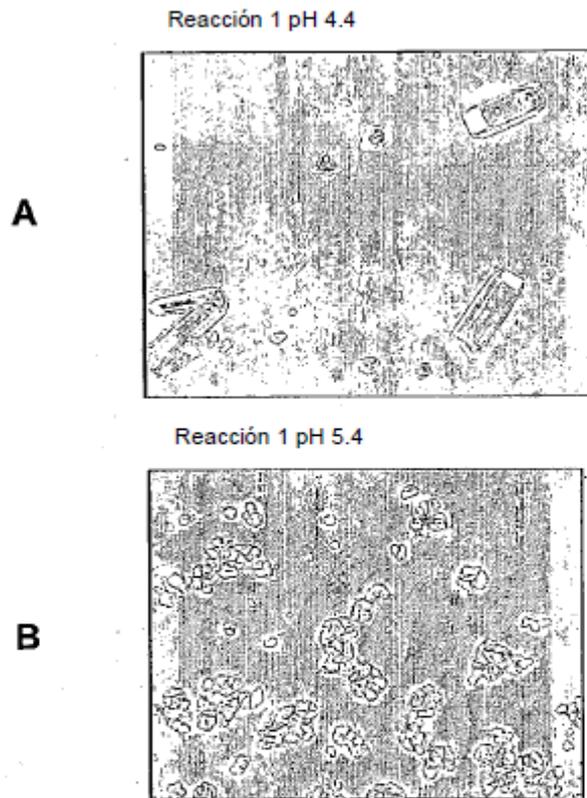


Figura 6

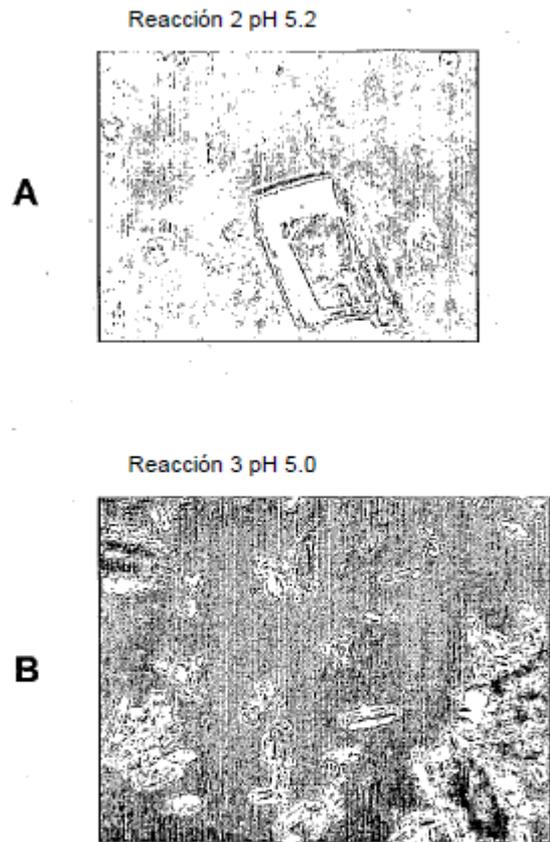
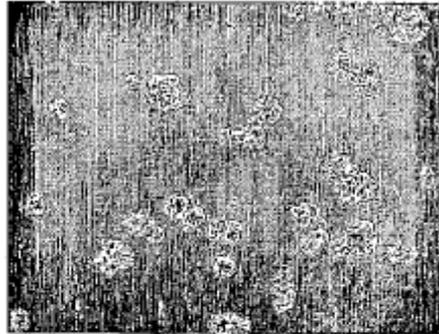


Figura 7

Reacción 4 pH 5.4

A



Reacción 5 pH 5.0

B



Figura 8

Reacción 6 pH 4.8

A



Reacción 8 pH 5.4

B

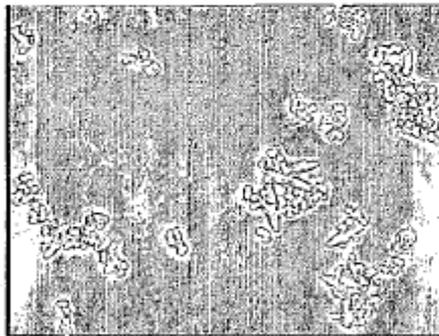


Figura 9

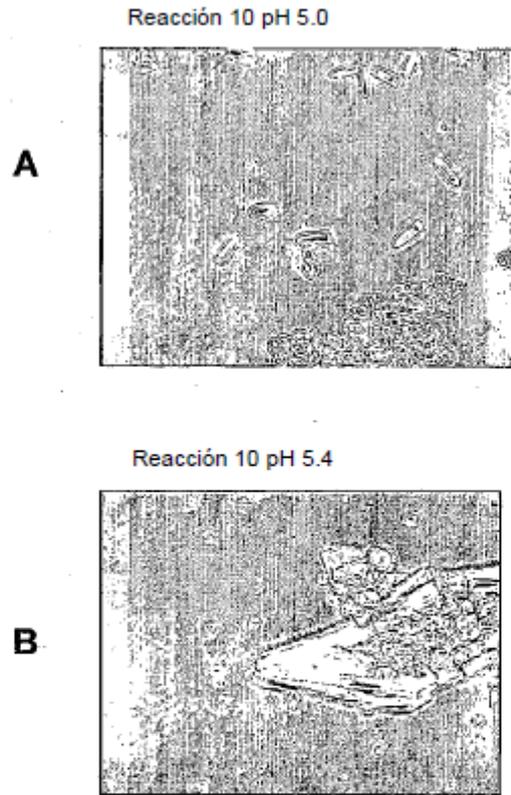


Figura 10

Reacción cc1B pH 5.0

A



Reacción cc1B pH 5.2

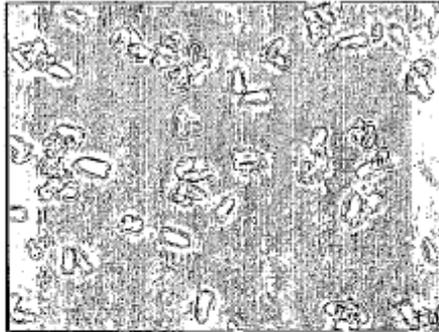
B



Figura 11

Reacción cc1B pH 5.6

A



Reacción cc2B pH 5.2

B

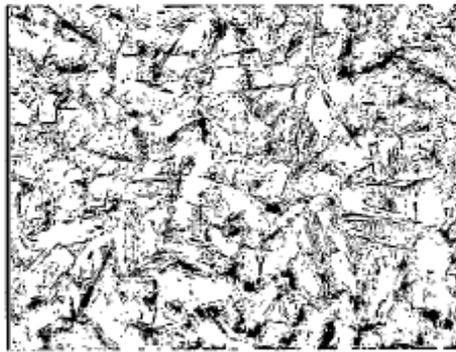


Figura 12

Reacción cc2B B pH 5.2

A



Reacción cc3B pH 5.6

B

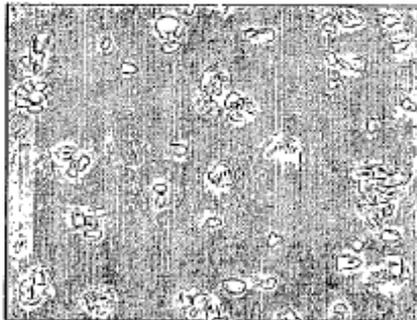


Figura 13

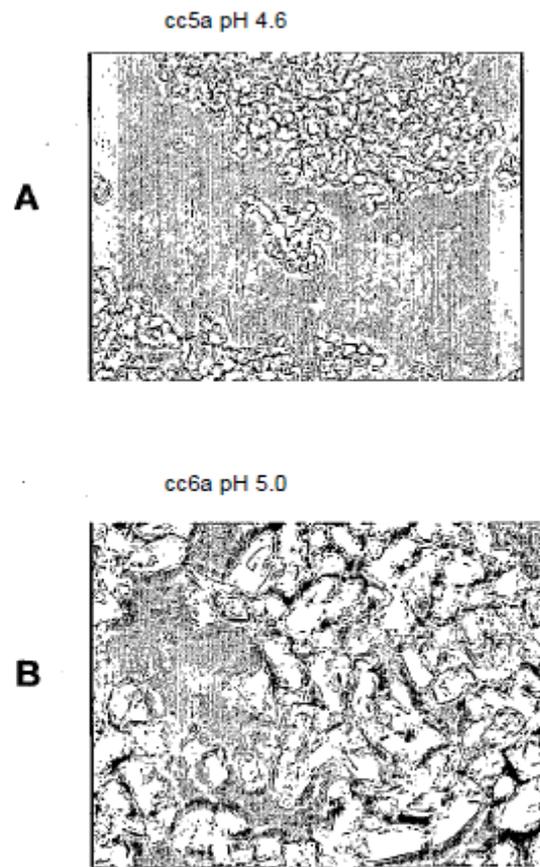


Figura 14

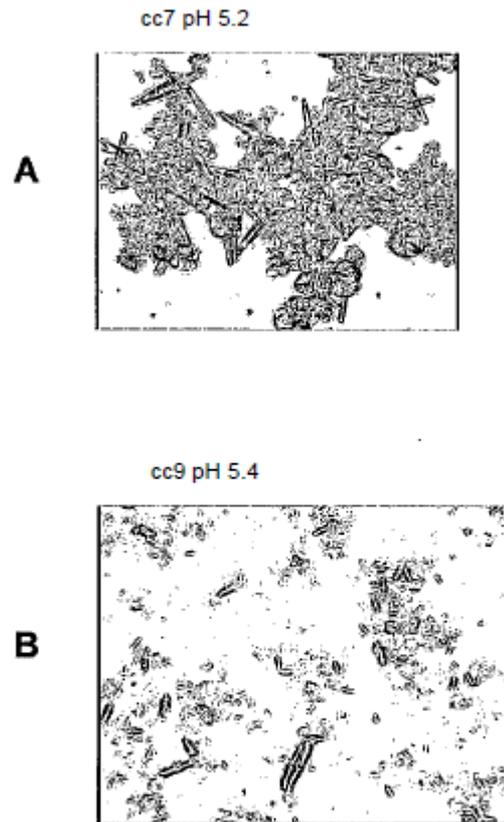


Figura 15

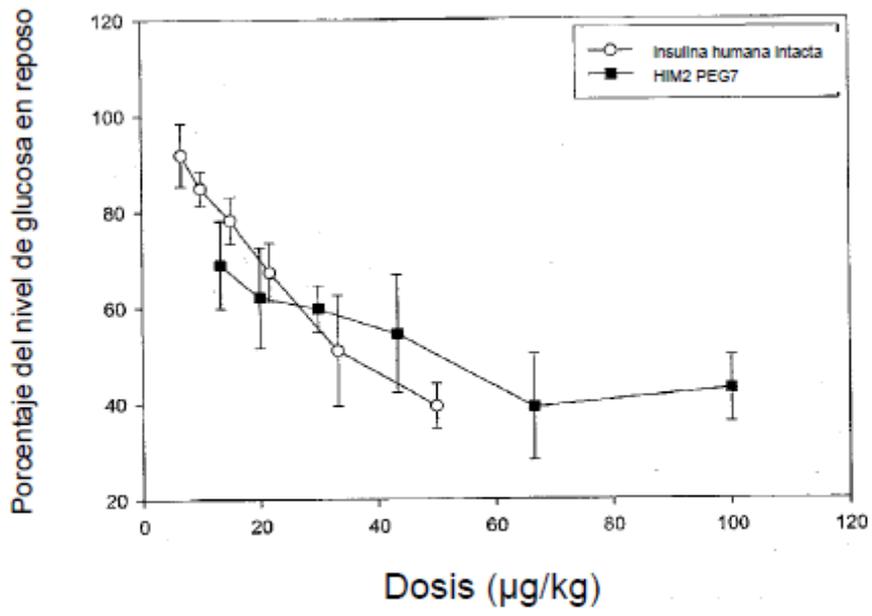


Figura 16

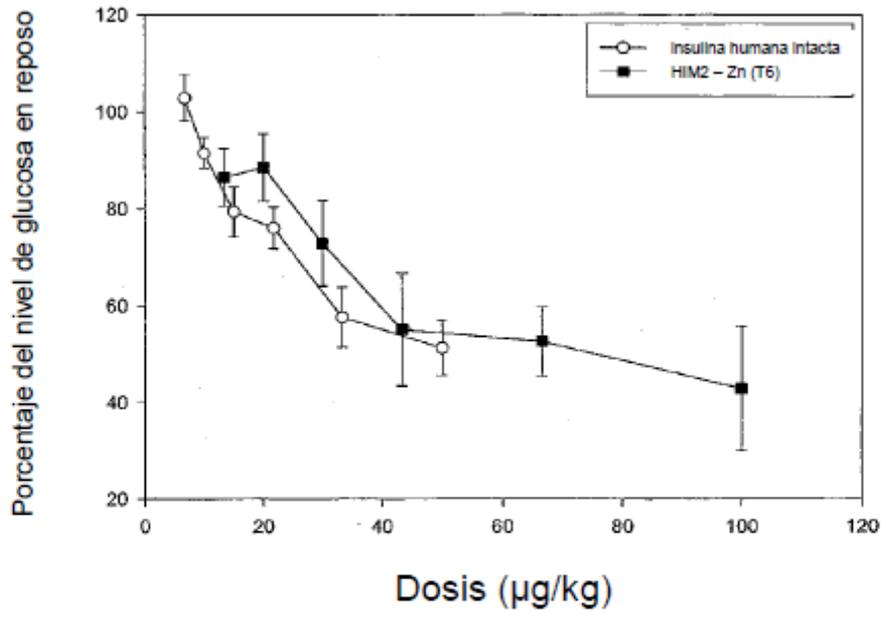


Figura 17

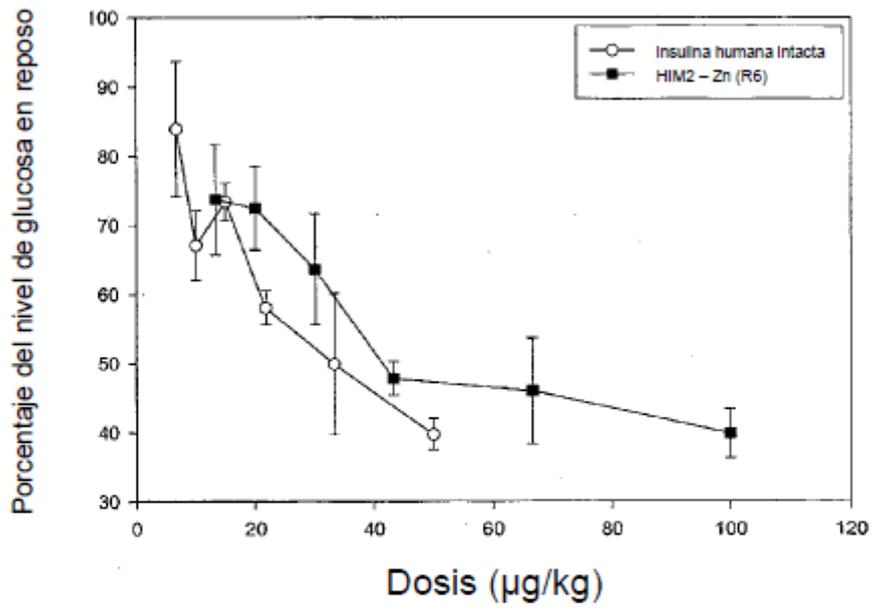


Figura 18

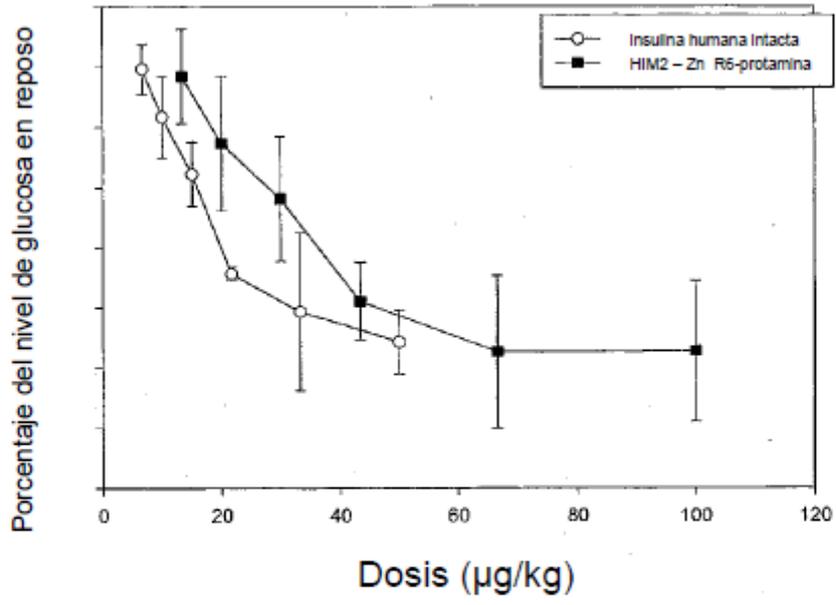


Figura 19

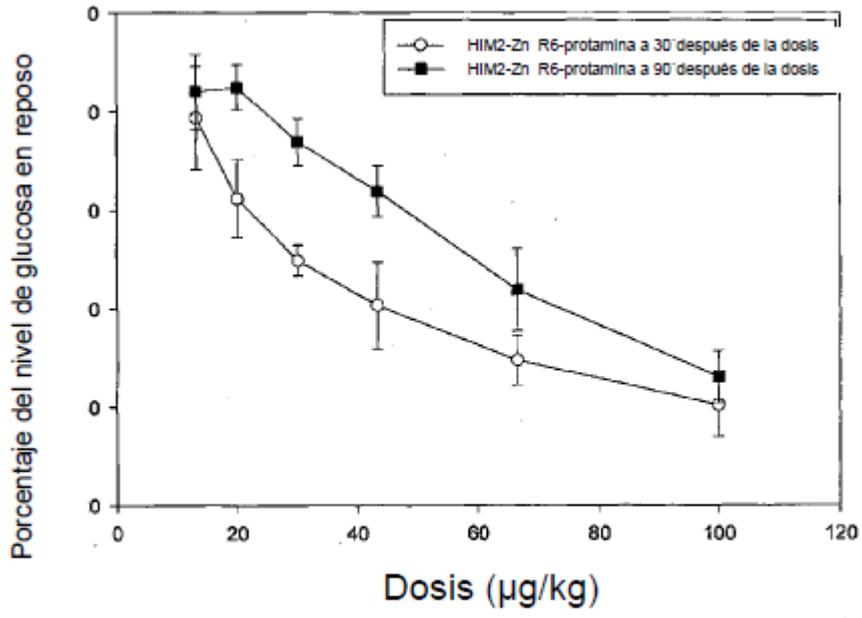


Figura 20

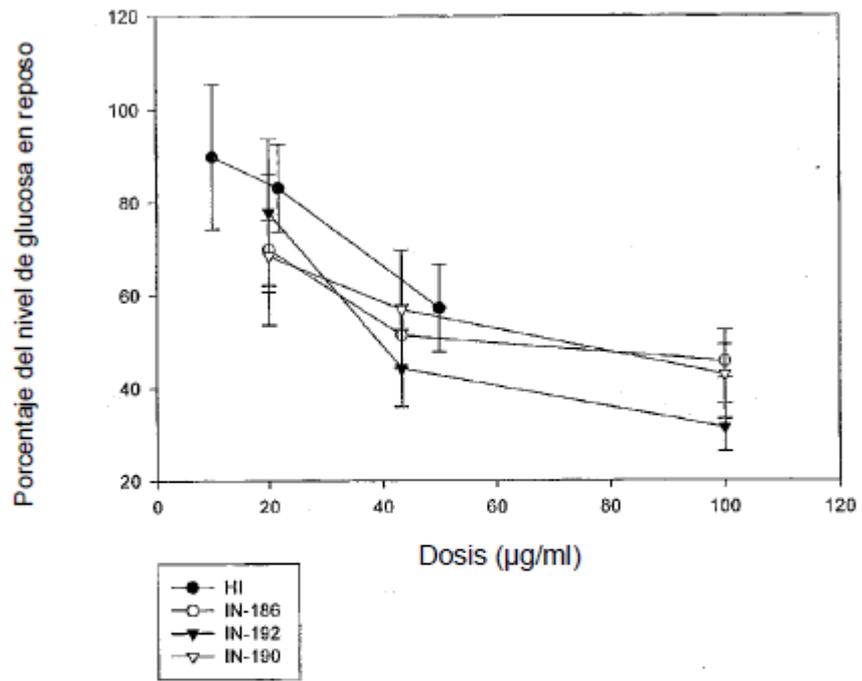


Figura 21

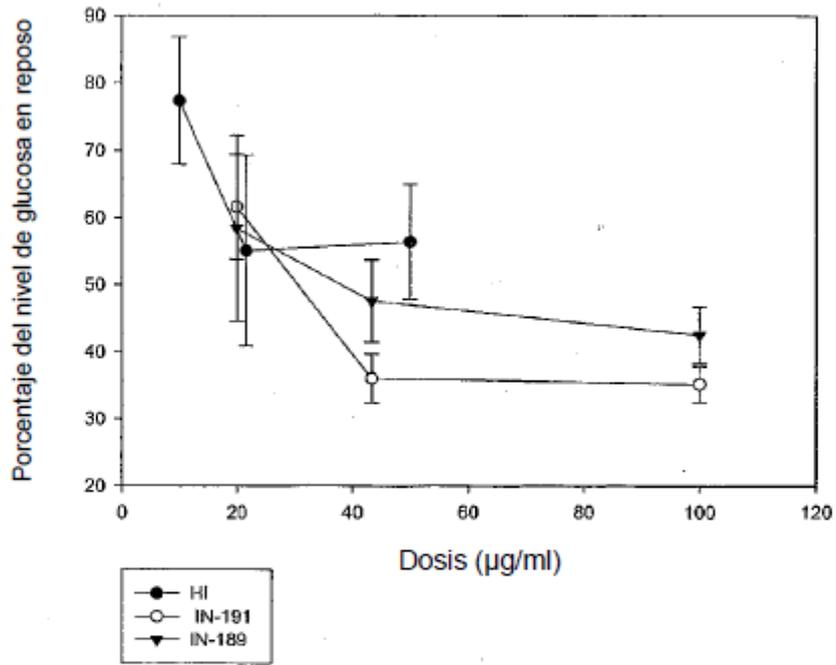


Figura 22

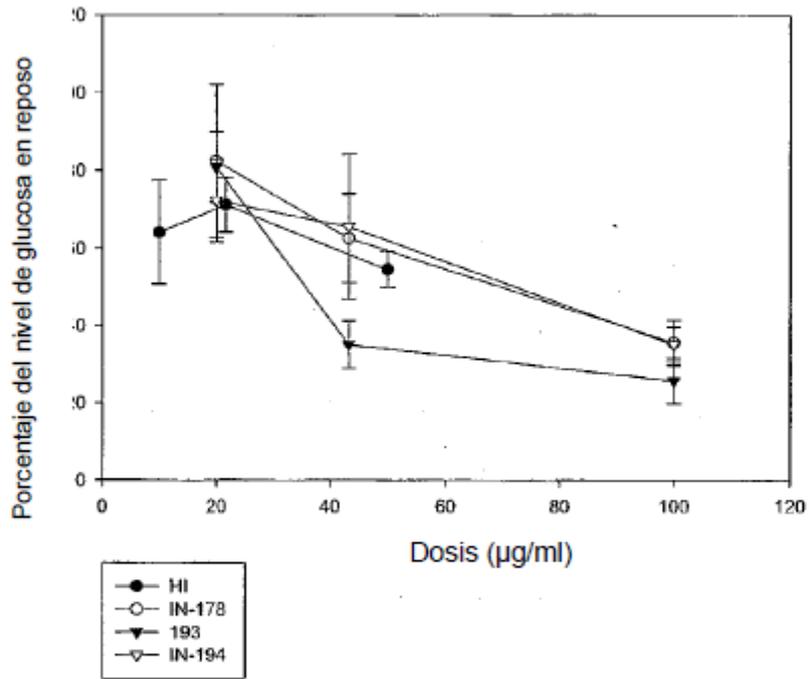


Figura 23

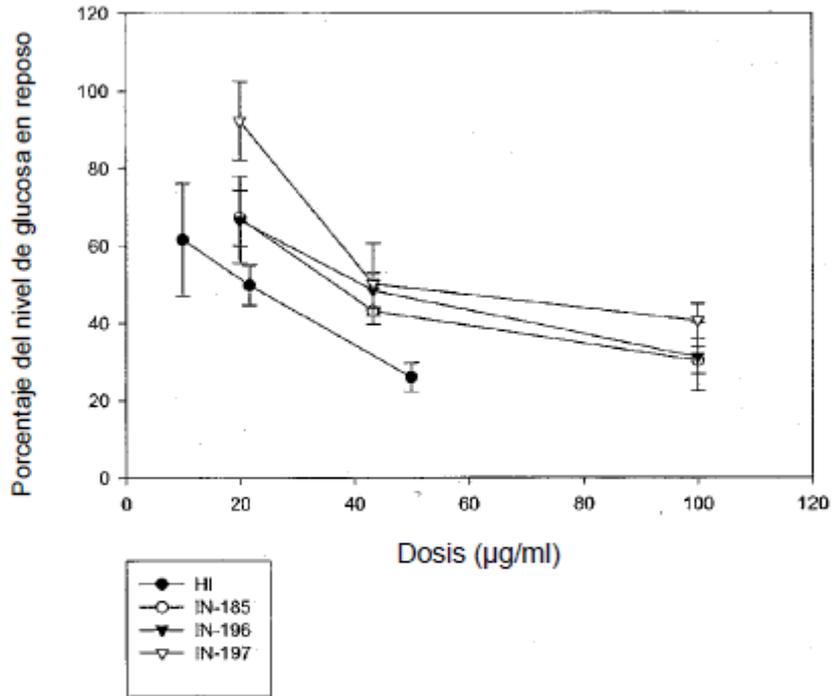


Figura 24

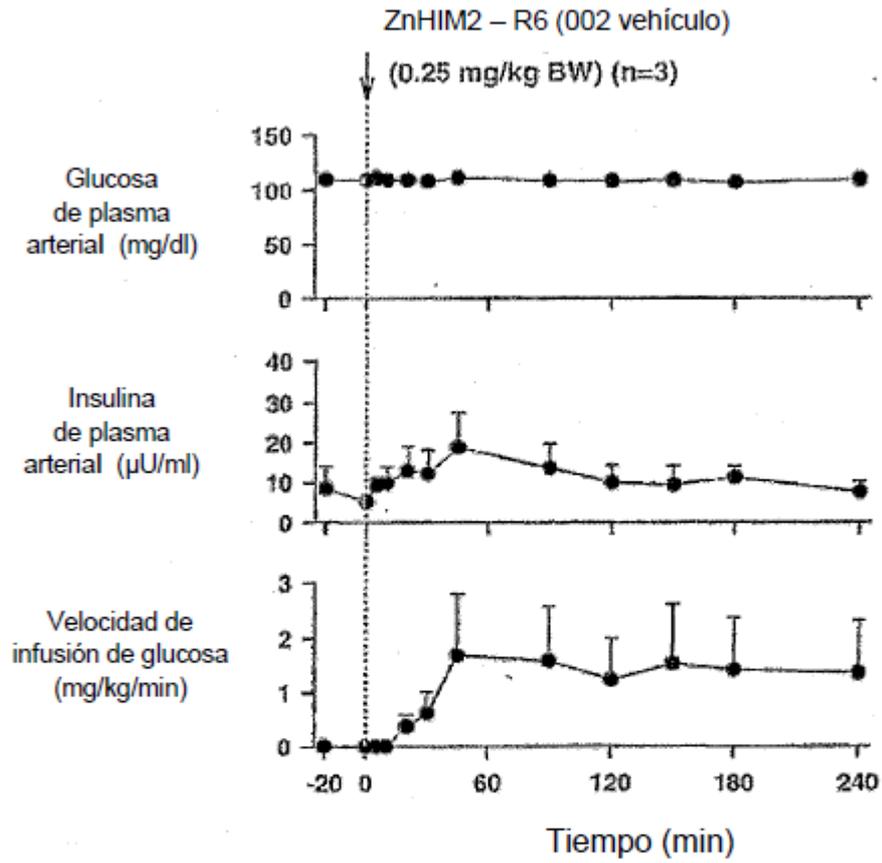


Figura 25

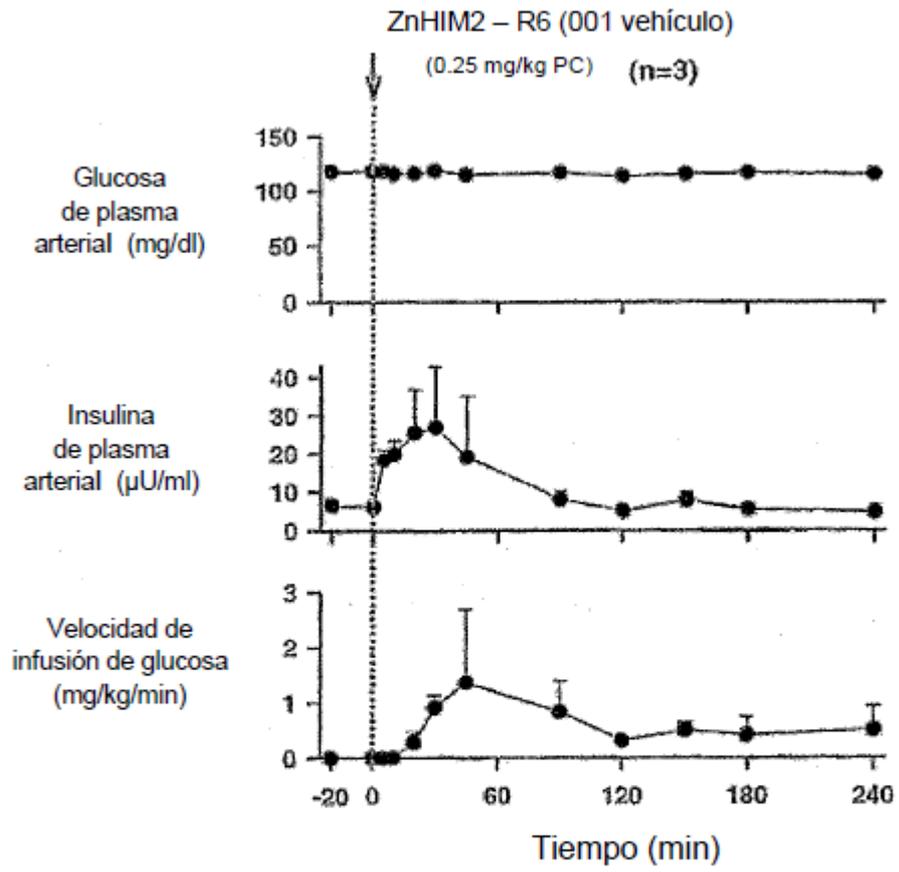


Figura 26

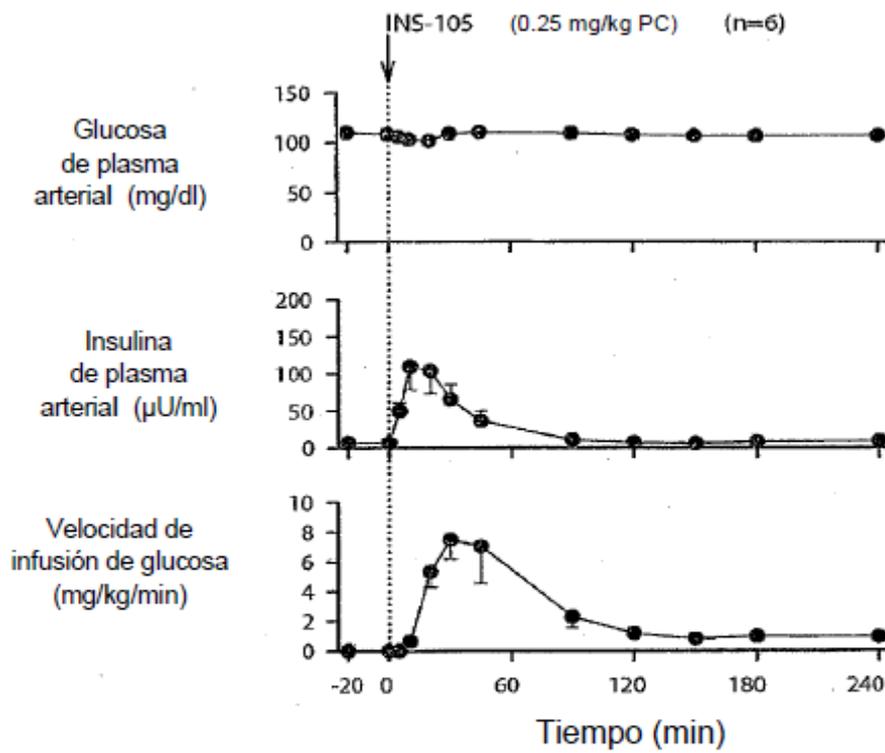


Figura 27

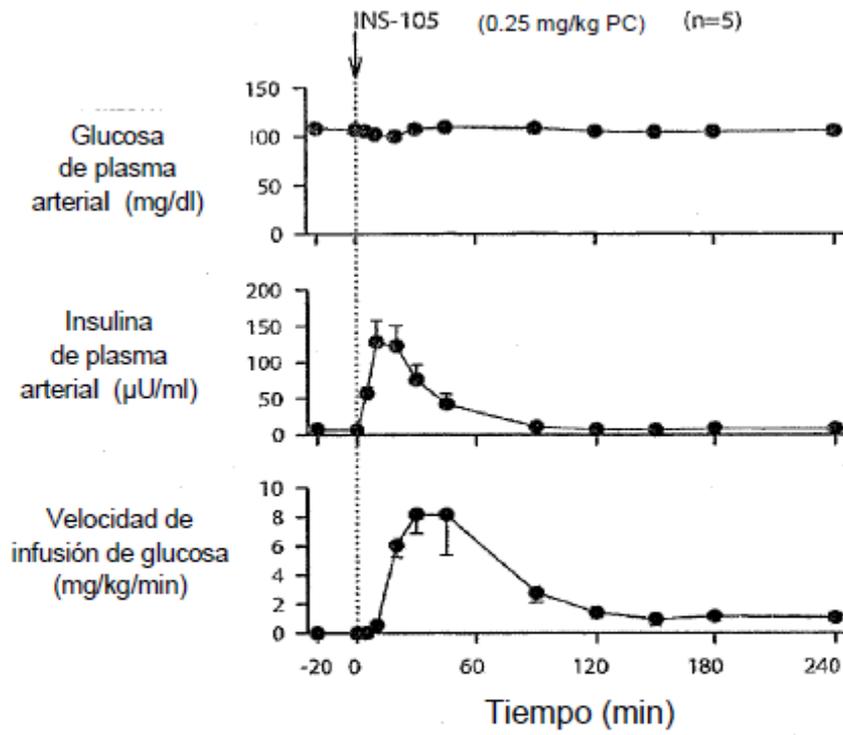


Figura 28

IN-105 en formulación líquida oral (820)
 La formulación contiene 3.0% Caprato
 Dosis oral 0.25 mg/kg

Glucosa de plasma arterial, velocidad de infusión de glucosa e insulina de plasma arterial

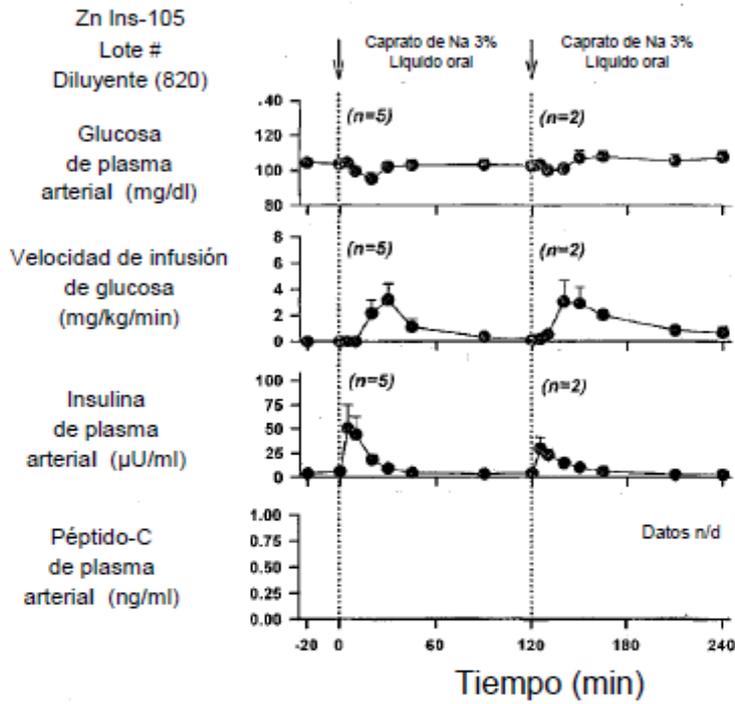


Figura 29

IN-105 en formulación líquida oral (820)
La formulación contiene 3.0% Caprato
Dosis oral 0.25 mg/kg

Área bajo la curva para la insulina de plasma arterial y velocidad de infusión de glucosa

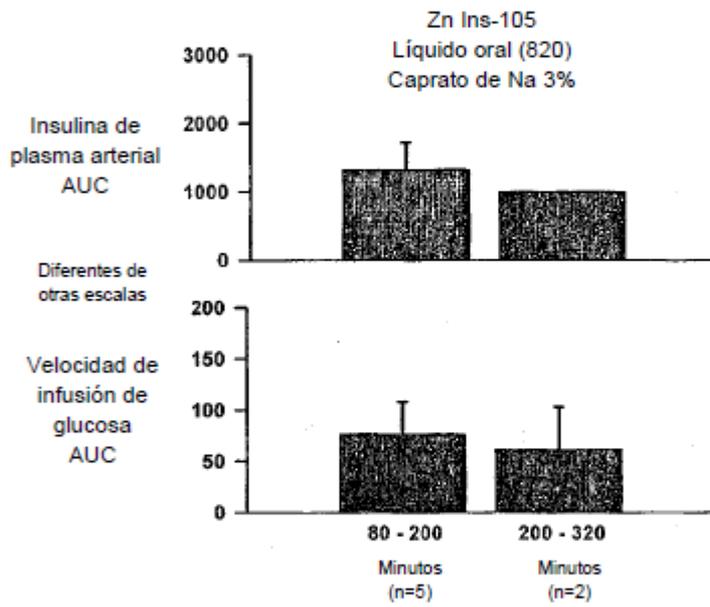


Figura 30

IN-105 en formulación líquida oral (820)

La formulación contiene ≈ 143 mg de caprato y 140 mg de laurato por tableta

Dosis oral 0.25 mg/kg

Glucosa de plasma arterial, velocidad de infusión de glucosa e insulina de plasma arterial

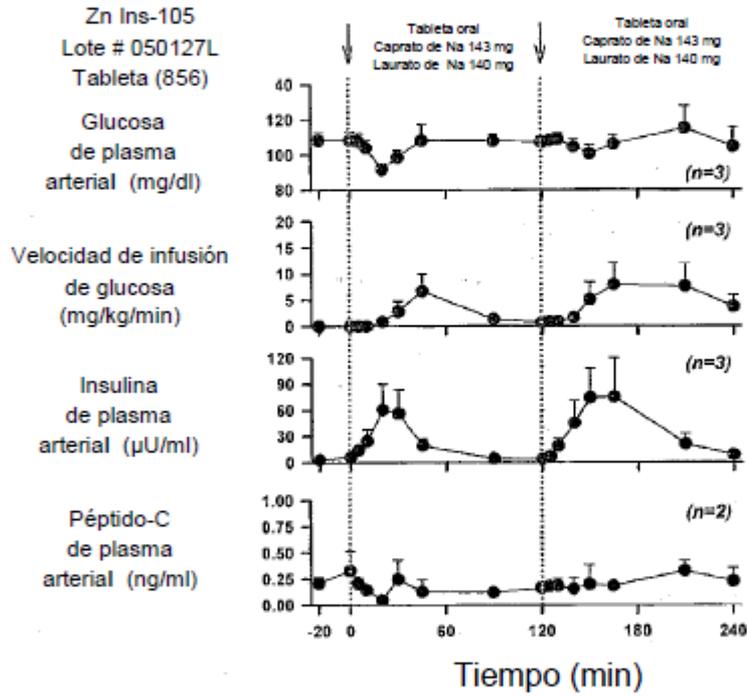


Figura 31

Farmulación de tableta (856)
La formulación contiene \approx 140 mg / 140 mg Caprato y Laurato por tableta
Dosis oral 0.25 mg/kg
Área bajo la curva para la insulina de plasma arterial y velocidad de infusión de glucosa

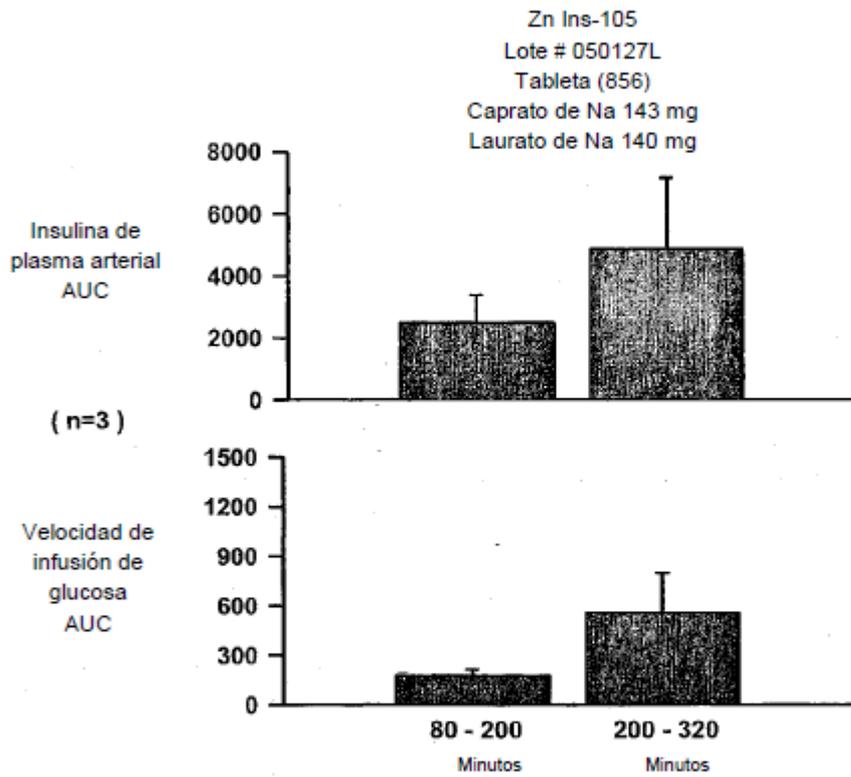


Figura 32

Forma de dosificación sólida (tabletas) formulación (854)

La formulación contiene Caprato 58 mg y Laurato 57 mg por tableta

Dosis oral 0.25 mg/kg

Glucosa de plasma arterial, velocidad de infusión de glucosa e insulina de plasma arterial

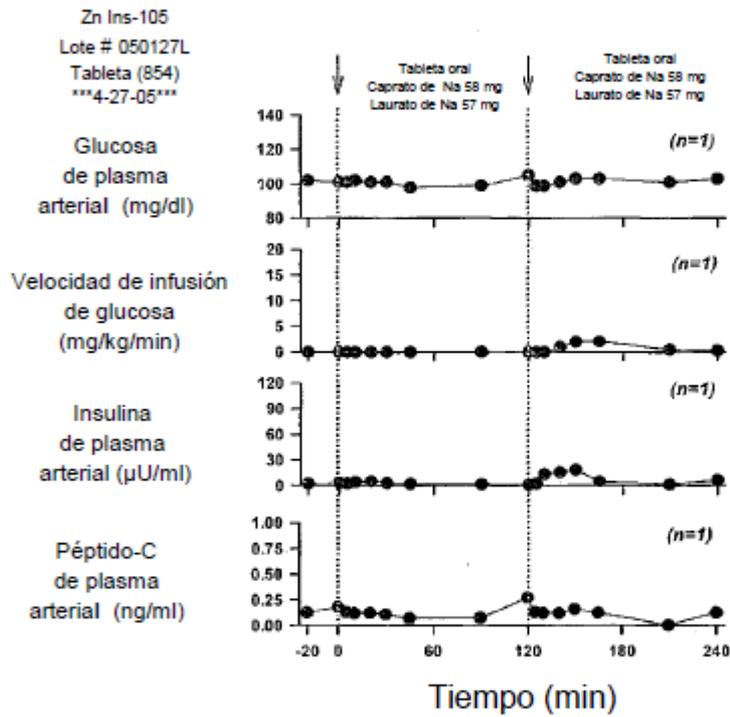
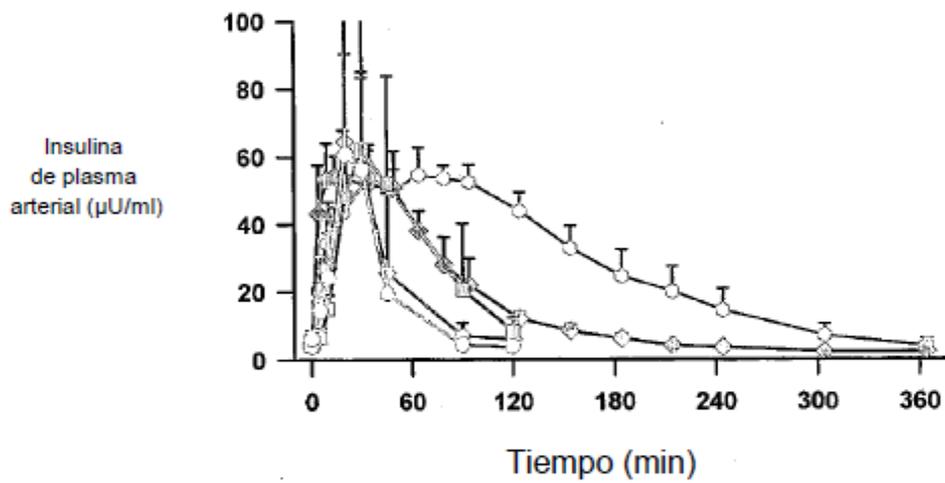


Figura 33

Niveles de insulina de plasma arterial después de dosificación de tabletas prototipo de Zn IN-105 (dosis de 6 mg o 0.25 mg/kg) y comparación con dosificación SQ* y por inhalación* de insulina regular

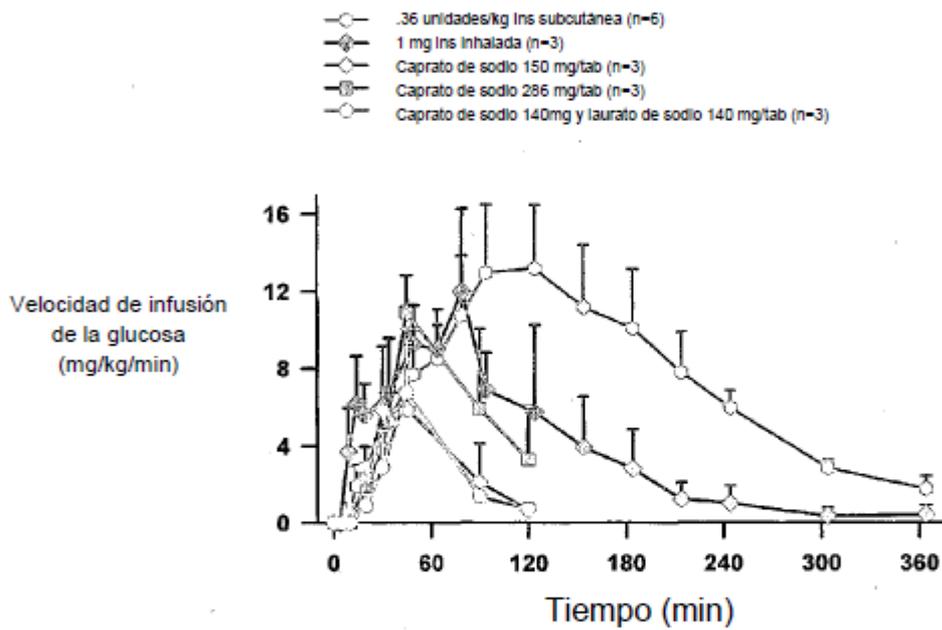
- .36 unidades/kg de insulina subcutánea (n=6)
- 1 mg insulina inhalada (n=3)
- ◇ Caprato de sodio 150 mg/tab (n=3)
- Caprato de sodio 286 mg/tab (n=3)
- Caprato de sodio 140mg y laurato de sodio 140 mg/tab (n=3)



* Dato histórico del mismo modelo de perro

Figura 34

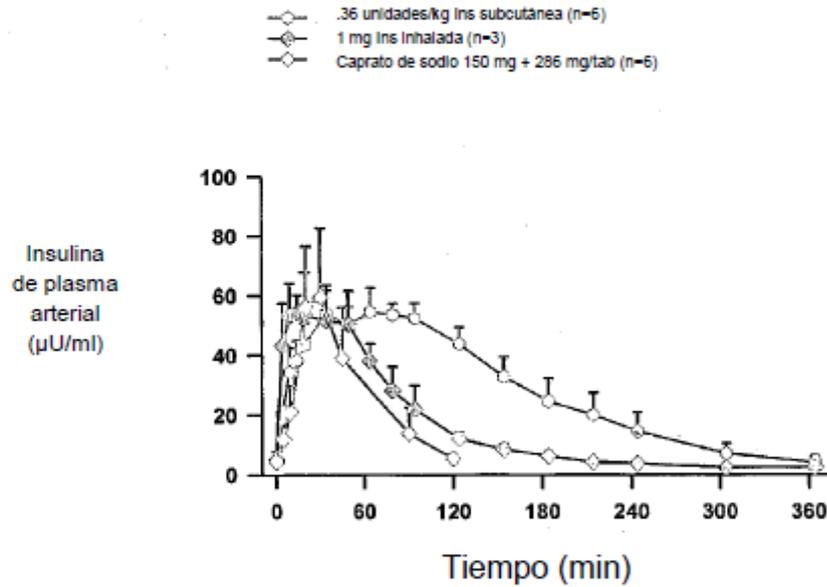
Velocidad de infusión de la glucosa después de dosificación de tabletas prototipo de Zn IN-105 (dosis de 6 mg o 0.25 mg/kg) y comparación con dosificación SQ* y por inhalación* de insulina regular



* Dato histórico del mismo modelo de perro

Figura 35

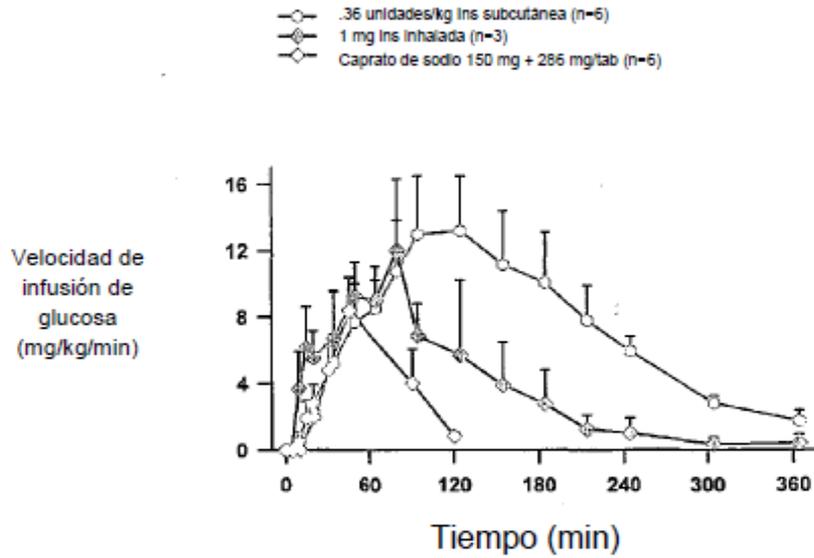
Niveles de insulina de plasma arterial después de dosificación de tabletas prototipo de Zn IN-105 y comparación con dosificación SQ* y por inhalación* de insulina regular, la formulación contiene 150 mg y 286 mg de caprato por tableta
 Dosis oral 0.25 mg/kg



* Dato histórico del mismo modelo de perro

Figura 36

Velocidad de infusión de glucosa (GIR) después de dosificación de tabletas prototipo de Zn IN-105 y comparación con dosificación SQ* y por inhalación* de insulina regular, la formulación contiene 150 mg y 280 mg de caprato por tableta, dosis oral 0.25 mg/kg



* Dato histórico del mismo modelo de perro

Figura 37

Formulación de tableta (860)
 La formulación contiene Caprato 286 mg por tableta
 Dosis oral 0.25 mg/kg
 Niveles de glucosa de plasma arterial, velocidad de infusión de glucosa, insulina de plasma arterial y péptido-C

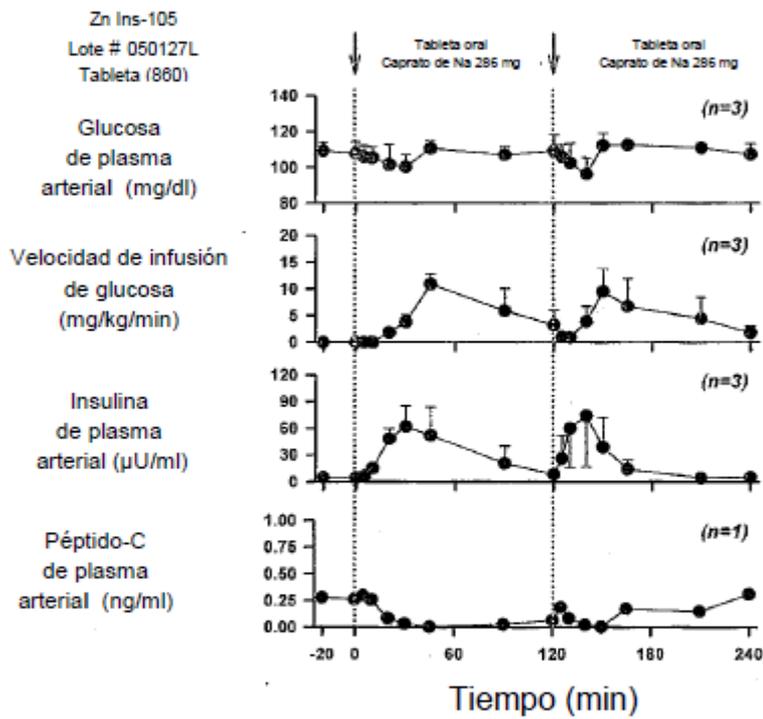


Figura 38

Formulación de tableta (860)
La formulación contiene Caprato 286 mg por tableta
Dosis oral 0.25 mg/kg
Área bajo la curva para la insulina de plasma arterial y velocidad de infusión de la glucosa

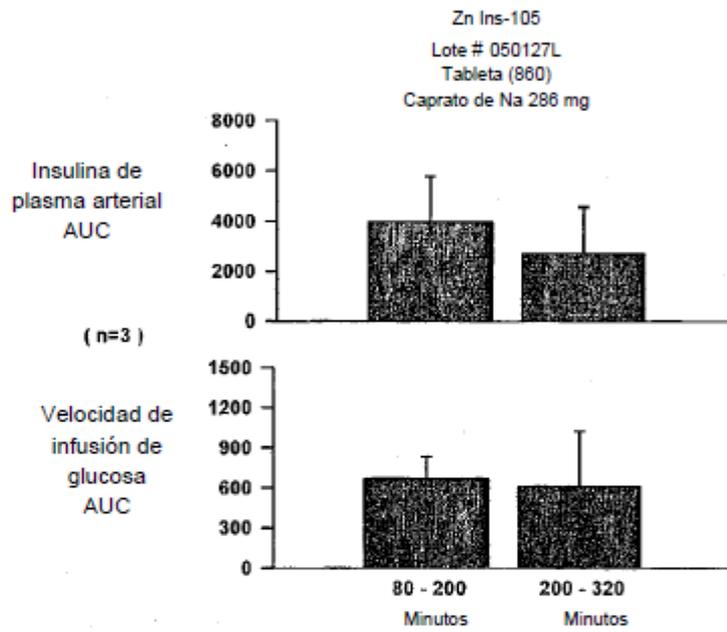


Figura 39

Formulación de tableta (862)/(859)
 La formulación contiene Caprato 159 mg por tableta
 Dosis oral 0.25 mg/kg
 Niveles de glucosa de plasma arterial, velocidad de infusión de glucosa, insulina de plasma arterial y péptido-C

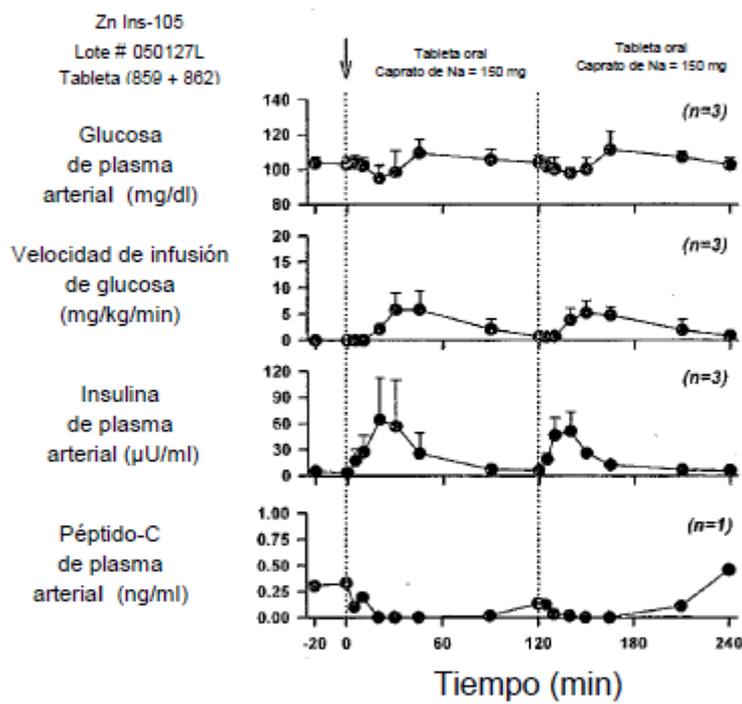


Figura 40

Formulación de tableta (862) Y (859)
La formulación contiene Caprato ≈ 150 mg por tableta
Dosis oral 0.25 mg/kg
Área bajo la curva para la insulina de plasma arterial y velocidad de infusión de la glucosa

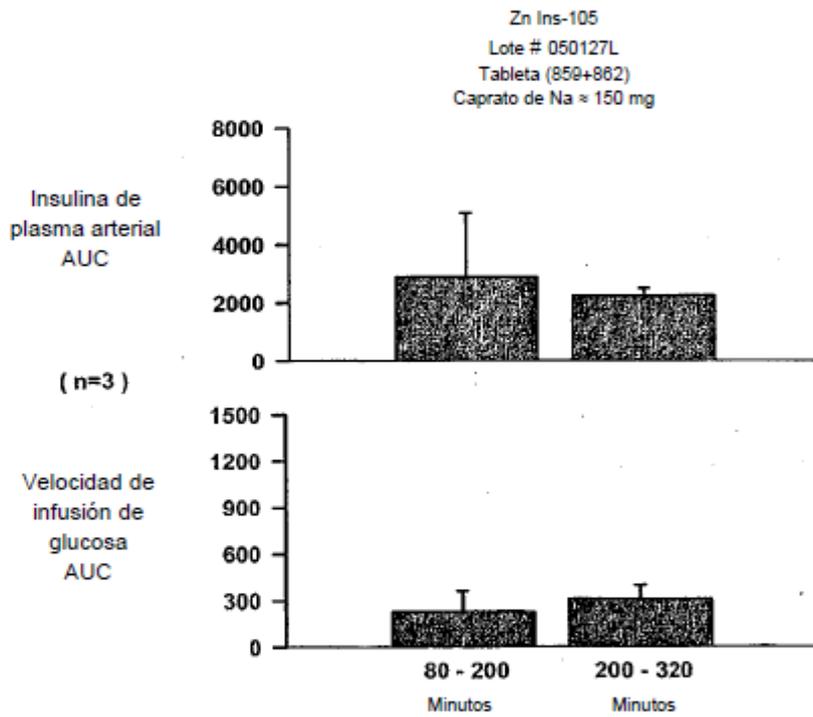


Figura 41

Fomulación de tableta (856)
La formulación contiene Caprato y Laurato \approx 140 mg/140 mg por tableta
Dosis oral 0.25 mg/kg
Área bajo la curva para la insulina de plasma arterial y velocidad de infusión de la glucosa

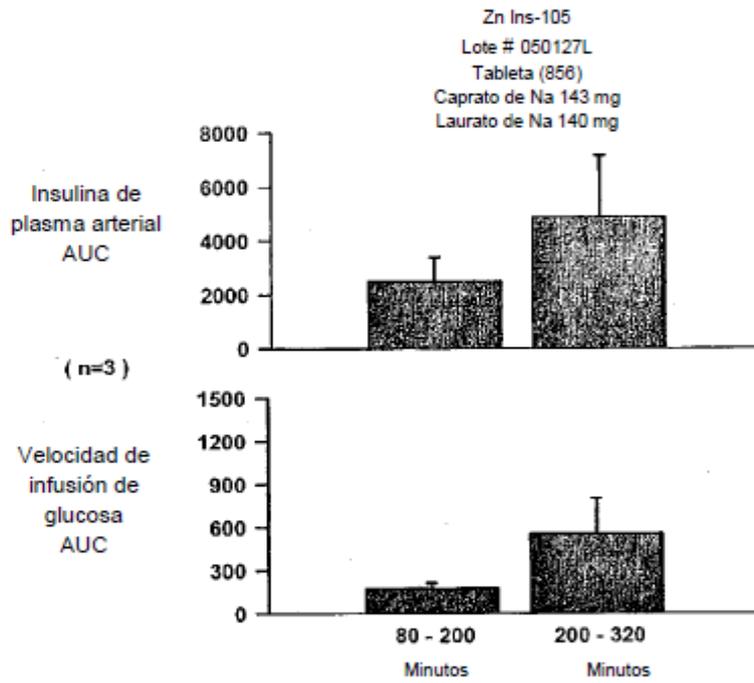


Figura 42