

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 820**

51 Int. Cl.:

A01N 61/00 (2006.01)

A01N 37/18 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2002 E 02737359 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 1404178**

54 Título: **Mezclas de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que comprenden polialquilenglicol, usos de las mismas y métodos para su elaboración**

30 Prioridad:

04.06.2001 US 873899

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

29.03.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**EKWURIBE, NNOCHIRI N.;
PRICE, CHRISTOPHER H.;
ANSARI, ASLAM M.;
ODENBAUGH, AMY L. y
RADHAKRISHNAN, BALASINGAM**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 564 820 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

Mezclas de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que comprenden polialquilenglicol, usos de las mismas y métodos para su elaboración

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención se refiere a conjugados de fármaco-oligómero, y, más particularmente, a conjugados de fármaco de insulina-oligómero.

Antecedentes de la invención

- 10 La diabetes, un trastorno del metabolismo de los carbohidratos, ha sido conocida desde la antigüedad. La diabetes es el resultado de la producción insuficiente, o de la sensibilidad reducida a la insulina. La molécula de insulina consiste de dos cadenas de aminoácidos enlazadas mediante enlaces de disulfuro (pm 6.000). Las células β de los islotes pancreáticos secretan un precursor monocatenario de insulina, conocido como proinsulina. La proteólisis de la proinsulina produce como resultado la remoción de cuatro aminoácidos básicos (números 31, 32, 64 y 65 en la cadena de proinsulina: Arg, Arg, Lys, Arg respectivamente) y del polipéptido de conexión ("C"). En la molécula resultante de insulina bicatenaria, la cadena A tiene glicina en el terminal amino, y la cadena B tiene fenilalanina en el terminal amino.

- 15 La insulina puede existir como un monómero, un dímero o un hexámero formado a partir de tres de los dímeros. El hexámero está coordinado con dos átomos de Zn^{2+} . La actividad biológica reside en el monómero. A pesar de que hasta hace poco se utilizó insulina de bovino y de porcino, casi exclusivamente para tratar diabetes en humanos, se conocen numerosas variaciones en la insulina entre especies. La insulina de porcino es la más similar a la insulina humana, de la cual se diferencia únicamente por tener un residuo de alanina en vez de un residuo de treonina en el terminal C de la cadena B. A pesar de estas diferencias, la mayoría de la insulina de mamífero tiene una actividad específica comparable. Hasta hace poco, los extractos de animales proporcionaban toda la insulina utilizada para el tratamiento de la enfermedad. La llegada de la tecnología recombinante permite la fabricación a escala comercial de insulina humana (por ejemplo, insulina Humulina^{MR}, comercialmente disponible a través de Eli Lilly and Company, Indianápolis, IN).

- 25 La insulina es necesaria para la utilización normal de la glucosa por parte de la mayoría de las células en el cuerpo. En personas con diabetes, la capacidad normal para utilizar la glucosa está inhibida, por lo tanto incrementando los niveles de azúcar en sangre (hiperglicemia). A medida que se acumula la glucosa en la sangre, se excretan los niveles en exceso de azúcar en la orina (glicosuria). Otros síntomas de la diabetes incluyen mayor volumen y frecuencia urinaria, sed, comezón, hambre, pérdida de peso, y debilidad.

- 30 Existen dos variedades de la diabetes. El tipo I es diabetes mellitus dependiente de insulina, o IDDM. La IDDM fue primero denominada como diabetes juvenil. En la IDDM, la insulina no se secreta por el páncreas y se debe proporcionar a partir de una fuente externa. La diabetes adulta tipo II puede ser controlada comúnmente mediante dieta aunque en algunos casos avanzados se requiere insulina.

- 35 Antes del aislamiento de la insulina en los años 1920, la mayoría de los pacientes morían en un corto periodo después del inicio de la enfermedad. La diabetes no tratada conduce a cetosis, la acumulación de cetonas, productos de la degradación de la grasa, en la sangre; esto es seguido por acidosis (acumulación de ácido en la sangre) con náusea y vómito. Conforme los productos tóxicos del metabolismo alterado de carbohidratos y grasas continúan acumulándose, los paciente entran en coma diabético.

- 40 El tratamiento de la diabetes requiere típicamente inyecciones regulares de insulina. El uso de insulina como tratamiento para la diabetes data de 1922, cuando Banting y colaboradores ("Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus", Can. Med. Assoc. J., 12: 141-146 (1922)) mostró que el extracto activo del páncreas tenía efectos terapéuticos en perros diabéticos. El tratamiento de un paciente diabético en ese mismo año con extractos pancreáticos produjo como resultado una mejoría dramática en la salvación clínica de vidas. Debido a los inconvenientes de las inyecciones de insulina, se han llevado a cabo esfuerzos masivos para mejorar la administración y bioasimilación de la insulina.

- 45 Se han hecho intentos para suministrar insulina mediante administración oral. Los problemas asociados con la administración oral de insulina para lograr normoglucemia en pacientes diabéticos están bien documentados en la literatura farmacéutica y médica. Las enzimas digestivas en el tracto GI degradan rápidamente la insulina, dando como resultado productos de descomposición biológicamente inactivos. En el estómago, por ejemplo, la insulina administrada oralmente experimenta proteólisis enzimática y degradación ácida. La supervivencia en el intestino se ve obstaculizada por una proteólisis excesiva. En el lumen, la insulina es bombardeada por una variedad de enzimas incluyendo enzimas gástricas y pancreáticas, exopeptidasas y endopeptidasas, y las peptidasas con borde en cepillo. Incluso si la insulina sobrevive este ataque enzimático, las barreras biológicas que deben ser atravesadas antes de que la insulina pueda

alcanzar sus receptores *in vivo* pueden limitar la administración oral de la insulina. Por ejemplo, la insulina puede poseer una baja permeabilidad de membrana, limitando su capacidad para pasar del lumen al torrente sanguíneo.

Los polipéptidos farmacéuticamente activos tales como la insulina han sido conjugados con mezclas polidispersas de polietilenglicol o mezclas polidispersas de polímeros que contienen polietilenglicol para proporcionar mezclas polidispersas de conjugados de fármaco-oligómero. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.179.337 de Davis y colaboradores, propone la conjugación de péptidos tales como la insulina con diversos polietilenglicoles tales como MPEG-1900 y MPEG-5000 suministrados por Union Carbide.

La Patente de los Estados Unidos No. 5.567.422 de Greenwald propone la conjugación de nucleófilos biológicamente activos con polietilenglicoles tales como m-PEG-OH (Union Carbide), que tiene un peso molecular promedio en número de 5,000 Daltons. El documento WO 01/21197 y Uchio y colaboradores, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35(2-3), 1999, 289-306, también describen conjugados de insulina con polietilenglicol.

La Patente de los Estados Unidos No. 5.359.030 de Ekwuribe propone la conjugación de polipéptidos tales como insulina con polímeros de glicolípidos modificados con polietilenglicol y polímeros de ácidos grasos modificados con polietilenglicol. El peso molecular promedio en número del polímero resultante de cada combinación se prefiere que esté en el intervalo de aproximadamente 500 hasta aproximadamente 10.000 Daltons.

El polietilenglicol se produce típicamente mediante polimerización de óxido de etileno con apertura de anillo catalizada por una base. La reacción se inicia mediante la adición de óxido de etileno a etilenglicol, con hidróxido de potasio como catalizador. Este procedimiento trae como resultado una mezcla polidispersa de polímeros de polietilenglicol que tienen un peso molecular promedio en número dentro de un intervalo dado de pesos moleculares. Por ejemplo, los productos de PEG ofrecidos por Sigma-Aldrich de Milwaukee, Wisconsin se proporcionan en mezclas polidispersas tales como PEG 400 (Mn 380-420); PEG 1.000 (Mn 950-1.050); PEG 1.500 (Mn 1.400-1.600); y PEG 2.000 (Mn 1.900-2.200).

Es deseable proporcionar mezclas no polidispersas de conjugados de insulina-oligómero en donde el oligómero comprende polietilenglicol.

Sumario de la invención

Se ha descubierto de manera inesperada que una mezcla sustancialmente monodispersa de conjugados de insulina-oligómero que comprende polietilenglicol de acuerdo con realizaciones de la presente invención exhibe mayor actividad *in vivo* que una mezcla polidispersa de conjugados similares que tiene el mismo peso molecular promedio en número. Esta actividad intensificada puede dar como resultado menores requerimientos de dosis. Además, una mezcla sustancialmente monodispersa de conjugados de insulina-oligómero que comprende polietilenglicol de acuerdo con las realizaciones de la presente invención es típicamente más efectiva en la supervivencia de un modelo *in vitro* de la digestión intestinal que mezclas polidispersas de conjugados similares. Además, las mezclas sustancialmente monodispersas de conjugados de insulina-oligómero que comprenden polietilenglicol de acuerdo con las realizaciones de la presente invención también trae como resultado típicamente menos variabilidad entre sujetos que las mezclas polidispersas de conjugados similares.

De acuerdo con la presente invención, como se define en la reivindicación 1, se proporciona una mezcla sustancialmente monodispersa de conjugados que comprende cada uno un fármaco de insulina acoplado a un oligómero que comprende una fracción de polietilenglicol. La fracción de polietilenglicol tiene preferiblemente al menos dos, tres, o cuatro subunidades de polietilenglicol y, lo más preferible, tiene al menos siete subunidades de polietilenglicol. El oligómero comprende adicionalmente una fracción lipofílica. El fármaco de insulina es preferiblemente insulina humana. El oligómero está acoplado covalentemente a la función amina de Lys^{B29} de la insulina. El conjugado está preferiblemente equilibrado anfífilicamente de tal manera que el conjugado es soluble de forma acuosa y capaz de penetrar membranas biológicas. La mezcla es preferiblemente una mezcla monodispersa y es más preferiblemente una mezcla monodispersa pura. En algunas realizaciones, el oligómero comprende una primera fracción de polietilenglicol acoplado covalentemente a la insulina mediante un enlace no hidrolizable y una segunda fracción de polietilenglicol acoplada covalentemente a la primera fracción de polietilenglicol mediante un enlace hidrolizable.

De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, se proporciona una mezcla sustancialmente monodispersa de conjugados en donde cada conjugado incluye insulina humana covalentemente acoplada a Lys^{B29} de la insulina humana a una fracción de ácido carboxílico de un oligómero que comprende ácido hexanoico covalentemente acoplado en el extremo distal con la fracción de ácido carboxílico a una fracción de polietilenglicol terminada en metilo que tiene al menos 7 subunidades de polietilenglicol.

Las mezclas sustancialmente monodispersas de conjugados de acuerdo con estas realizaciones de la presente invención tienen preferiblemente propiedades mejoradas cuando se comparan con aquellas de mezclas polidispersas. En una realización, se proporciona una mezcla sustancialmente monodispersa donde cada conjugado comprende un fármaco de insulina acoplado a un oligómero que incluye una fracción de polietilenglicol, y la mezcla tiene una actividad

in vivo que es mayor que la actividad *in vivo* de una mezcla polidispersa de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene el mismo peso molecular promedio en número que la mezcla sustancialmente monodispersa.

5 En otra realización, se proporciona una mezcla sustancialmente monodispersa de conjugados en donde cada conjugado comprende un fármaco de insulina acoplado a un oligómero que incluye una fracción de polietilenglicol, y la mezcla tiene una actividad *in vitro* que es mayor que la actividad *in vitro* de una mezcla polidispersa de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tienen el mismo peso molecular promedio en número que la mezcla sustancialmente monodispersa.

10 En incluso otra realización, se proporciona una mezcla sustancialmente monodispersa de conjugados en donde cada conjugado comprende un fármaco de insulina acoplado a un oligómero que incluye una fracción de polietilenglicol, y la mezcla tiene una mayor resistencia a la degradación por quimotripsina cuando se compara con la resistencia a la degradación por quimotripsina de una mezcla polidispersa de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene el mismo peso molecular promedio en número que la mezcla sustancialmente monodispersa.

15 En aún otra realización, se proporciona una mezcla sustancialmente monodispersa de conjugados en donde cada conjugado comprende un fármaco de insulina acoplado a un oligómero que incluye una fracción de polietilenglicol, y la mezcla tiene una variabilidad entre sujetos que es menor que la variabilidad entre sujetos de una mezcla polidispersa de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene el mismo peso molecular promedio en número que la mezcla sustancialmente monodispersa.

20 Las mezclas sustancialmente monodispersas de conjugados de acuerdo con las realizaciones de la presente invención tienen preferiblemente dos o más de las propiedades anteriormente descritas. Más preferiblemente, las mezclas sustancialmente monodispersas de conjugados de acuerdo con realizaciones de la presente invención tienen tres o más de las propiedades anteriormente descritas. Más preferiblemente, las mezclas sustancialmente monodispersas de conjugados de acuerdo con realizaciones de la presente invención tienen las cuatro propiedades anteriormente descritas.

25 De acuerdo con incluso otras realizaciones de la presente invención, se proporciona una mezcla de conjugados en donde cada conjugado incluye un fármaco de insulina acoplado con un oligómero que comprende una fracción de polietilenglicol, y la mezcla tiene una distribución de peso molecular con una desviación estándar de menos de aproximadamente 22 Daltons.

30 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una mezcla de conjugados en donde cada conjugado incluye un fármaco de insulina acoplado a un oligómero que comprende una fracción de polietilenglicol, y la mezcla tiene un coeficiente de dispersidad (DC) mayor de 10.000

$$DC = \frac{\left(\sum_{i=1}^n N_i M_i \right)^2}{\sum_{i=1}^n N_i M_i^2 \sum_{i=1}^n N_i - \left(\sum_{i=1}^n N_i M_i \right)^2}$$

en donde:

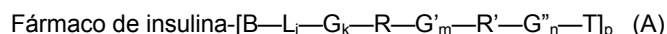
n es el número de moléculas diferentes en la muestra;

N_i es el número de i moléculas en la muestra; y

35 M_i es la masa de i moléculas

De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, se proporciona una mezcla de conjugados en la cual cada conjugado incluye un fármaco de insulina acoplado a un oligómero y tiene el mismo número de subunidades de polietilenglicol.

40 De acuerdo con incluso otras realizaciones de la presente invención, se proporciona una mezcla de conjugados en la cual cada conjugado es el mismo y tiene la fórmula:



en donde:

- B es una fracción de enlazamiento;
- L es una fracción enlazadora;
- G, G' y G" son fracciones espaciadoras individualmente seleccionadas;
- 5 R es una fracción lipofílica y R' es una fracción de polialquilenglicol, o R' es la fracción lipofílica y R es la fracción de polialquilenglicol;
- T es una fracción de terminación;
- j, k, m y n son individualmente 0 o 1; y
- p es un número entero entre 1 y el número de residuos nucleófilos sobre el fármaco de insulina.
- 10 También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden mezclas de conjugados de la presente invención así como métodos de tratamiento de una deficiencia de insulina en un sujeto que requiera de tal tratamiento mediante la administración de una cantidad efectiva de dichas composiciones farmacéuticas. Adicionalmente, se proporcionan métodos de síntesis de tales mezclas de conjugados.
- 15 Las mezclas de conjugado de insulina-oligómero de acuerdo con realizaciones de la presente invención pueden proporcionar mayor actividad *in vivo* y/o menor variabilidad entre sujetos y/o menor degradación por quimotripsina cuando se compara con las mezclas convencionales del conjugado polidisperso de insulina-oligómero.
- Breve descripción de los dibujos
- La Figura 1 ilustra un esquema genérico para sintetizar una mezcla de polímeros activados que comprende una fracción de polietilenglicol y una fracción de ácido graso;
- La Figura 2 ilustra un esquema para sintetizar una mezcla de mPEG;
- 20 La Figura 3 ilustra un esquema para sintetizar una mezcla de oligómeros activados de MPEG7-hexilo;
- La Figura 4 ilustra un esquema para sintetizar una mezcla de oligómeros activados de MPEG7-octilo;
- La Figura 5 ilustra un esquema para sintetizar una mezcla de oligómeros activados de mPEG-decilo;
- La Figura 6 ilustra un esquema para sintetizar una mezcla de oligómeros activados de estearato-PEG6;
- La Figura 7 ilustra un esquema para sintetizar una mezcla de oligómeros activados de estearato-PEG8;
- 25 La Figura 8 ilustra un esquema para sintetizar una mezcla de oligómeros activados de PEG3;
- La Figura 9 ilustra un esquema para sintetizar una mezcla de oligómeros activados de palmitato-PEG3;
- La Figura 10 ilustra un esquema para sintetizar una mezcla de oligómeros activados de PEG6;
- La Figura 11 ilustra un esquema para sintetizar diversos monómeros de propilenglicol;
- La Figura 12 ilustra un esquema para sintetizar diversos polímeros de propilenglicol;
- 30 La Figura 13 ilustra un esquema para sintetizar diversos polímeros de propilenglicol;
- La Figura 14 ilustra una comparación de los resultados obtenidos con un microfisiómetro Cytosensor®, que proporciona una indicación de la actividad de un compuesto, para las mezclas de conjugados de insulina-oligómero de acuerdo con realizaciones de la presente invención en comparación con mezclas de conjugados polidispersos e insulina, que se proporcionan para propósitos de comparación solamente y no forman parte de la invención;
- 35 La Figura 15 ilustra una comparación de la degradación de la quimotripsina de conjugados de insulina-oligómero de acuerdo con realizaciones de la presente invención con una mezcla convencional polidispersa de conjugados de insulina-oligómero, que es proporcionan solamente con fines de comparación y no forma parte de la invención;

- La Figura 16 ilustra el efecto de una mezcla de MPEG7-hexil-insulina, monoconjugada, de acuerdo con formas de realización de la presente invención sobre glucosa en plasma en perros sabuesos en ayunas;
- La Figura 17 ilustra, para propósitos de comparación, el efecto de una mezcla polidispersa de mPEG7_{promedio}-hexil-insulina, monoconjugada, que no es parte de la presente invención, sobre glucosa en plasma en perros sabuesos en ayunas;
- La Figura 18 ilustra la variabilidad entre sujetos de una mezcla de monoconjugados de mPEG4-hexil-insulina de acuerdo con la formas de realización de la presente invención administrada a perros sabuesos en ayunas;
- La Figura 19 ilustra la variabilidad entre sujetos de una mezcla de monoconjugados de mPEG7-hexil-insulina de acuerdo con formas de realización de la presente invención administrada a perros sabuesos en ayunas;
- La Figura 20 ilustra la variabilidad entre sujetos de una mezcla de monoconjugados de mPEG10-hexil-insulina de acuerdo con las realizaciones de la presente invención administrada a perros sabuesos en ayunas; y
- La Figura 21 ilustra, para propósitos de comparación, la variabilidad entre sujetos de una mezcla polidispersa de monoconjugados de mPEG7_{promedio}-hexil-insulina, que no es parte de la presente invención, administrada a perros sabuesos en ayunas.
- Descripción detallada de las realizaciones preferidas
- A continuación se describirá la invención con respecto a las realizaciones preferidas descritas en la presente invención. No obstante debe apreciarse que estas realizaciones son solo para el propósito de ilustración de la invención, y no deben considerarse como limitantes del alcance de la invención como se define por medio de las reivindicaciones.
- Como se utiliza en la presente invención, el término "no polidispersa" se utiliza para describir una mezcla de compuestos que tiene una dispersidad que está en contraste con las mezclas polidispersas descritas en la patente de los Estados Unidos No. 4.179.337 de Davis y colaboradores; patente de los Estados Unidos No. 5.567.422 de Greenwald; patente de los Estados Unidos No. 5.405.877 de Greenwald y colaboradores; y patente de los Estados Unidos No. 5.359.030 de Ekwuribe.
- Como se utiliza en la presente invención, el término "substancialmente monodispersa" se utiliza para describir una mezcla de compuestos en donde al menos 95 por ciento de los compuestos en la mezcla tienen el mismo peso molecular.
- Como se utiliza en la presente invención, el término "monodispersa" se utiliza para describir una mezcla de compuestos en donde aproximadamente 100 por ciento de los compuestos en la mezcla tienen el mismo peso molecular.
- Como se utiliza en la presente invención, el término "monodispersa en forma sustancialmente pura" se utiliza para describir una mezcla de compuestos en donde al menos 95 por ciento de los compuestos en la mezcla tienen el mismo peso molecular y tienen la misma estructura molecular. Por lo tanto, una mezcla monodispersa sustancialmente pura es una mezcla sustancialmente monodispersa, pero una mezcla sustancialmente monodispersa no necesariamente es una mezcla monodispersa sustancialmente pura.
- Como se utiliza en la presente invención, el término "monodispersa en forma pura" se utiliza para describir una mezcla de compuestos en donde aproximadamente 100 por ciento de los compuestos en la mezcla tienen el mismo peso molecular y tienen la misma estructura molecular. Por lo tanto, una mezcla monodispersa en forma pura es una mezcla monodispersa, pero una mezcla monodispersa no necesariamente es una mezcla monodispersa en forma pura.
- Como se utiliza en la presente invención, el término "peso molecular promedio en peso" se define como la suma de los productos de la fracción en peso para una molécula dada en la mezcla multiplicada por la masa de la molécula para cada molécula en la mezcla. El "peso molecular promedio en peso" se representa por el símbolo M_w .
- Como se utiliza en la presente invención, el término "peso molecular promedio en número" se define como el peso total de una mezcla dividido por el número de moléculas en la mezcla y se representa por el símbolo M_n .
- Como se utiliza en la presente invención, el término "coeficiente dispersidad" (DC) se define por la fórmula:

$$DC = \frac{\left(\sum_{i=1}^n N_i M_i \right)^2}{\sum_{i=1}^n N_i M_i^2 \sum_{i=1}^n N_i - \left(\sum_{i=1}^n N_i M_i \right)^2}$$

en donde:

n es el número de moléculas diferentes en la muestra;

N_i es el número de i moléculas en la muestra; y

5 M_i es la masa de las i moléculas.

Como se utiliza en la presente invención, el término "variabilidad en el sujeto" significa la variabilidad en la actividad que ocurre dentro del mismo sujeto cuando se le administra al sujeto la misma dosis de un fármaco o de una composición farmacéutica en momentos diferentes.

10 Como se utiliza en la presente invención, el término "variabilidad entre sujetos" significa la variabilidad en la actividad entre dos o más sujetos cuando a cada sujeto se le administra la misma dosis de un fármaco dado o de una formulación farmacéutica.

Como se utiliza en la presente invención, el término "fármaco de insulina" significa un fármaco que posee toda o alguna de la actividad biológica de la insulina.

15 Como se utiliza en la presente invención, el término "insulina" significa insulina humana, insulina de bovino, insulina de porcino o insulina de ballena, suministrada por fuentes naturales, sintéticas, o genéticamente modificadas.

20 Como se utiliza en la presente invención, el término "análogo de insulina" significa insulina en la que uno o más de los aminoácidos han sido reemplazados aunque se retiene alguna o toda la actividad de la insulina. El análogo se describe mediante el señalamiento de los aminoácidos de reemplazo con la posición del reemplazo como un superíndice seguido por una descripción de insulina. Por ejemplo, "insulina Pro^{B29}, humana" significa que la lisina típicamente encontrada en la posición B29 de una molécula de insulina humana ha sido reemplazada con prolina.

25 Los análogos de insulina se pueden obtener por diversos medios, como lo entenderán aquellos normalmente capacitados en la técnica. Por ejemplo, ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos en la estructura de la insulina sin pérdida apreciable de la capacidad interactiva de enlazamiento con estructuras tales como, por ejemplo, las regiones de enlazamiento al antígeno de los anticuerpos o los sitios de enlazamiento en las moléculas de sustrato. Puesto que la capacidad interactiva y naturaleza de la insulina definen su actividad biológica funcional, se pueden realizar ciertas sustituciones en la secuencia de aminoácidos y sin embargo el polipéptido conserva sus propiedades.

30 Para hacer dichas sustituciones, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. Generalmente se entiende en la técnica la importancia del índice hidropático del aminoácido para conferir una función biológica interactiva a un polipéptido. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria del polipéptido resultante, el cual a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático con base en sus características de hidrofobicidad y de carga de la siguiente forma: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o puntaje similar y aun así se obtiene un polipéptido con actividad biológica similar, es decir, aún se obtiene un polipéptido con funcionalidad biológica equivalente. Para hacer dichos cambios, se prefiere la sustitución de los aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 entre sí, se prefieren particularmente aquellos que están dentro de ± 1 entre sí, e incluso se prefieren aún más particularmente aquellos que están dentro de $\pm 0,5$ entre sí.

45 También se entiende en la técnica que la sustitución de los aminoácidos similares se puede realizar efectivamente con base en la hidrofobicidad. La patente de los Estados Unidos No. 4.554.101 establece que la mayor hidrofobicidad promedio local de una proteína, como se rige por la hidrofobicidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la patente de los Estados Unidos No. 4.554.101, los siguientes valores de hidrofobicidad han sido asignados a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina ($\pm 3,0$); aspartato ($+3,0 \pm 1$); glutamato ($+3,0 \pm 1$); serina ($+0,3$); asparagina ($+0,2$); glutamina ($+0,2$); glicina (0); treonina ($-0,4$);

5 prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Como lo entienden aquellos normalmente capacitados en la técnica, un aminoácido puede ser sustituido por otro que tenga un valor de hidrofiliidad similar y aún así obtener un equivalente biológico, y en particular, un polipéptido inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ±2 entre sí, se prefieren particularmente aquellos que están dentro de ±1 entre sí, y se prefieren aún más particularmente aquellos dentro de ±0,5 entre sí.

10 Como se describió anteriormente, las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan por lo tanto en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Los ejemplos de sustituciones (es decir, aminoácidos que pueden ser intercambiados sin alterar significativamente la actividad biológica del polipéptido) que toman en consideración las diversas características anteriores son bien conocidas por aquellos normalmente capacitados en la técnica e incluyen, por ejemplo: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

15 Como se utiliza en la presente invención, el término "fragmento de insulina" significa un segmento de la secuencia de aminoácidos encontrada en la insulina que retiene cierta o toda la actividad de la insulina. Los fragmentos de insulina se indican al establecer la posición(es) en una secuencia de aminoácidos seguido por una descripción del aminoácido. Por ejemplo, un fragmento de "insulina humana B25-B30" sería la secuencia de seis aminoácidos que corresponde a las posiciones B25, B26, B27, B28, B29 y B30 en la secuencia de aminoácidos de la insulina humana.

20 Como se utiliza en la presente invención, el término "análogo del fragmento de insulina" significa un segmento de la secuencia de aminoácidos encontrado en la molécula de insulina en donde uno o más de los aminoácidos en el segmento ha sido reemplazado aunque se retiene cierta o toda la actividad de la insulina.

Como se utiliza en la presente invención, el término "PEG" se refiere a polímeros de polietilenglicol lineales o ramificados, e incluye el monometiléter de polietilenglicol (mPEG). Los términos "subunidad PEG" y subunidad de polietilenglicol se refieren a una sola unidad de polietilenglicol, es decir, $-(CH_2CH_2O)-$.

25 Como se utiliza en la presente invención, el término "lipofílico" significa la capacidad para disolver en lípidos y/o la capacidad de penetrar, interaccionar con y/o atravesar membranas biológicas, y el término, "fracción lipofílica" o "lipófilo" significa una fracción que es lipofílica y/o que, cuando se une a otra entidad química, incrementa la lipofiliidad de dicha entidad química. Los ejemplos de fracciones lipofílicas incluyen, pero no se limitan a, alquilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, colesterilo, adamantilo y similares.

30 Como se utiliza en la presente invención, el término "alquilo inferior" se refiere a fracciones alquilo sustituidas o no sustituidas que tienen de uno a cinco átomos de carbono.

Como se utiliza en la presente invención, el término "alquilo superior" se refiere a fracciones alquilo sustituidas o no sustituidas que tienen seis o más átomos de carbono.

35 En las realizaciones de la presente invención, se proporciona una mezcla sustancialmente monodispersa de conjugados de insulina-oligómero. Preferiblemente, al menos aproximadamente 96, 97, 98 o 99 por ciento de los conjugados en la mezcla tienen el mismo peso molecular. Más preferiblemente, la mezcla es una mezcla monodispersa. Incluso más preferiblemente, la mezcla es una mezcla sustancialmente monodispersa pura. Incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente 96, 97, 98 o 99 por ciento de los conjugados en la mezcla tienen el mismo peso molecular y tienen la misma estructura molecular. Más preferiblemente, la mezcla es una mezcla monodispersa pura.

40 El fármaco de insulina preferiblemente es insulina. Más preferiblemente, el fármaco de insulina es insulina humana. Sin embargo, debe entenderse que el fármaco de insulina se puede seleccionar a partir de diversos fármacos de insulina conocidos por aquellos normalmente capacitados en la técnica incluyendo, por ejemplo, proinsulina, análogos de insulina, fragmentos de insulina, y análogos de fragmentos de insulina. Los análogos de insulina incluyen, pero no se limitan a, insulina humana Asp^{B28} , insulina humana Lys^{B28} , insulina humana Leu^{B28} , insulina humana Val^{B28} , insulina humana Ala^{B28} , insulina humana $Asp^{B28}Pro^{B29}$, insulina humana $Lys^{B28}Pro^{B29}$, insulina humana $Leu^{B28}Pro^{B29}$, insulina humana $Val^{B28}gPro^{B29}$, insulina humana $Ala^{B28}Pro^{B29}$, así como análogos proporcionados utilizando los lineamientos de sustitución descritos anteriormente. Los fragmentos de insulina incluyen, pero no se limitan a, insulina humana B22-B30, insulina humana B23-B30, insulina humana B25-B30, insulina humana B26-B30, insulina humana B27-B30, insulina humana B29-B30, la cadena A de insulina humana, y la cadena B de insulina humana. Los análogos de fragmentos de insulina pueden ser proporcionados mediante la sustitución de uno o más aminoácidos como se describió anteriormente en un fragmento de insulina.

45

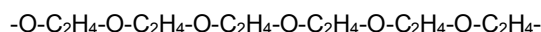
50

El oligómero puede ser diversos oligómeros que comprenden una fracción de polietilenglicol como lo entenderán aquellos normalmente capacitados en la técnica. Preferiblemente, la fracción polietilenglicol del oligómero tiene al menos 2, 3, o 4 subunidades polietilenglicol. Más preferiblemente, la fracción polietilenglicol tiene al menos 5 o 6

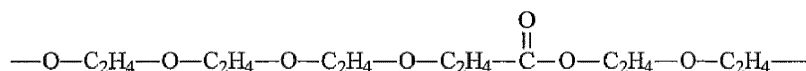
subunidades de polietilenglicol, y lo más preferiblemente, la fracción de polietilenglicol del tiene al menos 7 subunidades de polietilenglicol.

El oligómero puede comprender una o más de otras fracciones como lo entenderán aquellos normalmente capacitados en la técnica incluyendo, pero no limitado a, fracciones hidrofílicas adicionales, fracciones lipofílicas, fracciones espaciadoras, fracciones enlazadoras, y fracciones terminadoras. Las diversas fracciones en el oligómero están covalentemente acopladas entre sí ya sea mediante enlaces hidrolizables o no hidrolizables.

El oligómero puede comprender además una o más fracciones hidrofílicas adicionales (es decir, fracciones además de la fracción de polietilenglicol) incluyendo, pero no limitadas a, azúcares, óxidos de polialquileño, y copolímeros de poliamina/PEG. Puesto que el polietilenglicol es un óxido de polialquileño, la fracción hidrofílica adicional puede ser una fracción de polietilenglicol. Las fracciones adyacentes de polietilenglicol serán consideradas como la misma fracción si están acopladas por un enlace éter. Por ejemplo la fracción



es una fracción individual de polietilenglicol que tiene seis subunidades de polietilenglicol. Si esta fracción fuera la única fracción hidrofílica en el oligómero, el oligómero no contendría una fracción hidrofílica adicional. Las fracciones adyacentes de polietilenglicol serán consideradas como fracciones diferentes si están acopladas mediante un enlace diferente a un enlace éter. Por ejemplo, la fracción



es una fracción de polietilenglicol que tiene cuatro subunidades de polietilenglicol y una fracción hidrofílica adicional que tiene dos subunidades de polietilenglicol. Preferiblemente, los oligómeros de acuerdo con las realizaciones de la presente invención comprenden una fracción de polietilenglicol y sin fracciones hidrofílicas adicionales.

El oligómero comprende una fracción lipofílica que es una fracción alquilo inferior no sustituida que tiene 2 a 12 átomos de carbono, y covalentemente acoplados a la fracción de polietilenglicol. El oligómero puede comprender además una o más fracciones lipofílicas adicionales, como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. La fracción lipofílica es preferiblemente una fracción alquilo, lineal o ramificada, saturada o insaturada, o una fracción de ácido graso lineal o ramificada, saturada o insaturada. Cuando la fracción lipofílica es una fracción alquilo, es preferiblemente una fracción alquilo saturada o insaturada, lineal, que tiene de 1 a 28 átomos de carbono. Más preferiblemente, la fracción alquilo tiene 2 a 12 átomos de carbono. Cuando la fracción lipofílica es una fracción de ácido graso, es preferiblemente una fracción de ácido graso natural que es lineal, saturada o insaturada, que tiene 2 a 18 átomos de carbono. Más preferiblemente, la fracción de ácido graso tiene 3 a 14 átomos de carbono. Más preferiblemente, la fracción de ácido graso tiene al menos 4, 5 o 6 átomos de carbono.

El oligómero puede comprender adicionalmente una o más fracciones espaciadoras como lo entenderán aquellos normalmente capacitados en la técnica. Las fracciones espaciadoras pueden ser utilizadas, por ejemplo, para separar una fracción hidrofílica de una fracción lipofílica, para separar una fracción lipofílica o fracción hidrofílica del fármaco de insulina, para separar una primera fracción hidrofílica o lipofílica de una segunda fracción hidrofílica o lipofílica, o para separar una fracción hidrofílica o lipofílica de una fracción enlazadora. Las fracciones espaciadoras se seleccionan preferiblemente a partir del grupo que consiste de fracciones de azúcar, colesterol y glicerina.

El oligómero puede comprender adicionalmente una o más fracciones enlazadoras que son utilizadas para acoplar el oligómero con el fármaco de insulina como lo entenderán aquellos normalmente capacitados en la técnica. Las fracciones enlazadoras preferiblemente se seleccionan a partir del grupo que consiste de fracciones de alquilo y de ácido graso.

El oligómero puede comprender adicionalmente una o más fracciones terminadoras en uno o más extremos del oligómero que no están acoplados al fármaco de insulina. La fracción terminadora preferiblemente es una fracción alquilo o alcoxi, y más preferiblemente es una fracción de alquilo inferior o de alcoxi inferior. Más preferiblemente, la fracción terminadora es metilo o metoxi. Aunque la fracción terminadora preferiblemente es una fracción de alquilo o de alcoxi, debe entenderse que la fracción terminadora puede ser de diversas fracciones como lo entenderán aquellos normalmente capacitados en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, azúcares, colesterol, alcoholes, y ácidos grasos.

Al menos un oligómero está acoplado covalentemente a la función amina de Lys^{B29} del fármaco de insulina. En algunas realizaciones, el fármaco de insulina se acopla al oligómero utilizando un enlace hidrolizable (por ejemplo, un enlace éster o carbonato). Un acoplamiento hidrolizable puede proporcionar un conjugado de fármaco de insulina-oligómero que actúa como un profármaco. En ciertos casos, por ejemplo cuando el conjugado de fármaco de insulina-oligómero es inactivo (es decir, el conjugado carece de la capacidad para afectar al organismo a través del mecanismo primario de acción del fármaco de insulina), un acoplamiento hidrolizable puede permitir un efecto de liberación en el tiempo o de

liberación controlada, administrando el fármaco de insulina durante un período de tiempo dado a medida que uno o más oligómeros se escinden de sus respectivos conjugados de fármaco de insulina-oligómero para proporcionar el fármaco activo. En otras realizaciones, el fármaco de insulina está acoplado al oligómero utilizando un enlace no hidrolizable (por ejemplo, un enlace carbamato, amida, o éter). El uso de un enlace no hidrolizable puede ser preferible cuando es deseable permitir que el conjugado de fármaco de insulina-oligómero circule en el torrente sanguíneo durante un período prolongado de tiempo, preferiblemente al menos 2 horas. Cuando el oligómero está acoplado covalentemente al fármaco de insulina, el oligómero comprende además una o más fracciones de enlazamiento que se usan para acoplar covalentemente el oligómero con el fármaco de insulina como se entenderá por aquellos normalmente capacitados en la técnica. Las fracciones de enlazamiento se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste de enlace(s) covalente(s), fracciones de éster, fracciones de carbonato, fracciones de carbamato, fracciones de amida y fracciones de amina secundaria. Más de una fracción en el oligómero se puede acoplar covalentemente al fármaco de insulina.

Más de un oligómero (es decir, una pluralidad de oligómeros) se puede acoplar al fármaco de insulina. Los oligómeros en la pluralidad son preferiblemente los mismos. Sin embargo, se entiende que los oligómeros en la pluralidad pueden ser diferentes entre sí, o, alternativamente, algunos de los oligómeros en la pluralidad pueden ser los mismos y algunos pueden ser diferentes. Cuando una pluralidad de oligómeros está acoplada al fármaco de insulina, puede ser preferible acoplar uno o más de los oligómeros al fármaco de insulina con enlaces hidrolizables y acoplar uno o más de los oligómeros con el fármaco de insulina con enlaces no hidrolizables. Alternativamente, todos los enlaces que acoplan la pluralidad de oligómeros al fármaco de insulina pueden ser hidrolizables, pero tienen diversos grados de capacidad de hidrólisis de tal manera que, por ejemplo, uno o más de los oligómeros se remueve rápidamente del fármaco de insulina mediante hidrólisis en el organismo y uno o más de los oligómeros se remueve lentamente del fármaco de insulina mediante hidrólisis en el organismo.

Al menos un oligómero está acoplado en forma covalente a la función amina de Lys^{B29} de la insulina. Otros oligómeros pueden ser acoplados al fármaco de insulina en diversos residuos nucleófilos del fármaco de insulina incluyendo, pero no limitados a, funciones hidroxilo nucleofílicas y/o funciones amino. Cuando el fármaco de insulina es un polipéptido, se puede encontrar una función hidroxilo nucleofílica, por ejemplo, en los residuos serina y/o tirosina, y se puede encontrar una función amino nucleofílica, por ejemplo, en los residuos histidina y/o lisina, y/o en uno o más terminales N del polipéptido. Cuando se acopla un oligómero a uno o más terminales N del polipéptido de insulina, el acoplamiento forma preferiblemente una amina secundaria. Cuando el fármaco de insulina es insulina humana, por ejemplo, el oligómero se puede acoplar a una función amino de la insulina, incluyendo la función amina de Gly^{A1}, la función amino de Phe^{B1}, y la función amino de Lys^{B29}. Cuando un oligómero se acopla a la insulina humana, el oligómero se acopla preferiblemente a la función amino de Lys^{B29}. Cuando se acoplan dos oligómeros a la insulina humana, los oligómeros se acoplan preferiblemente a la función amino de Phe^{B1} y la función amino de Lys^{B29}. A pesar de que más de un oligómero se puede acoplar a la insulina humana, se observa una mayor actividad (capacidad mejorada de disminuir la glucosa) para la insulina humana monoconjugada.

Las mezclas sustancialmente monodispersas de los conjugados del fármaco de insulina-oligómero de la presente invención se pueden sintetizar mediante diversos métodos. Por ejemplo, se sintetiza una mezcla sustancialmente monodispersa de oligómeros que consiste de ácido carboxílico y polietilenglicol mediante el contacto de una mezcla sustancialmente monodispersa de ácido carboxílico con una mezcla sustancialmente monodispersa de polietilenglicol bajo condiciones suficientes para proporcionar una mezcla sustancialmente monodispersa de oligómeros. Los oligómeros de la mezcla sustancialmente monodispersa se activan entonces de manera que sean capaces de reaccionar con un fármaco de insulina para proporcionar un conjugado del fármaco de insulina-oligómero.

De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, se proporciona una mezcla sustancialmente monodispersa de conjugados en donde cada conjugado incluye insulina humana covalentemente acoplado en Lys^{B29} de la insulina a una fracción de ácido carboxílico de un oligómero que comprende ácido hexanoico covalentemente acoplado en el extremo distal a la fracción de ácido carboxílico con una fracción de polietilenglicol terminada en metilo que tiene al menos 7 subunidades de polietilenglicol. Preferiblemente cada conjugado en la mezcla sustancialmente monodispersa consiste de insulina humana covalentemente acoplado en Lys^{B29} de la insulina a una fracción de ácido carboxílico de un oligómero que consiste de ácido hexanoico covalentemente acoplado al extremo distal con la fracción de ácido carboxílico a una fracción de polietilenglicol terminado en metilo que tiene 7 subunidades de polietilenglicol.

Las mezclas de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tienen una distribución de peso moleculares con una desviación estándar de menos de aproximadamente 22 Daltons pueden sintetizarse por diversos métodos. Por ejemplo, una mezcla de oligómeros que tiene una distribución de peso moleculares con una desviación estándar de menos de aproximadamente 22 Daltons que consiste de ácido carboxílico y polietilenglicol se sintetiza poniendo en contacto una mezcla de ácido carboxílico que tiene una distribución de peso molecular con una desviación estándar de menos de aproximadamente 22 Daltons, con una mezcla de polietilenglicol que tiene una distribución de peso molecular con una desviación estándar de menos de aproximadamente 22 Daltons, bajo condiciones suficientes para proporcionar una mezcla de oligómeros que tiene una distribución de peso molecular con una desviación estándar de menos de aproximadamente 22 daltons. Los oligómeros de la mezcla que tienen una distribución de peso molecular con una desviación estándar de menos de aproximadamente 22 Daltons son luego activados de modo que son capaces de reaccionar con un fármaco de insulina para proporcionar un conjugado de fármaco de insulina-oligómero.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una mezcla de conjugados en donde cada conjugado incluye un fármaco de insulina acoplada a un oligómero que comprende una fracción de polietilenglicol, y la mezcla tiene un coeficientes de dispersidad (CDC) mayor que 10.000, donde

$$DC = \frac{\left(\sum_{i=1}^n N_i M_i \right)^2}{\sum_{i=1}^n N_i M_i^2 \sum_{i=1}^n N_i - \left(\sum_{i=1}^n N_i M_i \right)^2}$$

5

donde:

n es el número de moléculas diferentes en la muestra;

N_i es el número de moléculas i en la muestra; y

M_i es la masa de la molécula i.

10 La mezcla de conjugados tiene preferiblemente un coeficiente de dispersidad mayor a 100.000. Más preferiblemente, el coeficiente de dispersidad de la mezcla del conjugado es mayor que 500.000 y, lo más preferiblemente, el coeficiente de dispersidad es mayor que 10 millones. Las variables n, N_i , y M_i se pueden determinar por diversos métodos, como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, los métodos descritos más adelante en el Ejemplo 49.

15 Las mezclas de conjugados fármaco de insulina-oligómero que tienen un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 pueden ser sintetizadas por diversos métodos. Por ejemplo, una mezcla de oligómeros que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 que consiste de ácido carboxílico y polietilenglicol se sintetiza poniendo en contacto una mezcla de ácido carboxílico que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000, con una mezcla de polietilenglicol que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 bajo condiciones suficientes para proporcionar una mezcla de oligómeros que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000. Los oligómeros de la mezcla que tienen un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 son luego activados de modo que son capaces de reaccionar con un fármaco de insulina para proporcionar un conjugado de fármaco de insulina-oligómero. Una realización de una ruta de síntesis para proporcionar una mezcla de oligómeros activados que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 se ilustra en la Figura 3 y se describe en los Ejemplos 11-18 más adelante. Otra realización de una ruta de síntesis para proporcionar una mezcla de oligómeros activados que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 se ilustra en la Figura 4 y se describe en los Ejemplos 19-24 más adelante. Aún otra realización de una ruta de síntesis para proporcionar una mezcla de oligómeros activados que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 se ilustra en la Figura 5 y se describe en los Ejemplos 25-29 más adelante. Incluso, otra realización de una ruta de síntesis para proporcionar una mezcla de oligómeros activados que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 se ilustra en la Figura 6 y se describe en los Ejemplos 30-31 más adelante. Otra realización de una ruta de síntesis para proporcionar una mezcla de oligómeros activados que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 se ilustra en la Figura 7 y se describe en los Ejemplos 32-37 más adelante. Aún otra realización de una ruta de síntesis para proporcionar una mezcla de oligómeros activados que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 se ilustra en la Figura 8 y se describe en el Ejemplo 38 más adelante. Incluso otra realización de una ruta de síntesis para proporcionar una mezcla de oligómeros activados que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 se ilustra en la Figura 9 y se describe en el Ejemplo 39 más adelante. Otra realización de una ruta de síntesis para proporcionar una mezcla de oligómeros activados que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 se ilustra en la Figura 10 y se describe en el Ejemplo 40 más adelante.

40 La mezcla de oligómeros activados que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 reacciona con una mezcla de fármacos de insulina que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000, bajo condiciones suficientes para proporcionar una mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero. Una síntesis preferida se describe en el Ejemplo 41 más adelante. Como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, las condiciones de reacción (por ejemplo, relaciones molares seleccionadas, mezclas de disolventes y/o de pH) pueden ser controladas de tal manera que la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero resultante de la reacción de la mezcla de oligómeros activados que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 y la mezcla de fármacos de insulina que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 es una mezcla que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000. Por ejemplo, la conjugación en la función amino de lisina puede ser suprimida manteniendo el pH de la solución de la reacción por debajo del pK_a de lisina. Alternativamente, la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero puede ser separada y aislada utilizando, por ejemplo, HPLC como se describe más adelante en el Ejemplo 50 para

proporcionar una mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero, por ejemplo mono, di, o triconjugados, que tienen un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000. El grado de conjugación (por ejemplo, si la molécula aislada es un mono, di, o triconjugado) de un conjugado particular aislado se puede determinar y/o verificar utilizando diversas técnicas como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, espectroscopía de masas. La estructura particular del conjugado (por ejemplo, si el oligómero está es una Gly^{A1}, Phe^{B1} o Lys^{B29} de un monoconjugado de insulina humana) se puede determinar y/o verificar utilizando diversas técnicas como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, análisis de secuencia, mapeo de péptidos, escisión enzimática selectiva, y/o escisión con endopeptidasa.

Como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, uno o más de los sitios de reacción en el fármaco de insulina pueden ser bloqueados, por ejemplo, haciendo reaccionar el fármaco de insulina con un reactivo de bloqueo, tal como N-terc-butoxicarbonilo (t-BOC), o N-(9-fluorenilmetoxycarbonilo) (N-FMOC). Este proceso puede ser preferido, por ejemplo, cuando el fármaco de insulina es un polipéptido y se desea formar un conjugado insaturado (es decir, un conjugado en donde no todos los residuos nucleófilos están conjugados) que tiene un oligómero en uno o más de los terminales N del polipéptido. Después de tal bloqueo, se puede hacer reaccionar la mezcla de fármacos de insulina bloqueados que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 con la mezcla de oligómeros activados que tienen un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 para proporcionar una mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene oligómero(s) acoplado(s) a uno o más residuos nucleofílicos y que tiene fracciones de bloqueo acopladas a otros residuos nucleofílicos. Después de la reacción de conjugación, los conjugados de fármaco de insulina-oligómero pueden ser desbloqueados como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Si es necesario, la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero puede entonces ser separada como se describió anteriormente para proporcionar una mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000. Alternativamente, la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero puede ser separada antes del desbloqueo.

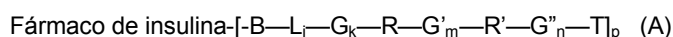
Las mezclas de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tienen un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 de acuerdo con estas formas de realización de la presente invención tienen preferiblemente propiedades mejoradas cuando se comparan con aquellas de mezclas polidisersas. Por ejemplo, una mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 tiene preferiblemente una actividad *in vivo* que es mayor que la actividad *in vivo* de una mezcla polidisersa de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene el mismo peso molecular promedio en número que la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000. Como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, el peso molecular promedio en número de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 y el peso promedio en número de la mezcla polidisersa se puede medir por diversos métodos incluyendo, pero no limitado a, cromatografía de exclusión por tamaño, tal como cromatografía de permeación en gel como se describe, por ejemplo, en H.R Allcock y F.W Lampe, *CONTEMPORARY POLYMER CHEMISTRY* 394-402 (2d. ed., 1991).

Como otro ejemplo, una mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 tiene preferiblemente una actividad *in vitro* que es mayor que la actividad *in vitro* de una mezcla polidisersa de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene el mismo peso molecular promedio en número que la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000. Como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, el peso molecular promedio en número de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 y el peso promedio en número de la mezcla polidisersa puede ser medido por diversos métodos incluyendo, pero no limitado a, cromatografía de exclusión por tamaño.

La actividad *in vitro* de una mezcla particular, puede ser medida por diversos métodos, como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Preferiblemente, la actividad *in vitro* se mide utilizando un microfisiómetro Cytosensor® comercialmente disponible a través de Molecular Devices Corporation de Sunnyvale, California. El microfisiómetro controla pequeños cambios en las tasas de acidificación extracelular en respuesta a un fármaco que se añade a las células cultivadas en un soporte TransWell. Esta respuesta es proporcional a la actividad de la molécula bajo estudio. Preferiblemente, la actividad *in vitro* de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 es al menos aproximadamente 5 por ciento mayor que la actividad *in vitro* de la mezcla polidisersa. Más preferiblemente, la actividad *in vitro* de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 es al menos aproximadamente 10 por ciento mayor que la actividad *in vitro* de la mezcla polidisersa.

Como aún otro ejemplo, una mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 tiene preferiblemente una mayor resistencia a la degradación por quimotripsina cuando se compara con la resistencia a la degradación por quimotripsina de una mezcla polidisersa de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene el mismo peso molecular promedio en número que la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000. La resistencia a la quimotripsina corresponde al porcentaje restante cuando la molécula que va a ser probada es digerida en quimotripsina usando un procedimiento similar a aquel expuesto en el Ejemplo 52 más adelante. Como lo entenderán aquellos ordinariamente

- capacitados en la técnica, el peso molecular promedio en número de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 y el peso promedio en número de la mezcla polidispersa pueden ser medidos por diversos métodos incluyendo, pero no limitado a, cromatografía de exclusión por tamaño. Preferiblemente, la resistencia a la degradación por quimotripsina de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 es al menos aproximadamente 10 por ciento mayor que la resistencia a la degradación por quimotripsina de la mezcla de polidispersa. Más preferiblemente, la resistencia a la degradación por quimotripsina de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 es al menos aproximadamente 20 por ciento mayor que la resistencia a la degradación por quimotripsina de la mezcla polidispersa.
- Como incluso otro ejemplo, una mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 tiene preferiblemente una variabilidad entre sujetos que es menor que la variabilidad entre sujetos de una mezcla polidispersa de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene el mismo peso molecular promedio en número que la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000. Como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, el peso molecular promedio en número de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 y el peso promedio en número de la mezcla polidispersa pueden ser medidos por diversos métodos, incluyendo, pero no limitado a, cromatografía de exclusión por tamaño. La variabilidad entre sujetos puede ser medida por diversos métodos, como entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. La variabilidad entre sujetos se calcula preferiblemente de la siguiente manera. El área bajo la curva de respuesta a la dosis (AUC) (es decir, el área entre la curva de respuesta a la dosis y un valor de línea base) se determina para cada sujeto. El AUC promedio para todos los sujetos se determina sumando las AUC de cada sujeto y dividiendo la suma por el número de sujetos. El valor absoluto de la diferencia entre el AUC del sujeto y el AUC promedio se determina luego para cada sujeto. Los valores absolutos de las diferencias obtenidas se suman luego para dar un valor que representa la variabilidad entre sujetos. Los valores más bajos representan las variabilidades más bajas entre sujetos y los valores más altos representan las variabilidades más altas entre sujetos. Preferiblemente, la variabilidad entre sujetos de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 es al menos aproximadamente 10 por ciento menor que la variabilidad entre sujetos de la mezcla polidispersa. Más preferiblemente, la variabilidad entre sujetos de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tiene un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 es al menos aproximadamente 25 por ciento menor que la variabilidad entre sujetos de la mezcla polidispersa.
- Las mezclas de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tienen un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 de acuerdo con formas de realización de la presente invención tienen preferiblemente dos o más de las propiedades descritas anteriormente. Más preferiblemente, las mezclas de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tienen un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 de acuerdo con formas de realización de la presente invención tienen tres o más de las propiedades descritas anteriormente. Lo más preferible, las mezclas de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que tienen un coeficiente de dispersidad mayor que 10.000 de acuerdo con formas de realización de la presente invención tienen las cuatro propiedades descritas anteriormente.
- De acuerdo con otras formas de realización de la presente invención, se proporciona una mezcla de conjugados en la cual cada conjugado incluye un fármaco de insulina acoplada a un oligómero, y tiene el mismo número de subunidades de polietilenglicol.
- Las mezclas de conjugados de fármaco de insulina-oligómero donde cada conjugado en la mezcla tiene el mismo número de subunidades de polietilenglicol pueden ser sintetizadas por diversos métodos. Por ejemplo, se sintetiza una mezcla de oligómeros que consiste de ácido carboxílico y polietilenglicol, donde cada oligómero en la mezcla tiene el mismo número de subunidades de polietilenglicol, poniendo en contacto una mezcla de ácido carboxílico con una mezcla de polietilenglicol donde cada molécula de polietilenglicol en la mezcla tiene el mismo número de subunidades de polietilenglicol bajo condiciones suficiente para proporcionar una mezcla de oligómeros donde cada oligómero en la mezcla tiene el mismo número de subunidades de polietilenglicol. Los oligómeros de la mezcla donde cada oligómero en la mezcla tiene el mismo número de subunidades de polietilenglicol se activan luego de tal modo que sean capaces de reaccionar con un fármaco de insulina para proporcionar un conjugado de fármaco de insulina-oligómero.
- De acuerdo con aún otras formas de realización de la presente invención, se proporciona una mezcla de conjugados en la cual cada conjugado tiene el mismo peso molecular y tiene la estructura de la Fórmula A:



en donde:

- B es una fracción de enlazamiento;

L es una fracción enlazadora;

G, G' y G'' son fracciones espaciadoras individualmente seleccionadas;

R es una fracción lipofílica y R' es una fracción de polialquilenglicol, o R' es la fracción lipofílica y R es la fracción de polialquilenglicol;

5 T es una fracción de terminación;

j, k, m y n son individualmente 0 o 1, y

p es un número entero entre 1 y el número de residuos nucleofílicos en el fármaco de insulina.

10 El polipropilenglicol uniforme puede ser sintetizado como se ilustra en las Figuras 11 a 13, que serán descritas a continuación. Como se ilustra en la Figura 11, se hace reaccionar 1,2-propanodiol 53 con un reactivo de bloqueo de alcohol primario para proporcionar un monómero 54 de extensión de alcohol secundario. El reactivo de bloqueo de alcohol primario pueden ser diversos reactivos de bloqueo de alcohol primario como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, compuestos de cloruro de sililo tales como cloruro de t-butildifenilsililo y cloruro de t-butildimetilsililo, y reactivos de esterificación tales como Ac_2O . Preferiblemente, el reactivo de bloqueo de alcohol primario es un reactivo de bloqueo de alcohol primario que no es sustancialmente reactivo con los alcoholes secundarios, tales como cloruro de t-butildifenilsililo o cloruro de t-butildimetilsililo. El monómero (54) de extensión de alcohol secundario puede reaccionar con cloruro de metanosulfonilo (MeSO_2Cl) para proporcionar un monómero de extensión de mesilato 55 de alcohol primario.

20 Alternativamente, el monómero 54 de extensión de alcohol secundario puede reaccionar con un reactivo de bloqueo de alcohol secundario para proporcionar el compuesto 56. El reactivo de bloqueo de alcohol secundario pueden ser diversos reactivos de alcohol secundario como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, cloruro de bencilo. El compuesto 56 puede reaccionar con un reactivo de desbloqueo para remover la fracción de bloqueo B_1 y proporcionar un monómero 57 de extensión de alcohol primario. El reactivo de desbloqueo B_1 se puede seleccionar de diversos reactivos de desbloqueo como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Cuando el alcohol primario ha sido bloqueado mediante la formación de un éster, el reactivo de desbloqueo B_1 es un reactivo de un reactivo de desesterificación, tal como una base (por ejemplo, carbonato de potasio). Cuando el alcohol primario ha sido bloqueado utilizando un cloruro de sililo, el reactivo de desbloqueo B_1 de es preferiblemente fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF). El monómero 57 de extensión de alcohol primario puede reaccionar con cloruro de metano sulfonilo para proporcionar un monómero de extensión de mesilato 58 de alcohol secundario.

30 El monómero 54 de extensión de alcohol primario y el monómero 57 de extensión de alcohol secundario pueden ser protegidos de la siguiente forma. El monómero 54 de extensión de alcohol secundario puede reaccionar con un reactivo de protección para proporcionar un compuesto 59. El reactivo de protección pueden ser diversos reactivos de protección como entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, haluros de alquilo tales como cloruro de metilo. El compuesto 59 puede reaccionar con un agente de desbloqueo B_1 como se describió anteriormente para proporcionar un monómero 60 de protección del alcohol primario. El monómero 60 de protección de alcohol primario puede reaccionar con cloruro de metanosulfonilo para proporcionar el monómero de protección de mesilato 61 de alcohol secundario. El monómero 57 de extensión de alcohol primario puede reaccionar con un reactivo de protección para proporcionar un compuesto 62. El reactivo de protección pueden ser diversos reactivos de protección como se describió anteriormente. El compuesto 62 puede reaccionar con un reactivo de desbloqueo B_2 para remover la fracción de bloqueo B_2 y proporcionar un monómero 63 de protección de alcohol secundario. El reactivo de desbloqueo B_2 pueden ser diversos agentes de desbloqueo como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, H_2 en presencia de un catalizador de paladio/carbón activado. El monómero de protección de alcohol secundario puede reaccionar con cloruro de metano sulfonilo para proporcionar un monómero de protección de mesilato 64 de alcohol primario. Aunque las realizaciones ilustradas en la Figura 11 muestran la síntesis de monómeros de protección, se entiende que se pueden llevar a cabo reacciones similares para proporcionar polímeros de protección.

45 En general, se pueden realizar extensiones de la cadena por reacción de un monómero o polímero de extensión de alcohol primario tal como el monómero 57 de extensión de alcohol primario con un monómero o polímero de extensión de mesilato de alcohol primario tal como el monómero de extensión de mesilato 55 de alcohol primario para proporcionar diversas cadenas de polipropileno uniformes, o mediante reacción de un monómero o polímero de extensión de alcohol secundario tal como el monómero 54 de extensión de alcohol secundario con un monómero o polímero de extensión de mesilato de alcohol secundario tal como el monómero de extensión de mesilato 58 de alcohol secundario.

50 Por ejemplo, en la Figura 13, el monómero de extensión de mesilato 55 de alcohol primario reacciona con el monómero 57 de extensión de alcohol primario para proporcionar un compuesto 65 dímero. Alternativamente, el monómero de

5 extensión de mesilato 58 de alcohol secundario puede hacerse reaccionar con el monómero 54 de extensión de alcohol secundario para proporcionar el compuesto 65 dímero. La fracción de bloqueo B₁ en el compuesto 65 dímero se puede remover usando un reactivo de desbloqueo B₁ como se describió anteriormente para proporcionar un dímero 66 de extensión de alcohol primario. El dímero 66 de extensión de alcohol primario puede hacerse reaccionar con cloruro de metano sulfonilo para proporcionar un dímero de extensión de mesilato 67 de alcohol secundario. Alternativamente, la fracción de bloqueo B₂ en el compuesto 65 dímero se puede remover usando el reactivo de desbloqueo B₂ como se describió anteriormente para proporcionar un dímero 69 de extensión de alcohol secundario. El dímero 69 de extensión de alcohol secundario se puede hacer reaccionar con cloruro de metano sulfonilo para proporcionar un dímero de extensión de mesilato 70 de alcohol primario.

10 Como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, el proceso de extensión de la cadena se puede repetir para lograr diversas otras longitudes de cadena. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 13, el dímero 66 de extensión de alcohol primario puede hacerse reaccionar con el dímero de extensión de mesilato 70 de alcohol primario para proporcionar un compuesto 72 tetrámero. Como se ilustra adicionalmente en la Figura 13, un esquema de reacción genérico de extensión de cadena implica la reacción del monómero o polímero 73 de extensión de alcohol primario con el monómero o polímero de extensión de mesilato 74 de alcohol primario para proporcionar el polímero 75 uniforme de polipropileno. Los valores de m y n pueden estar cada uno en el intervalo de 0 a 1000 o más. Preferiblemente, m y n son cada uno de 0 a 50. Aunque las formas de realización ilustradas en la Figura 13 muestran monómeros y polímeros de extensión de alcohol primario que se hacen reaccionar con monómeros y polímeros de extensión de mesilatos de alcohol primario, se entiende que se pueden llevar a cabo reacciones similares utilizando monómeros y/o polímeros de extensión de alcohol secundario y monómeros y/o polímeros de extensión de mesilatos de alcohol secundario.

25 Un extremo de un monómero o polímero de extensión de alcohol primario o un extremo de un monómero o polímero de extensión de mesilato de alcohol primario se puede hacer reaccionar con un monómero o polímero de protección de mesilato de alcohol primario o un monómero o polímero de protección de alcohol primario, respectivamente, para proporcionar una cadena uniforme protegida de polipropileno. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 12, el dímero de extensión de mesilato 70 de alcohol primario se hace reaccionar con el monómero 60 de protección de alcohol primario para proporcionar el trímero 71 de extensión de alcohol primario protegido/bloqueado. Como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, la fracción de bloqueo B₁ puede ser removida y el trímero de extensión de alcohol primario protegido resultante puede hacerse reaccionar con un monómero o polímero de extensión de mesilato de alcohol primario para extender la cadena del trímero 71 protegido.

30 Un extremo de un monómero o polímero de extensión de alcohol secundario o un extremo de un monómero o polímero de extensión de mesilato de alcohol secundario se pueden hacer reaccionar con un monómero o polímero de protección de mesilato de alcohol secundario o un monómero o polímero de protección de alcohol secundario, respectivamente, para proporcionar una cadena uniforme protegida de polipropileno. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 12, el dímero de extensión de mesilato 67 de alcohol secundario se hace reaccionar con el monómero 63 de protección de alcohol secundario para proporcionar el trímero 68 de extensión de alcohol primario protegido/bloqueado. La fracción de bloqueo B₂ puede ser removida como se describió anteriormente y trímero de extensión de alcohol secundario protegido resultante puede hacerse reaccionar con una unidad monomérica de extensión de mesilato de alcohol secundario para extender la cadena del trímero 68 protegido. Aunque las síntesis ilustradas en la Figura 12 muestran la reacción de un dímero con un monómero protegido para proporcionar un trímero, se entiende que el proceso de protección se puede realizar en cualquier punto en la síntesis de una fracción uniforme de polipropilenglicol, o, alternativamente, se pueden proporcionar las fracciones uniformes de polipropilenglicol que no están protegidas. Aunque las realizaciones ilustradas en la Figura 12 muestran la protección de un oligómero de polibutileno mediante síntesis con un monómero de protección, se entiende que los oligómeros de polibutileno de la presente invención puede ser protegidos directamente (es decir, sin la adición de un monómero de protección) usando un reactivo de protección como se describió anteriormente en la Figura 11.

La fracción de enlazamiento, B, pueden ser diversas fracciones de enlazamiento como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Las fracciones de enlazamiento se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste de un enlace(s) covalente(s), fracciones de éster, fracciones de carbonato, fracciones de carbamato, fracciones de amida y fracciones de amina secundaria.

50 La variable p es un número entero de 1 hasta el número de residuos nucleofílicos en el fármaco de insulina. Cuando p es mayor que 1, más de un oligómero (es decir, una pluralidad de oligómeros) se acopla al fármaco. De acuerdo con estas realizaciones de la presente invención, los oligómeros en la pluralidad son los mismos. Cuando una pluralidad de oligómeros se acopla al fármaco de insulina, puede ser preferible acoplar uno o más de los oligómeros al fármaco de insulina con enlaces hidrolizables y acoplar uno o más de los oligómeros al fármaco de insulina con enlaces no hidrolizables. Alternativamente, todos los enlaces el acoplamiento de la pluralidad de oligómeros al fármaco de insulina pueden ser hidrolizables, pero tienen diversos grados de capacidad de hidrólisis de tal manera que, por ejemplo, se remueven rápidamente uno o más de los oligómeros del fármaco de insulina por hidrólisis en el organismo y se remueven lentamente uno o más de los oligómeros del fármaco de insulina por hidrólisis en el organismo.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una mezcla de conjugados de acuerdo con realizaciones de la presente invención. Las mezclas de conjugados de fármaco de insulina-oligómero descritas anteriormente se pueden formular para administración en un portador farmacéutico de acuerdo con técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* (9ª Ed. 1995). En la fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con realizaciones de la presente invención, la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero normalmente se mezcla con, entre otras cosas, un portador farmacéuticamente aceptable. El portador, por supuesto, debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente de la composición farmacéutica y no debe ser perjudicial para el sujeto. El portador puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y se formula preferiblemente con la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, un comprimido, que puede contener aproximadamente desde 0,01 o 0,5% hasta aproximadamente 95% o 99% en peso de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse por cualquiera de las técnicas bien conocidas de farmacia, incluyendo, pero no limitado a, la mezcla de los componentes, incluyendo opcionalmente uno o más ingredientes accesorios.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con realizaciones de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, tópica, por inhalación (por ejemplo, por medio de un aerosol), bucal (por ejemplo, sublingual), vaginal, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarticular, intrapleural, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, o intravenosa), tópica (es decir, tanto superficies mucosas como de la piel, incluyendo superficies de las vías respiratorias) y administración transdérmica, aunque la ruta más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad de la condición a tratar y de la naturaleza de la mezcla particular de conjugados de fármaco de insulina-oligómero que se está utilizando.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración oral pueden presentarse en unidades discretas, tales como cápsulas, pastillas, grageas o comprimidos, cada una conteniendo una cantidad predeterminada de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión de aceite en agua o agua en aceite. Tales formulaciones se pueden preparar por cualquier método adecuado de farmacia que incluye la etapa de poner en asociación la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero y un portador adecuado (que puede contener uno o más ingredientes accesorios como se ha señalado anteriormente). En general, la composición farmacéutica de acuerdo con formas de realización de la presente invención se prepara mezclando en forma íntima y uniforme la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero con un líquido o portador sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, dando forma a la mezcla resultante. Por ejemplo, un comprimido puede prepararse comprimiendo o moldeando un polvo o gránulos que contienen la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar por compresión, en una máquina adecuada, la mezcla en una forma de flujo libre, tal como un polvo o gránulos opcionalmente mezclados con un agente(s) aglutinante(s), lubricante(s), diluyente(s) inerte(s), y/o surfactante(s) / dispersante(s). Los comprimidos moldeados pueden elaborarse por moldeo, en una máquina adecuada, el compuesto en polvo humedecido con un aglutinante líquido inerte.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración bucal (sublingual) incluyen grageas que comprenden la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero en una base saborizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; y pastillas que comprenden la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con realizaciones de la presente invención adecuadas para administración parenteral comprenden soluciones de inyección acuosas y no acuosas estériles de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero, cuyas preparaciones son preferiblemente isotónicas con la sangre del receptor pretendido. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostáticos y solutos que vuelven a la composición isotónica con la sangre del receptor pretendido. Las suspensiones acuosas y no acuosas estériles pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones pueden presentarse en contenedores de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas selladas y viales, y se pueden almacenar en forma secada por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyección inmediatamente antes de uso. Soluciones para inyección extemporánea y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente. Por ejemplo, puede proporcionarse una composición inyectable estéril estable, que comprende una mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero en una forma de dosificación unitaria en un contenedor sellado. La mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero se proporciona en la forma de un liofilizado que puede ser reconstituido con un portador adecuado farmacéuticamente aceptable para formar una composición líquida adecuada para inyección de la misma en un sujeto. La forma de dosificación unitaria típicamente comprende desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 10 gramos de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero. Cuando la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero es sustancialmente insoluble en agua, se puede emplear una cantidad suficiente de agente emulsionante que sea fisiológicamente aceptable en cantidad suficiente para emulsionar la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero en un portador acuoso. Uno de tales agentes emulsionantes útiles es fosfatidil colina.

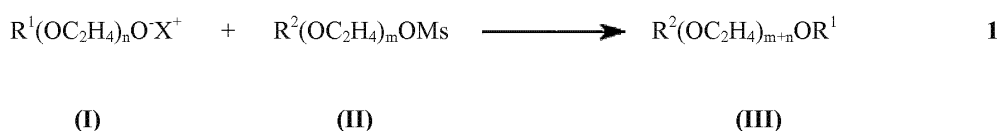
Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal se presentan preferiblemente como supositorios de dosis unitaria. Estos se pueden preparar mezclando la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero con uno o más portadores sólidos convencional, por ejemplo, manteca de cacao, y luego darle forma a la mezcla resultante.

- 5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para aplicación tópica a la piel preferiblemente adoptan la forma de un ungüento, crema, loción, pasta, gel, atomizador, aerosol, o aceite. Los portadores que pueden usarse incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos y combinaciones de dos o más de los mismos.

- 10 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Las composiciones adecuada para la administración transdérmica también pueden ser suministradas por iontoforesis (véase, por ejemplo, Pharmaceutical Research 3 (6): 318 (1986)) y típicamente toman la forma de una solución acuosa opcionalmente regulada de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero. Las formulaciones adecuadas comprenden citrato o regulador bis\tris (pH 6) o etanol/agua y contienen de 0,1 a 0,2 M de ingrediente activo.

- 15 Los métodos de tratamiento de una deficiencia de insulina en un sujeto que requiera de tal tratamiento incluye la administración de una cantidad efectiva de tales composiciones farmacéuticas. La cantidad efectiva de cualquier mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero variará algo de una mezcla a otra, y de un sujeto otro, y dependerá de factores tales como la edad y la condición del sujeto y de la vía de administración. Tales dosis se pueden determinar de acuerdo con procedimientos farmacológica de rutina conocidos aquellos ordinariamente capacitados en la técnica.
- 20 Como propuesta general, una dosis de aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 50 mg/kg tendrá eficacia terapéutica, calculando todos los pesos con base en el peso de la mezcla de conjugados de fármaco de insulina-oligómero. Los problemas de toxicidad en el nivel más alto pueden restringir las dosis intravenosas hasta un nivel inferior, tal como hasta aproximadamente 10 mg/kg, estando todos los pesos calculados con base en el peso de la base activa. Una dosis de aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg puede ser empleada para administración oral. Típicamente, una dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg hasta 5 mg/kg puede ser emplear para inyección intramuscular. La frecuencia de administración es usualmente de, una, dos, o tres veces por día o según sea necesario para controlar la condición. Alternativamente, los conjugados de fármaco-oligómero pueden ser administrados mediante infusión continua. La duración del tratamiento depende del tipo de deficiencia de insulina que está siendo tratada y puede ser durante toda la vida del sujeto.

- 30 Una mezcla sustancialmente monodispersa de polímeros que comprende fracciones de polietilenglicol se proporciona como se ilustra en la reacción 1:



- 35 R¹ es H o una fracción lipofílica. R¹ es preferiblemente H, alquilo, alquil arilo, una fracción aromático, una fracción de ácido graso, un éster de una fracción de ácido graso, colesterol o adamantilo. R¹ es más preferiblemente H, alquilo inferior, o una fracción aromática. R¹ es más preferiblemente H, metilo, o bencilo.

En la Fórmula I, n es de 1 a 25. Preferiblemente n es de 1 a 6.

X⁺ es un ion positivo. Preferiblemente X⁺ es cualquier ión positivo en un compuesto, tal como una base fuerte, que es capaz de ionizar una fracción hidroxilo sobre PEG. Los ejemplos de iones positivos incluyen, pero no se limitan a, iones sodio, iones potasio, iones litio, iones cesio y iones talio.

- 40 R² es H o una fracción lipofílica. R² es preferiblemente alquilo, lineal o ramificado, alquil arilo, una fracción aromático, un fracción de ácido graso, o un éster de una fracción de ácido graso. R² es, más preferiblemente alquilo inferior, bencilo, una fracción de ácido graso que tiene 1 a 24 átomos de carbono, o un éster de una fracción de ácido graso que tiene 1 a 24 átomos de carbono. R² es lo más preferible metilo, una fracción de ácido graso que tiene 1 a 18 átomos de carbono o un etil éster de una fracción de ácido graso que tiene 1 a 18 átomos de carbono.

- 45 En la Fórmula II, m es de 1 a 25. Preferiblemente m es de 1 a 6.

Ms es una fracción de mesilato (es decir, CH₃S(O₂)⁻).

Como se ilustra en la reacción 1, una mezcla de compuestos que tiene la estructura de la Fórmula I reacciona con una mezcla de compuestos que tiene la estructura de la Fórmula II para proporcionar una mezcla de polímeros que

comprende fracciones de polietilenglicol y que tiene la estructura de la Fórmula III. La mezcla de compuestos que tienen la estructura de la Fórmula I es una mezcla sustancialmente monodispersa. Preferiblemente, al menos aproximadamente 96, 97, 98 o 99 por ciento de los compuestos en la mezcla de compuestos de la fórmula I tienen el mismo peso molecular, y, más preferiblemente, la mezcla de compuestos de la Fórmula I es una mezcla monodispersa. La mezcla de compuestos de la Fórmula II es una mezcla sustancialmente monodispersa. Preferiblemente, al menos aproximadamente 96, 97, 98 o 99 por ciento de los compuestos en la mezcla de compuestos de Fórmula II tienen el mismo peso molecular, y, más preferiblemente, la mezcla de compuestos de la Fórmula II es una mezcla monodispersa. La mezcla de compuestos de la Fórmula III es una mezcla sustancialmente monodispersa. Preferiblemente, al menos aproximadamente 96, 97, 98 o 99 por ciento de los compuestos en la mezcla de compuesto de la Fórmula III tienen el mismo peso molecular. Más preferiblemente, la mezcla de compuestos de Fórmula III es una mezcla monodispersa.

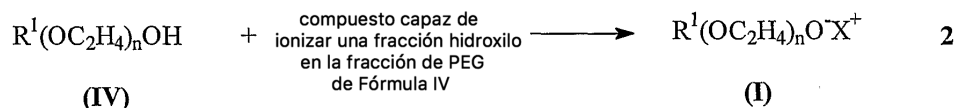
La reacción 1 se lleva a cabo preferiblemente entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 40°C, se lleva a cabo más preferiblemente entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 35°C, y se lleva a cabo lo más preferiblemente a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

La reacción 1 puede llevarse a cabo durante diversos períodos de tiempo como lo comprenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. La reacción 1 se lleva a cabo preferiblemente durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 0,25, 0,5 o 0,75 horas y aproximadamente 2, 4 u 8 horas.

La reacción 1 se lleva a cabo preferiblemente en un disolvente aprótico tal como, pero no limitado a, N,N-dimetilacetamida (DMA), N,N-dimetilformamida (DMF), sulfóxido de dimetilo (DMSO), triamida hexametilfosfórica, tetrahidrofurano (THF), dioxano, éter dietílico, metil t-butil éter (MTBE), tolueno, benceno, hexano, pentano, N-metilpirrolidinona, tetrahidronaftaleno, decahidronaftaleno, 1,2-diclorobenceno, 1,3-dimetil-2-imidazolidinona, o una mezcla de los mismos. Más preferiblemente, el disolvente es DMF, DMA o tolueno.

La relación molar de los compuesto de Fórmula I con respecto al compuesto de Fórmula II es preferiblemente mayor a aproximadamente 1:1. Más preferiblemente, la relación molar es al menos aproximadamente de 2:1. Mediante el suministro de un exceso de los compuestos de Fórmula I, se puede asegurar que sustancialmente todos los compuestos de Fórmula II reaccionan, lo que puede ayudar en la recuperación de los compuestos de Fórmula III como se discute a más adelante.

Los compuestos de Fórmula I se preparan preferiblemente como se ilustra en la reacción 2:



R¹ y X⁺ son como se describió anteriormente y la mezcla de compuestos de Fórmula IV es sustancialmente monodispersa; preferiblemente, al menos aproximadamente 96, 97, 98 o 99 por ciento de los compuestos en la mezcla de compuestos de Fórmula IV tienen el mismo peso molecular; y, más preferiblemente, la mezcla de compuestos de Fórmula IV es una mezcla monodispersa.

Diversos compuestos capaces de ionizar una fracción hidroxilo en la fracción de PEG del compuesto de Fórmula IV serán entendidos por aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. El compuesto capaz de ionizar una fracción hidroxilo es preferiblemente una base fuerte. Más preferiblemente, el compuesto capaz de ionizar una fracción hidroxilo se selecciona del grupo que consiste de hidruro de sodio, hidruro de potasio, t-butoxido sódico, t-butoxido de potasio, butil litio (BuLi), y diisopropilamina de litio. El compuesto capaz de ionizar una fracción hidroxilo es más preferiblemente hidruro de sodio.

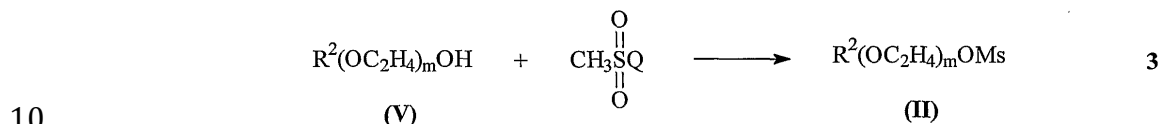
La relación molar del compuesto capaz de ionizar una fracción hidroxilo en la fracción de PEG del compuesto de Fórmula IV con respecto al compuesto de Fórmula IV es preferiblemente al menos aproximadamente 1:1, y es más preferiblemente al menos aproximadamente 2:1. Proporcionando un exceso del compuesto capaz de ionizar la fracción de hidroxilo, se asegura que sustancialmente todos los compuestos de Fórmula IV reaccionan para proporcionar los compuestos de Fórmula I. Por lo tanto, las dificultades de separación, que pueden presentarse si tanto los compuestos de Fórmula IV como los compuestos de Fórmula I estuvieran presentes en la mezcla del producto de reacción, podrían ser evitadas.

La reacción 2 se lleva a cabo preferiblemente entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 40°C, se lleva a cabo más preferiblemente entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 35°C, y se lleva a cabo más preferiblemente entre aproximadamente 0°C y temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

La reacción 2 puede llevarse a cabo durante diversos períodos de tiempo como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. La reacción 2 se lleva a cabo preferiblemente durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 0,25, 0,5 o 0,75 horas y aproximadamente 2, 4 u 8 horas.

- 5 La reacción 2 se lleva a cabo preferiblemente en un disolvente aprótico tal como, pero no limitado a, N,N-dimetilacetamida (DMA), N,N-dimetilformamida (DMF), sulfóxido de dimetilo (DMSO), triamida hexametilfosfórica, tetrahidrofurano (THF), dioxano, éter dietílico, metil t-butil éter (MTBE), tolueno, benceno, hexano, pentano, N-metilpirrolidinona, diclorometano, cloroformo, tetrahidronaftaleno, decahidronaftaleno, 1,2-diclorobenceno, 1,3-dimetil-2-imidazolidinona, o una mezcla de los mismos. Más preferiblemente, el disolvente es DMF, DMA o tolueno.

Los compuestos de Fórmula II se preparan preferiblemente como se ilustra en la reacción 3:



R^2 y Ms son como se describió anteriormente y el compuesto de Fórmula V está presente como una mezcla sustancialmente monodispersa de compuestos de Fórmula V; preferiblemente al menos aproximadamente 96, 97, 98 o 99 por ciento de los compuestos en la mezcla de compuestos de Fórmula V tienen el mismo peso molecular; y, más preferiblemente, la mezcla de compuestos de Fórmula V es una mezcla monodispersa.

- 15 Q es un haluro, preferiblemente cloruro o fluoruro.

$\text{CH}_3\text{S}(\text{O}_2)\text{Q}$ es haluro de metanosulfonilo. El haluro de metanosulfonilo es preferiblemente cloruro de metanosulfonilo o fluoruro de metanosulfonilo. Más preferiblemente, el haluro de metanosulfonilo es cloruro de metanosulfonilo.

- 20 La relación molar del haluro de metanosulfonilo con respecto al compuesto de Fórmula V es preferiblemente mayor que aproximadamente 1:1, y es más preferiblemente al menos aproximadamente 2:1. Mediante el suministro de un exceso del haluro de metanosulfonilo, se asegura que sustancialmente todos los compuestos de Fórmula V reaccionan para proporcionar los compuestos de Fórmula II. Por lo tanto, las dificultades de separación, que pueden presentarse si tanto los compuestos de Fórmula V como los compuestos de Fórmula II estuvieran presentes en la mezcla del producto de reacción, podrían ser evitadas.

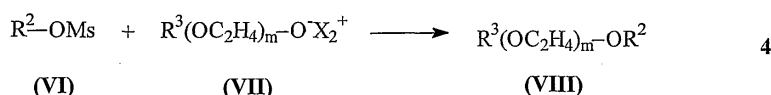
- 25 La reacción 3 se lleva a cabo preferiblemente entre aproximadamente -10°C y aproximadamente 40°C , se lleva a cabo más preferiblemente entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 35°C , y se lleva a cabo lo más preferiblemente entre aproximadamente 0°C y temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

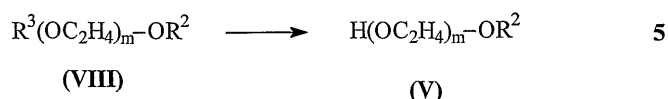
La reacción 3 puede llevarse a cabo durante diversos períodos de tiempo como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. La reacción 3 se lleva a cabo preferiblemente durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 0,25, 0,5 o 0,75 horas y aproximadamente 2,4 u 8 horas.

- 30 La reacción 3 se lleva a cabo preferiblemente en presencia de una amina alifática, que incluye, pero no limitado a, mono-metilamina, dimetilamina, trimetilamina, monoetilamina, dietilamina, trietilamina, monoisopropilamina, diisopropilamina, mono-n-butilamina, di-n-butilamina, tri-n-butilamina, monociclohexilamina, diciclohexilamina, o mezclas de las mismas. Más preferiblemente, la amina alifática es una amina terciaria tal como trietilamina.

- 35 Como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, diversas mezclas sustancialmente monodispersas de compuestos de fórmula V están disponibles comercialmente. Por ejemplo, cuando R^2 es H o metilo, los compuestos de Fórmula V son compuestos PEG o mPEG, respectivamente, que están disponibles comercialmente a través de Aldrich de Milwaukee, Wisconsin; Fluka de Suiza, y/o TCI America de Portland, Oregon.

- 40 Cuando R^2 es una fracción lipofílica tal como, por ejemplo, alquilo superior, ácido graso, un éster de un ácido graso, colesterilo, o adamantilo, los compuestos de Fórmula V se pueden ser suministrados por diversos métodos, como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Los compuestos de Fórmula V son proporcionados preferiblemente como sigue:





R^2 es una fracción lipofílica, preferiblemente alquilo superior, éster de ácido graso, colesterilo, o adamantilo, más preferiblemente un éster de alquilo inferior de un ácido graso, y lo más preferiblemente un etil éster de un ácido graso que tiene de 1 a 18 átomos de carbono.

5 R^3 es H, bencilo, trítilo, tetrahidropirano, u otros grupos protectores de alcohol como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica.

X_2^+ es un ion positivo como se describió anteriormente con respecto a X^+ .

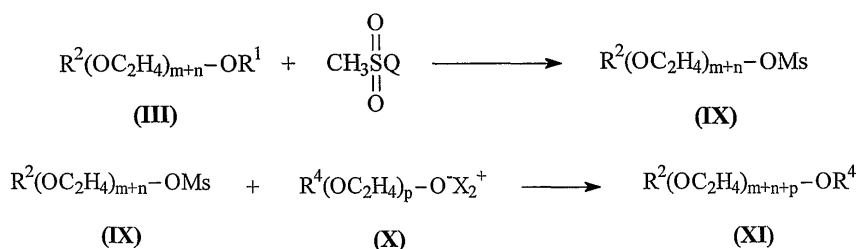
El valor de m es como se describió anteriormente.

10 Con respecto a la reacción 4, una mezcla de compuestos de Fórmula VI reacciona con una mezcla de compuestos de la fórmula VII bajo condiciones de reacción similares a aquellas descritas anteriormente con referencia a la reacción 1. La mezcla de compuestos de la fórmula VI es una mezcla sustancialmente monodispersa. Preferiblemente, al menos aproximadamente 96, 97, 98 o 99 por ciento de los compuestos en la mezcla de compuestos de la fórmula VI tienen el mismo peso molecular. Más preferiblemente, la mezcla de compuestos de fórmula VI es una mezcla monodispersa. La mezcla de compuestos de la fórmula VII es una mezcla sustancialmente monodispersa. Preferiblemente, al menos aproximadamente 96, 97, 98 o 99 por ciento de los compuestos en la mezcla de los compuestos de la fórmula VII tienen el mismo peso molecular. Más preferiblemente, la mezcla de compuestos de fórmula VII es una mezcla monodispersa.

20 Con respecto a la reacción 5, el compuesto de fórmula VIII se puede hidrolizar para convertir la fracción R^3 en un alcohol por diversos métodos como lo entenderán aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Cuando R^3 es bencilo o trítilo, la hidrólisis se lleva a cabo preferiblemente utilizando H_2 en presencia de un catalizador de carbón-paladio como lo saben aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Por supuesto, cuando R^3 es H, la reacción 5 no innecesaria.

El compuesto de fórmula VI puede estar comercialmente disponible o ser proporcionado como se describió anteriormente con referencia a la reacción 3. El compuesto de la fórmula VII puede ser proporcionado como se describió anteriormente con referencia a la reacción 2.

25 Las mezclas sustancialmente monodispersas de polímeros que comprenden fracciones de PEG y que tienen la estructura de fórmula III anterior pueden reaccionar adicionalmente con otros polímeros sustancialmente monodispersos que comprenden fracciones de PEG con el fin de extender la cadena de PEG. Por ejemplo, se puede emplear el siguiente esquema:



30 Ms, m y n son como se describió anteriormente con referencia a la reacción 1; p es similar a n y m, y X_2^+ es similar a X^+ como se describió anteriormente con referencia a la reacción 1. Q es como se describió anteriormente con referencia a la reacción 3. R^2 es como se describió anteriormente con referencia a la reacción 1 y es preferiblemente alquilo inferior. R^1 es H. La reacción 6 se lleva a cabo preferiblemente en una forma similar a aquella descrita anteriormente con referencia a la reacción 3. La reacción 7: se lleva a cabo preferiblemente en una forma similar a aquella descrita anteriormente con referencia a la reacción 1. Preferiblemente, al menos aproximadamente 96, 97, 98 o 99 por ciento de los compuestos en la mezcla de compuestos de fórmula III tienen el mismo peso molecular, y, más preferiblemente, la mezcla de compuestos de la fórmula III es una mezcla monodispersa. La mezcla de compuestos de la fórmula X es una mezcla sustancialmente monodispersa. Preferiblemente, al menos aproximadamente 96, 97, 98 o 99 por ciento de los compuestos en la mezcla de los compuestos de la fórmula X tienen el mismo peso molecular, y, más preferiblemente, la mezcla de compuestos de la fórmula X es una mezcla monodispersa.

40 Un procedimiento de acuerdo con las realizaciones de la presente invención se ilustra por medio del esquema mostrado en la Figura 1, el cual será descrito a continuación. La síntesis de oligómeros que contienen polietilenglicol sustancialmente monodispersos comienza con la preparación del éter de monobencilo (1) de un polietilenglicol

sustancialmente monodisperso. Un exceso de un polietilenglicol sustancialmente monodisperso comercialmente disponible reacciona con cloruro de bencilo en presencia de hidróxido de sodio acuoso como lo describen Coudert y colaboradores (Synthetic Communications, 16(1): 19-26 (1986)). Se prepara luego la sal de sodio de 1 mediante la adición de NaH, y se permite que esta sal de sodio reaccione con el mesilato sintetizado a partir del éster de un ácido hidroxialcanoico (2). El producto (3) del desplazamiento del mesilato es desbencilado mediante la hidrogenación catalítica para obtener el alcohol (4). El mesilato (5) de este alcohol puede ser preparado mediante adición de cloruro de metanosulfonilo y usado como el electrófilo en la reacción con la sal de sodio del éter de monometilo de un derivado de polietilenglicol sustancialmente monodisperso, extendiendo así la porción de polietilenglicol del oligómero hasta la longitud deseada, obteniendo el éster (6) alargado. El éster puede ser hidrolizado hasta el ácido (7) en una base acuosa y transformado en el éster (8) activado por reacción con una carbodiimida y N-hidroxisuccinimida. Aunque el oligómero ilustrado en la Figura 1 se activa usando N-hidroxisuccinimida, se entiende que se pueden usar diversos otros reactivos para activar oligómeros de la presente invención incluyendo, pero no limitados a, cloroformatos activos de fenilo tales como cloroformiato de para-nitrofenilo, cloroformiato de fenilo, y 3,4-fenildicloroformato; tresilación; y formación de acetal.

Aún con referencia a la Figura 1, q es de 1 a 24. Preferiblemente, q es de 1 a 18, y q es más preferiblemente de 4 a 16. R⁴ es una fracción capaz de experimentar hidrólisis para proporcionar el ácido carboxílico. R⁴ es preferiblemente alquilo inferior y es más preferiblemente etilo. Las variables n y m son como se describió anteriormente con referencia a la reacción 1.

Todas las materias de partida utilizados en los procedimientos descritos en la presente invención se encuentran o bien comercialmente disponibles o pueden ser preparados por métodos conocidos en la técnica utilizando materiales de partida comercialmente disponibles.

La presente invención será descrita a continuación con referencia a los siguientes ejemplos. Se apreciará que estos ejemplos son para los propósitos de ilustración de aspectos de la presente invención, y no limitan el alcance de la invención como se define mediante las reivindicaciones.

25 Ejemplos

Ejemplos 1 a 10

Las reacciones en los ejemplos: 1 a 10 se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno con agitación magnética, a menos que se especifique de otra manera. "Elaboración" denota extracción con un disolvente orgánico, lavado de la fase orgánica con solución saturada de NaCl, secado (MgSO₄), y evaporación (evaporador rotatorio). Se realizó cromatografía en capa delgada con placas de vidrio Merck recubiertas previamente con gel de sílice a 60°F - 254 y se visualizaron las manchas mediante vapor de yodo. Todos los espectros de masas fueron realizados en Macromolecular Resources Colorado State University, CO y reportados en forma de m/z, (intensidad relativa). Los análisis elementales y puntos de fusión fueron realizados por Galbraith Laboratories, Inc., Knoxville, TN. Los ejemplos 1-10 se refieren al esquema ilustrado en la Figura 2.

35 Ejemplo 1

8-Metoxi-1-(metilsulfonil)oxi-3,6-dioxaoctano (9)

Se enfrió una solución de moléculas de monometil éter de trietilenglicol no polidispersas (4.00 mL, 4.19 g, 25.5 mmol) y trietilamina (4.26 mL, 3.09 g, 30.6 mmol) en diclorometano seco (50 mL) en un baño de hielo y se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota una solución de cloruro de metanosulfonilo (2.37 mL, 3.51 g, 30.6 mmol) en diclorometano seco (20 mL) a partir de un embudo de adición. Diez minutos después de completada la adición de cloruro, se removió la mezcla de reacción del baño de hielo y se dejó llegar a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla durante una hora adicional, en cuyo tiempo TLC (CHCl₃ con MeOH al 15% como el eluyente) mostró que no quedaba monometil éter de trietilenglicol.

Se diluyó la mezcla de reacción con otros 75 mL de diclorometano y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ saturado, agua y salmuera. Se secaron los compuestos orgánicos sobre Na₂SO₄, se filtraron y concentraron al vacío para producir una mezcla no polidispersa de compuestos 9 como un aceite claro (5.31 g, 86%).

Ejemplo 2

Monometil éter de etilenglicol (10) (m = 4, 5, 6)

A una solución agitada del compuesto 11 no polidisperso (35.7 mmol) en DMF seco (25.7 mL), bajo N₂ se le añadió en porciones, una dispersión al 60% de NaH en aceite mineral, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. A esta sal 12 se le añadió una solución de mesilato 9 no polidispersa (23.36) en DMF seco (4 mL) en una sola

porción, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3.5 horas. Se controló el progreso de la reacción por TLC ($\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3$ al 12%). Se diluyó la mezcla de reacción con una cantidad igual de HCl 1 N, y se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 ml) y se descartó. La extracción de la solución acuosa y la elaboración produjeron un polímero 10 no polidisperso (rendimiento del 82-84%).

5 Ejemplo 3

3,6,9,12,15,18,21-Hegtaoxadocosanol (10) ($m = 4$)

Aceite; Rf 0.46 (metanol:cloroformo = 3:22); EM m/z calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{O}_8$ 340,21 ($M^+ + 1$), encontrado 341,2.

Ejemplo 4

3,6,9,12,15,18,21,24-Octaoxapentacosanol (10) ($m = 5$)

10 Aceite; Rf 0.43 (metanol:cloroformo = 6:10); EM m/z calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{36}\text{O}_9$ 384,24 ($M^+ + 1$), encontrado 385,3.

Ejemplo 5

3,6,9,12,15,18,21,24,27-Nonaoxaoctacosanol (10) ($m = 6$)

Aceite; Rf 0.42 (metanol:cloroformo = 6:10); EM m/z calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{O}_{10}$ 428,26 ($M^+ + 1$), encontrado 429,3.

Ejemplo 6

15 20-metoxi-1-(metilsulfonyl)oxi-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosano (14)

Se obtuvo el compuesto 14 no polidisperso con un rendimiento cuantitativo a partir del alcohol 13 ($m = 4$) y cloruro de metanosulfonyl como se describió para 9, como un aceite; Rf 0.4 (acetato de etilo: acetonitrilo = 1:5); EM m/z calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{37}\text{O}_{10}$ 433,21 ($M^+ + 1$), encontrado 433,469.

Ejemplo 7

20 Monometil éter de etilenglicol (15) ($m = 3, 4, 5$)

Los compuestos 15 no polidispersos se prepararon a partir de un diol mediante el uso del procedimiento descrito anteriormente para el compuesto 10.

Ejemplo 8

3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-Decaoxahenoicosanol (15) ($m = 3$)

25 Aceite; Rf 0,41 (metanol:cloroformo = 6:10); EM m/z calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{O}_{11}$ 472,29 ($M^+ + 1$), encontrado 472,29.

Ejemplo 9

3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-Unecaoxatetratricosanol (15) ($m = 4$)

Aceite; Rf 0,41 (metanol:cloroformo = 6:10); EM m/z calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{48}\text{O}_{12}$ 516,31 ($M^+ + 1$), encontrado 516,31.

Ejemplo 10

30 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-Dodecaoxaheptatricosanol (15) ($m = 5$)

Aceite; Rf 0,41 (metanol:cloroformo = 6:10); EM m/z calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{52}\text{O}_{13}$ 560,67 ($M^+ + 1$), encontrado 560,67.

Los ejemplos 11 a 18 se refieren en el esquema ilustrado en la Figura 3.

Ejemplo 11

Monobencil éter de hexaetilenglicol (16)

Se añadió lentamente una solución acuosa de hidróxido de sodio preparada mediante la disolución de 3,99 g (100 mmol) de NaOH en 4 ml de agua a hexaetilenglicol no polidisperso (28,175 g, 25 ml, 100 mmol). Se añadió cloruro de bencilo (3,9 g, 30,8 mmol, 3,54 ml) y se calentó la mezcla de reacción con agitación a 100°C por 18 horas. Se enfrió luego la mezcla de reacción, se diluyó con salmuera (250 ml) y se extrajo con cloruro de metileno (200 ml x 2). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera una vez, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío hasta obtener un aceite de color marrón oscuro. Se purificó la mezcla del producto mediante cromatografía instantánea (gel de sílice, gradiente de elución: acetato de etilo hasta acetato de etilo/metanol en proporción 9:1) para producir 8,099 g (70 %) del producto no polidisperso 16 como un aceite de color amarillo.

Ejemplo 12

10 6-metilsulfoniloxihexanoato de etilo (17)

Se enfrió una solución de 6-hidroxihexanoato de etilo no polidisperso (50,76 ml, 50,41 g, 227 mmol) en diclorometano seco (75 ml) en un baño con hielo y se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió trietilamina (34,43 ml, 24,99 g, 247 mmol). Se añadió gota a gota una solución de cloruro de metanosulfonilo (19,15 ml, 28,3 g, 247 mmol) en diclorometano seco (75 ml) a partir de un embudo de adición. Se agitó la mezcla por tres y media horas, permitiendo que bajara lentamente la temperatura hasta temperatura ambiente a medida que se fundía el baño de hielo. Se filtró la mezcla a través de gel de sílice, y se lavó el filtrado sucesivamente con agua, solución saturada de NaHCO₃, agua y salmuera. Se secaron las capas orgánicas sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío hasta obtener un aceite de color amarillo pálido. La purificación final del producto sin purificar se logró mediante cromatografía instantánea (gel de sílice, hexanos/acetato de etilo en proporción 1:1) para producir el producto no polidisperso (46,13 g, 85%) como un aceite claro incoloro. FAB EM: m/e 239 (M+H), 193 (M-C₂H₅O).

Ejemplo 13

Etil éster del ácido 6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-benciloxietoxi)etoxi]etoxi}-etoxi)-etoxi]-hexanoico (18)

Se suspendió hidruro de sodio (3,225 g o una dispersión en aceite al 60%, 80,6 mmol) en 80 ml de tolueno anhidro, se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno y se enfrió en un baño con hielo. Se añadió una solución del alcohol 16 no polidisperso (27,3 g, 73,3 mmol) en 80 ml de tolueno seco a la suspensión de NaH. Se agitó la mezcla a 0°C por 30 minutos, se dejó que llegara a temperatura ambiente y se agitó por otras cinco horas, durante las cuales la mezcla se volvió una solución de color marrón claro. Se añadió el mesilato 17 no polidisperso (19,21 g, 80,6 mmol) en 80 ml de tolueno seco a la mezcla de NaH/alcohol, y se agitaron las soluciones combinadas a temperatura ambiente por tres días. La mezcla de reacción se detuvo con 50 ml de metanol y se filtró a través de alúmina básica. Se concentró el filtrado al vacío y se purificó mediante cromatografía instantánea (gel de sílice, gradiente de elución: acetato de etilo/hexanos con respecto a acetato de etilo en proporción 3/1) para producir el producto no polidisperso como un aceite de color amarillo pálido (16,52 g, 44%) FAB EM: m/e 515 (M+H).

Ejemplo 14

Etil éster del ácido 6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etoxi}-etoxi)-etoxi]-hexanoico (19)

El éter bencilico no polidisperso 18 (1,03 g, 2,0 mmol) se disolvió en 25 ml de etanol. A esta solución se le añadieron 270 mg de Pd/C al 10%, y se colocó la mezcla bajo una atmósfera de hidrógeno y se agitó por cuatro horas, después del cual la TLC mostró la desaparición completa del material de partida. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite 545 para remover el catalizador, y el filtrado se concentró al vacío para producir el compuesto no polidisperso del título como un aceite claro (0,67 g, 79%). FAB EM: m/e 425 (M+H), 447 (M+Na).

40 Ejemplo 15

Etil éster del ácido 6-{2-[2-(2-{2-[2-(2-metilsulfoniletoxi)etoxi]etoxi}-etoxi)-etoxi]-hexanoico (20)

El alcohol no polidisperso 19 (0,835 g, 1,97 mmol) se disolvió en 3,5 ml de diclorometano seco y se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió trietilamina (0,301 ml, 0,219 g, 2,16 mmol) y se enfrió la mezcla en un baño con hielo. Después de dos minutos, se añadió el cloruro de metanosulfonilo (0,16 ml, 0,248 g, 2,16 mmol). La mezcla se agitó por 15 minutos a 0°C, luego a temperatura ambiente por dos horas. La mezcla de reacción se filtró a través de gel de sílice para remover el cloruro de trietilamonio, y se lavó el filtrado sucesivamente con agua, NaHCO₃ saturado, agua y salmuera. Se secaron las capas orgánicas sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo/metanol en proporción 9/1) para producir el compuesto 20 no polidisperso como un aceite claro (0,819 g, 83%). FAB MS: m/e 503 (M+H).

50 Ejemplo 16

Etil éster del ácido 6-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi)-hexanoico (21)

Se suspendió NaH (88 mg de una dispersión al 60% en aceite, 2,2 mmol) en tolueno anhidro (3 ml) bajo N₂ y se enfrió a 0°C. Se añadió monometil éter de dietilenglicol no polidisperso (0,26 ml, 0,26 g, 2,2 mmol) que se había secado mediante destilación azeotrópica con tolueno. Se permitió que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó por cuatro horas, durante dicho tiempo la suspensión gris turbia se tornó clara y amarilla y luego se tornó marrón. Se añadió mesilato 20 (0,50 g, 1,0 mmol) en 2,5 ml de tolueno seco. Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, se detuvo la reacción mediante la adición de 2 ml de metanol y se filtró la solución resultante a través de gel de sílice. El filtrado se concentró al vacío y el FAB EM: m/e 499 (M+H), 521 (M+Na). La purificación adicional mediante cromatografía preparativa (gel de sílice, cloroformato/metanol en proporción 19/3) produjo el producto no polidisperso como un aceite amarillo claro (0,302 g, 57%). FAB MS: m/e 527 (M+H), 549 (M+Na).

Ejemplo 17

Ácido 6-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi)-hexanoico (22)

El éster 21 no polidisperso (0,25 g, 0,46 mmol) se agitó por 18 horas en 0,71 ml de NaOH 1 N. Después de 18 horas, se concentró la mezcla al vacío para remover el alcohol y se disolvió el residuo en 10 ml adicionales de agua. La solución acuosa se acidificó hasta pH 2 con HCl 2 N y se extrajo el producto en diclorometano (30 ml x 2). Se lavaron luego las capas orgánicas combinadas con salmuera (25 ml x 2), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío para producir el compuesto no polidisperso del título como un aceite amarillo (0,147 g, 62%) FAB MS: m/e 499 (M+H), 521 (M+Na).

Ejemplo 18

2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster del ácido 6-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi)-hexanoico (23)

El ácido 22 no polidisperso (0,209 g, 0,42 mmol) se disolvió en 4 ml de diclorometano seco y se añadió a un matraz seco que ya contenía NHS (N-hidroxisuccinimida) (57,8 mg, 0,502 mmol) y EDC (clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) (98,0 mg, 0,502 mmol) bajo una atmósfera de N₂. Se agitó la solución a temperatura ambiente durante la noche y se filtró a través de gel de sílice para remover el exceso de reactivos y la urea formada a partir del EDC. Se concentró el filtrado al vacío para proporcionar el producto no polidisperso como un aceite de color amarillo oscuro (0,235 g, 94 %). FAB MS: m/e 596 (M+H), 618 (M+Na).

Los Ejemplos 19 a 24 se refieren al esquema ilustrado en la Figura 4.

Ejemplo 19

30 Mesilato de monometil éter de trietilenglicol (24)

A una solución de CH₂Cl₂ (100 mL) enfriada a 0°C en un baño con hielo se le añadió monometil éter de trietilenglicol no polidisperso (25 g, 0,15 mol). Luego se añadió trietilamina (29,5 mL, 0,22 moles) y se agitó la solución por 15 min a 0°C, que fue seguido por la adición gota a gota de cloruro de metanosulfonilo (13,8 mL, 0,18 moles, disuelto en 20 mL de CH₂Cl₂). La mezcla de reacción se agitó por 30 minutos a 0°C, se dejó calentar hasta temperatura ambiente, y luego se agitó por 2 horas. La mezcla de reacción sin purificar se filtró a través de Celite (se lavó con CH₂Cl₂ ~ 200 mL), luego se lavó con H₂O (300 mL), NaHCO₃ (300 mL), H₂O (300 mL), NaCl saturado (300 mL), se secó sobre MgSO₄, y se evaporó hasta sequedad. Luego se colocó el aceite en una línea al vacío por ~ 2 horas para asegurar la sequedad y produjo el compuesto no polidisperso del título como un aceite de color amarillo (29,15 g, rendimiento del 80%).

Ejemplo 20

40 Monometil éter de heptaetilenglicol (25)

A una solución de tetraetilenglicol no polidispersa (51,5 g, 0,27 mol) en THF (1 L) se le añadió t-butoxido de potasio (14,8 g, 0,13 mol, en pequeñas porciones durante ~30 minutos). Se agitó luego la mezcla de reacción por 1 hora y luego se añadió gota a gota el compuesto 24 (29,15 g, 0,12 moles) disuelto en THF (90 mL) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción sin purificar a través de Celite (se lavó con CH₂Cl₂, ~200 mL) y se evaporó hasta sequedad. Se disolvió luego el aceite en HCl (250 mL, 1 N) y se lavó con acetato de etilo (250 mL) para remover el exceso del compuesto 24. Se pueden requerir lavados adicionales de acetato de etilo (125 mL) para remover el compuesto 24 remanente. Se lavó la fase acuosa repetitivamente con CH₂Cl₂ (volúmenes de 125 mL) hasta que la mayoría del compuesto 25 había sido removido de la fase acuosa. La primera extracción contendrá 24, 25, y el producto lateral desacoplado y se debe extraer nuevamente con HCl (125 mL, 1 N). Se combinaron y evaporaron las capas

- 5 orgánicas hasta sequedad. Se disolvió luego el aceite resultante en CH_2Cl_2 (100 mL) y se lavó repetitivamente con H_2O (volúmenes de 50 mL) hasta que se removió el compuesto 25. Se combinaron las fracciones acuosas, volumen total 500 mL, y se añadió NaCl hasta que la solución se tornó turbia y luego se lavó con CH_2Cl_2 (2 x 500 mL). Se combinaron las capas orgánicas, se secaron sobre MgSO_4 , y se evaporaron hasta sequedad para producir el compuesto no polidisperso del título como un aceite (16,9 g, rendimiento del 41%). Puede ser deseable repetir uno o más de los pasos del procedimiento de purificación para asegurar una alta pureza.

Ejemplo 21

8-Bromooctanoato (26)

- 10 A una solución del ácido 8-bromooctanoico (5,0 g, 22 mmol) en etanol (100 mL) se le añadió H_2SO_4 (0,36 mL, 7,5 mmol) y se calentó la reacción a reflujo con agitación por 3 horas. La mezcla de reacción sin purificar se enfrió hasta temperatura ambiente y se lavó con H_2O (100 mL), NaHCO_3 saturado (2 x 100 mL), H_2O (100 mL), se secó sobre MgSO_4 , y se evaporó hasta sequedad para producir un aceite claro (5,5 g, rendimiento del 98%).

Ejemplo 22

Síntesis del éster MPEG7-C8 (27)

- 15 A una solución del compuesto 25 no polidisperso (3,0 g, 8,8 mmol) en éter (90 mL) se le añadió t-butoxido de potasio (1,2 g, 9,6 mmol) y se agitó la mezcla de reacción por 1 hora. Luego se añadió gota a gota el compuesto 26 no polidisperso (2,4 g 9,6 mmol), disuelto en éter (10 mL), y se agitó la mezcla de reacción durante la noche. La mezcla de reacción sin purificar se filtró a través de Celite (se lavó con CH_2Cl_2 , ~200 mL) y se evaporó hasta sequedad. Se disolvió el aceite resultante en acetato de etilo y se lavó con H_2O (2 x 200 mL), se secó sobre MgSO_4 , y se evaporó hasta sequedad. Se llevó a cabo una cromatografía en columna (sílice, proporción de acetato de etilo con respecto a acetato de etilo/metanol, 10:1) y se produjo el compuesto no polidisperso del título como un aceite claro (0,843 g, rendimiento del 19%).

Ejemplo 23

Ácido MPEG7-C8 (28)

- 25 Al aceite del compuesto 27 no polidisperso (0,70 g, 1,4 mmol) se le añadió NaOH 1 N (2,0 mL) y se agitó la mezcla de reacción por 4 horas. Se concentró la mezcla de reacción sin purificar, se acidificó (pH ~2), se saturó con NaCl, y se lavó con CH_2Cl_2 (2 x 50 mL). Se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con NaCl saturado, se sacaron sobre MgSO_4 , y se evaporaron hasta sequedad para producir el compuesto no polidisperso del título como un aceite claro (0,35 g, rendimiento del 53%).

30 Ejemplo 24

Activación del ácido MPEG7-CS (29)

- 35 Se disolvió el ácido mPEG7-C8 28 no polidisperso (0,31 g, 0,64 mmol) en 3 mL de cloruro de metileno anhidro y luego se añadió una solución de N-hidroxisuccinimida (0,079 g, 0,69 mmol) y EDCI·HCl (135,6 mg, 0,71 mmol) en cloruro de metileno anhidro. Se agitó la reacción por varias horas, luego se lavó con HCl 1 N, agua, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y concentró. El material crudo se purificó mediante cromatografía en columna, se concentró para producir el compuesto no polidisperso del título como un aceite claro y se secó al vacío.

Los Ejemplos 25 a 29 se refieren al esquema ilustrado en la Figura 5.

Ejemplo 25

10-Hidroxidecanoato (30)

- 40 A una solución del ácido 10-hidroxidecanoico no polidisperso (5,0 g, 26,5 mmol) en etanol (100 mL) se le añadió H_2SO_4 (0,43 mL, 8,8 mmol) y se calentó la reacción a reflujo con agitación por 3 horas. Se enfrió la mezcla de reacción sin purificar a temperatura ambiente y se lavó con H_2O (100 mL), NaHCO_3 saturado (2 x 100 mL), H_2O (100 mL), se secó sobre MgSO_4 , y se evaporó hasta sequedad para producir el compuesto no polidisperso del título como un aceite claro (6,9 g, rendimiento del 98%).

45 Ejemplo 26

Mesilato de 10-hidroxicanoato (31)

A una solución de CH_2Cl_2 (27 mL) se le añadió 10-hidroxicanoato no polidisperso 30 (5,6 g, 26 mmol) y se enfrió a 0°C en un baño con hielo. Luego se añadió trietilamina (5 mL, 37 mmol) y se agitó la mezcla de reacción por 15 minutos a 0°C . Luego se añadió el cloruro de metanosulfonilo (2,7 mL, 24 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (3 mL) y se agitó la mezcla de reacción a 0°C por 30 minutos, se removió el baño con hielo y se agitó la reacción por 2 horas adicionales a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción sin purificar a través de Celite (se lavó con CH_2Cl_2 , 80 mL) y se lavó el filtrado con H_2O (100 mL), NaHCO_3 al 5% (2 x 100 mL), H_2O (100 mL), NaCl saturado (100 mL), se secó sobre MgSO_4 , y se evaporó hasta sequedad para producir el compuesto no polidisperso del título como un aceite amarillento (7,42 g, rendimiento del 97%).

Ejemplo 27

Éster de MPEG7-C₁₀ (32)

A una solución de monometil éter de heptaetilenglicol 25 no polidisperso (2,5 g, 7,3 mmol) en tetrahidrofurano (100 mL) se le añadió hidruro de sodio (0,194 g, 8,1 mmol) y se agitó la mezcla de reacción por 1 hora. Luego se añadió gota a gota mesilato de 10-hidroxicanoato 31 no polidisperso (2,4 g, 8,1 mmol), disuelto en tetrahidrofurano (10 mL), y se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción sin purificar a través de Celite (se lavó con CH_2Cl_2 , ~200 mL) y se evaporó hasta sequedad. Se disolvió el aceite resultante en acetato de etilo y se lavó con H_2O (2 x 200 mL), se secó sobre MgSO_4 , se evaporó hasta sequedad, se sometió a cromatografía (sílice, acetato de etilo/metanol, 10:1), y se sometió a cromatografía (sílice, acetato de etilo) para producir el compuesto no polidisperso del título como un aceite claro (0,570 g, rendimiento del 15%).

Ejemplo 28

Ácido MPEG7-C₁₀ (33)

Al aceite del éster MPEG7-C₁₀ 32 no polidisperso (0,570 g, 1,1 mmol) se le añadió NaOH 1 N (1,6 mL) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche. La mezcla de reacción sin purificar se concentró, acidificó (pH ~2), se saturó con NaCl , y se lavó con CH_2Cl_2 (2 x 50 mL). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con NaCl saturado (2 x 50 mL), se secaron con MgSO_4 , y se evaporaron hasta sequedad para obtener el compuesto no polidisperso del título como un aceite claro (0,340 g, rendimiento del 62%).

Ejemplo 29

Activación del ácido MPEG7-C₁₀ (34)

Se activó el ácido 33 no polidisperso utilizando procedimientos similares a aquellos descritos anteriormente en el Ejemplo 24.

Los Ejemplos 30 y 31 se refieren al esquema ilustrado en la Figura 6.

Ejemplo 30

Síntesis del oligómero C18 (PEG6) (36)

Se añadió lentamente cloruro de estearoil no polidisperso 35 (0,7 g, 2,31 mmol) a una mezcla de PEG6 (5 g, 17,7 mmol) y piridina (0,979, 12,4 mmol) en benceno. Se agitó la mezcla de reacción por varias horas (~5). La reacción fue seguida por TLC utilizando acetato de etilo/metanol como disolvente de desarrollo. Luego se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó sobre MgSO_4 , se concentró y se secó al vacío. El compuesto 36 no polidisperso purificado se analizó mediante FAB EM: m/e 549/ M^+H .

Ejemplo 31

Activación del oligómero C18 (PEG6)

La activación del oligómero C18 no polidisperso (PEG6) se logró en dos pasos:

1) Se disolvió estearoil-PEG6 36 no polidisperso (0,8 g, 1,46 mmol) en tolueno y se añadió a una solución de fosgeno (10 ml, 20 % en tolueno) que se había enfriado con un baño con hielo. Se agitó la mezcla de reacción por 1 hora a 0°C y luego por 3 horas a temperatura ambiente. Luego se destilaron el fosgeno y el tolueno y se secó el clorofomato de estearoil PEG6 37 no polidisperso remanente sobre P_2O_5 durante la noche.

2) A una solución de clorofornato de estearoilo PEG6 36 no polidisperso (0,78 g, 1,27 mmol) y TEA (128 mg, 1,27 mmol) en cloruro de metileno anhidro, se le añadió una solución de N-hidroxisuccinimida (NHS) en cloruro de metileno. Se agitó la mezcla de reacción por 16 horas, luego se lavó con agua, se secó sobre MgSO_4 , se filtró, se concentró y se secó al vacío para proporcionar el oligómero C18 (PEG6) 38 activado no polidisperso.

5 Los Ejemplos 32 a 37 se refieren al esquema ilustrado en la Figura 7.

Ejemplo 32

Monobenciléter de tetraetilenglicol (39)

10 Al aceite del tetraetilenglicol no polidisperso (19,4 g, 0,10 mol) se le añadió una solución de NaOH (4,0 g en 4.0 mL) y se agitó la reacción por 15 minutos. Luego se añadió cloruro de bencilo (3,54 mL, 30,8 mmol) y se calentó la mezcla de reacción a 100°C y se agitó durante la noche. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se diluyó con NaCl saturado (250 mL), y se lavó con CH_2Cl_2 (2 x 200 mL). Se combinaron las capas orgánicas, se lavaron con NaCl saturado, se secaron sobre MgSO_4 , y se sometieron a cromatografía (sílice, acetato de etilo) para producir el compuesto no polidisperso del título como un aceite amarillo (6,21 g, rendimiento del 71%).

Ejemplo 33

15 Mesilato de monobenciléter de tetraetilenglicol (40)

20 A una solución de CH_2Cl_2 (20 mL) se le añadió monobenciléter de tetraetilenglicol 39 no polidisperso (6,21 g, 22 mmol) y se enfrió a 0°C en un baño con hielo. Luego se añadió trietilamina (3,2 mL, 24 mmol) y se agitó la mezcla de reacción por 15 minutos a 0°C. Luego se añadió el cloruro de metanosulfonilo (1,7 mL, 24 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (2 mL) y se agitó la mezcla de reacción a 0°C por 30 minutos, se removió el baño con hielo y se agitó la reacción por 2 horas adicionales a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción sin purificar a través de Celite (se lavó con CH_2Cl_2 , 80 mL) y se lavó el filtrado con H_2O (100 mL), NaHCO_3 al 5% (2 x 100 mL), H_2O (100 mL), NaCl saturado (100 mL), y se secó sobre MgSO_4 . Se sometió a cromatografía el aceite amarillo resultante sobre una almohadilla de sílice que contenía carbón activado (10 g) para producir el compuesto no polidisperso del título como un aceite claro (7,10 g, rendimiento del 89%).

25 Ejemplo 34

Monobenciléter de octaetilenglicol (41)

30 A una solución de tetrahidrofurano (140 mL) que contenía hidruro de sodio (0,43 g, 18 mmol) se le añadió gota a gota una solución de tetraetilenglicol no polidisperso (3,5 g, 18 mmol) en tetrahidrofurano (10 mL) y se agitó la mezcla de reacción por 1 hora. Luego se añadió gota a gota el mesilato de monobenciléter de tetraetilenglicol 40 no polidisperso (6,0 g, 16,5 mmol) disuelto en tetrahidrofurano (10 mL) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche. La mezcla de reacción sin purificar se filtró a través de Celite (se lavó con CH_2Cl_2 , 250 mL) y se lavó el filtrado con H_2O , se secó sobre MgSO_4 , y se evaporó hasta sequedad. Se sometió a cromatografía el aceite resultante (sílice, acetato de etilo/metanol, 10:1) y se sometió a cromatografía (sílice, cloroformo/metanol, 25:1) para producir el compuesto no polidisperso del título como un aceite claro (2,62 g, rendimiento del 34%).

35 Ejemplo 35

Síntesis del estearato de PEG8-bencilo (43)

40 A una solución enfriada agitada de monobenciléter de octaetilenglicol 41 no polidisperso (0,998 g, 2,07 mmol) y piridina (163,9 mg, 2,07 mmol) se le añadió cloruro de estearoilo 42 no polidisperso (627,7 mg, 2,07 mmol) en benceno. Se agitó la mezcla de reacción durante la noche (18 horas). Al día siguiente se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó sobre MgSO_4 , se concentró y se secó al vacío. Luego se sometió a cromatografía el producto sin purificar en una columna de gel de sílice para cromatografía instantánea, utilizando 10% de metanol / 90% de cloroformo. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, concentraron y secaron al vacío para producir el compuesto no polidisperso del título.

Ejemplo 36

45 Hidrogenólisis de estearato de PEG8-bencilo

A una solución en metanol de estearato de PEG8-bencilo 43 no polidisperso (0,8549 g, 1,138 mmol) se le añadió Pd/C (10%) (paladio, 10% en peso sobre carbón activado). Se agitó la mezcla de reacción durante la noche (18 horas) bajo

atmósfera de hidrógeno. Luego se filtró, concentró y purificó la solución mediante cromatografía instantánea en columna utilizando 10% de metanol / 90% de cloroformo, se recolectaron, concentraron y secaron las fracciones con $R_t = 0,6$ para proporcionar el ácido 44 no polidisperso.

Ejemplo 37

5 Activación del oligómero C18 (PEG8)

Se llevaron a cabo dos pasos de activación del oligómero de estearato de PEG8 no polidisperso como se describió para el estearato de PEG6 en el Ejemplo 31 anterior para proporcionar el oligómero C18 (PEG8) 45 no polidisperso activado.

Ejemplo 38

Síntesis de oligómeros de monometilo de trietilenglicol activados

10 La siguiente descripción se refiere al esquema ilustrado en la Figura 8. Se enfrió una solución de tolueno que contenían 20% de fosgeno (100 ml, aproximadamente 18,7 g, 189 mmol de fosgeno) a 0°C bajo una atmósfera de N_2 . Se disolvió el mTEG no polidisperso (trietilenglicol, monometiléter, 7,8 g, 47,5 mmol) en 25 mL de acetato de etilo anhidro y se añadió a la solución de fosgeno enfriada. Se agitó la mezcla por una hora a 0°C, luego se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó por otras dos horas y media. El fosgeno, acetato de etilo y tolueno restantes se removieron mediante destilación al vacío para dejar el clorofomato de mTEG 46 no polidisperso como un residuo oleoso claro.

20 El residuo 46 no polidisperso se disolvió en 50 mL de diclorometano seco al cual se le añadió TEA (trietilamina, 6,62 mL, 47,5 mmol) y NHS (N-hidroxisuccinimida, 5,8 g, 50,4 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente bajo una atmósfera seca por veinte horas, tiempo durante el cual apareció una gran cantidad de precipitado blanco. Se filtró la mezcla para remover este precipitado y se concentró al vacío. Se recogió el aceite 47 resultante en diclorometano y se lavó dos veces con agua desionizada fría, dos veces con HCl 1 N y una vez con salmuera. Se secaron las capas orgánicas sobre $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron para proporcionar el compuesto no polidisperso del título como un aceite claro ligeramente amarillo. Si fuera necesario, se podría purificar adicionalmente el éster de NHS mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice utilizando EtOAc como eluyente.

25 Ejemplo 39

Síntesis de oligómeros de palmitato de TEG activados

30 La siguiente descripción se refiere al esquema ilustrado en la Figura 9. Se disolvió el anhídrido palmítico no polidisperso (5 g; 10 mmol) en THF seco (20 mL) y se agitó a temperatura ambiente. A la solución en agitación, se le añadió un exceso de 3 moles de piridina seguido por el trietilenglicol no polidisperso (1,4 mL). Se agitó la mezcla de reacción por 1 hora (el progreso de la reacción se controló mediante TLC; acetato de etilo-cloroformo; 3:7). Al término de la reacción, se removió el THF y se mezcló el producto con ácido H_2SO_4 al 10% y se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL). Se lavaron los extractos combinados secuencialmente con agua, salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$, y se evaporaron para producir el producto 48 no polidisperso. Se añadió una solución de carbonato de N,N'-disuccinimidilo (3 mmol) en DMF (~10 mL) a una solución del producto 48 no polidisperso (1 mmol) en 10 mL de DMF anhidro mientras se agitaba. Se añadió lentamente hidruro de sodio (3 mmol) a la mezcla de reacción. Se agitó la mezcla de reacción por varias horas (por ejemplo, 5 horas). Se añadió éter dietílico para precipitar el oligómero activado. Este procedimiento se repitió 3 veces y se secó finalmente el producto.

Ejemplo 40

Síntesis de oligómeros de monometilo de hexaetilenglicol activados

40 La siguiente descripción se refiere al esquema ilustrado en la Figura 10. Se preparó el monometiléter de hexaetilenglicol no polidisperso activado de manera análoga a la del trietilenglicol no polidisperso en el Ejemplo 39 anterior. Se enfrió una solución de fosgeno en tolueno al 20% (35 mL, 6,66 g, 67,4 mmol de fosgeno) bajo una atmósfera de N_2 en un baño de hielo/agua salada. Se disolvió el hexaetilenglicol 50 no polidisperso (1,85 mL, 2,0 g, 6,74 mmol) en 5 mL de EtOAc anhidro y se añadió a la solución de fosgeno mediante una jeringa. Se mantuvo la mezcla de reacción con agitación en el baño con hielo por una hora, se removió y se agitó por 2,5 horas adicionales a temperatura ambiente. El fosgeno, EtOAc, y tolueno fueron removidos mediante destilación al vacío, dejando el compuesto 51 no polidisperso como un residuo oleoso claro.

El residuo 51 no polidisperso se disolvió en 20 mL de diclorometano seco y se colocó bajo una atmósfera seca, inerte. Se añadieron trietilamina (0,94 mL, 0,68 g, 6,7 mmol) y luego NHS (N-hidroxisuccinimida, 0,82 g, 7,1 mmol), y se agitó

la mezcla de reacción a temperatura ambiente por 18 horas. La mezcla se filtró a través de gel de sílice para remover el precipitado blanco y se concentró al vacío. Se recogió el residuo en diclorometano y se lavó dos veces con agua fría, dos veces con HCl 1 N y una vez con salmuera. Se secaron las capas orgánicas sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. La purificación final se realizó mediante cromatografía instantánea (gel de sílice, EtOAc) para obtener el éster de NHS 52 no polidisperso activo con UV.

Ejemplo 41

Síntesis de conjugados de insulina-oligómero

A la insulina humana (con zinc o libre de zinc, 2 g, 0,344 mmol con base en peso seco) en 25 mL de dimetilsulfóxido (pureza > 99%) a 22±4°C se le añadió 8 mL de trietilamina (pureza > 99%). La mezcla resultante se agitó por 5 a 10 minutos a 22±4°C. A lo anterior se le añadió rápidamente el oligómero activado del Ejemplo 18 anterior (0,188 g, 0,36 mmol con base en una activación del 100%) en 7,5 mL de acetonitrilo bajo agitación a 22±4°C. Se agitó la solución por 45 minutos y se detuvo la reacción con solución de ácido acético manteniendo la temperatura por debajo de 27°C. Se controló la reacción mediante HPLC analítica. Esta condición de reacción produce PEG7-hexil-insulina, monoconjugada en la posición B29 (PEG7-hexil-insulina, monoconjugada en B29) con un rendimiento del 40-60%. La mezcla de reacción sin purificar (PEG7-hexil-insulina, monoconjugada en B29, 40-60%, 8-25% de insulina sin reaccionar, 15-35% de sustancias relacionadas) se dializó o se diafiltró (corte de peso molecular 3000-3500, COPM) para remover los disolventes orgánicos y las impurezas de bajo peso molecular, se hizo intercambio contra regulador de acetato de amonio y se liofilizó.

La reacción de conjugación de PEG7-hexil-insulina, monoconjugada en la posición B29, se controló mediante HPLC analítica. Este método de HPLC analítica utilizó una columna C18 Delta-Pak de Waters, 150 x 3,9 mm de diámetro interno, 5 µm, 300 Å. El sistema disolvente consistió del disolvente B: 0,1% de TFA en proporción 50/50 de metanol/agua, y del disolvente D: 0,1% de TFA en metanol. El sistema de gradiente fue como sigue:

Tiempo (min)	% de disolvente B	% de disolvente D	Velocidad de flujo (mL/min)
Inicial (0)	100	0	1,00
20	40	60	1,00
25	100	0	1,00

Ejemplo 42

El procedimiento del Ejemplo 41 se utilizó para conjugar la insulina humana con el oligómero activado del Ejemplo 24.

Ejemplo 43

El procedimiento del Ejemplo 41 se utilizó para conjugar la insulina humana con el oligómero activado del Ejemplo 31.

Ejemplo 44

El procedimiento del Ejemplo 41 se utilizó para conjugar la insulina humana con el oligómero activado del Ejemplo 37.

Ejemplo 46

El procedimiento del Ejemplo 41 se utilizó para conjugar la insulina humana con el oligómero activado del Ejemplo 38.

Ejemplo 47

El procedimiento del Ejemplo 41 se utilizó para conjugar la insulina humana con el oligómero activado del Ejemplo 39.

Ejemplo 48

El procedimiento del Ejemplo 41 se utilizó para conjugar la insulina humana con el oligómero activado del Ejemplo 40.

Ejemplo 49

Determinación del coeficiente de dispersidad para una mezcla de conjugados de insulina humana-oligómero

El coeficiente de dispersidad de una mezcla de conjugados de insulina humana-oligómero se determinó como sigue. Se proporciona una mezcla de conjugados de insulina humana-oligómero, por ejemplo como se describió anteriormente en el Ejemplo 41. Una primera muestra de la mezcla se purificó mediante HPLC para separar y aislar los diversos conjugados de insulina humana-oligómero en la muestra. Asumiendo que cada fracción aislada contiene una mezcla monodispersa pura de conjugados, "n" es igual al número de fracciones recolectadas. La mezcla puede incluir uno o más de los siguientes conjugados, que se describen estableciendo la posición de conjugación seguida por el grado de conjugación: monoconjugado Gly^{A1}; monoconjugado Phe^{B1}; monoconjugado Lys^{B29}; diconjugado Gly^{A1}, Phe^{B1}; diconjugado Gly^{A1}, Lys^{B29}; diconjugado Phe^{B1}, Lys^{B29}; y/o triconjugado Gly^{A1}, Phe^{B1}, Lys^{B29}. Cada fracción aislada de la mezcla se analizó mediante espectroscopia de masas para determinar la masa de la fracción, lo cual permite que cada fracción aislada sea categorizada como un mono, di, o triconjugado y proporciona un valor para la variable "M_i" para cada conjugado en la muestra.

Se analizó una segunda muestra de la mezcla mediante HPLC para proporcionar una señal de HPLC. Asumiendo que el factor de absorción molar no cambia como resultado de la conjugación, se proporciona el porcentaje en peso de un conjugado particular en la mezcla por el área bajo el pico de la señal de HPLC que corresponde al conjugado particular como un porcentaje del área total bajo todos los picos de la señal de HPLC. Se recolecta y liofiliza la muestra hasta sequedad para determinar el peso anhidro en gramos de la muestra. El peso en gramos de la muestra se multiplica por el porcentaje en peso de cada componente en la muestra para determinar el peso en gramos de cada conjugado en la muestra. La variable "N_i" se determinó para un conjugado particular (el conjugado i) mediante la división del peso en gramos del conjugado particular en la muestra por la masa del conjugado particular y multiplicando el cociente por el número de Avogadro ($6,02205 \times 10^{23}$ moles⁻¹), M_i, determinado anteriormente, para obtener el número de moléculas del conjugado particular, N_i, en la muestra. Se calculó luego el coeficiente de dispersidad utilizando n, M_i como se determinó para cada conjugado, y N_i como se determinó para cada conjugado.

Ejemplo 50

Purificación de PEG7-hexil-Insulina modificada con B29, monoconjugada, a partir de la mezcla sin purificar

Se purificó PEG7-hexil-insulina, monoconjugado con B29, a partir de la mezcla sin purificar del Ejemplo 41 utilizando un sistema de HPLC preparativa. Se disolvió la mezcla liofilizada sin purificar (0,5 g, composición: PEG7-hexil-insulina, monoconjugado con B29, 40-60%, 8-25% de insulina sin reaccionar, 15-35% de sustancias relacionadas) en 5-10 mL de regulador de acetato de amonio 0,01 M, pH 7,4 y se cargó en una columna C-18 de HPLC de fase reversa (150 x 3,9 mm) equilibrada con 0,5% de trietilamina/0,5% de regulador de ácido fosfórico TEAP A). Se eluyó la columna con un flujo de gradiente utilizando el sistema disolvente TEAP A y TEAP B (80% de acetonitrilo y 20% de TEAP A). El sistema de gradiente para la purificación por HPLC preparativa de PEG7-hexil-insulina, monoconjugado con B29, a partir de la mezcla sin purificar fue como sigue:

Tiempo (min)	% de TEAP A	% de TEAP B	Velocidad de flujo (mL/min)
Inicial (0)	70	30	30
45	64	36	30
105	60	40	30
115	40	60	30
125	15	85	30
135	15	85	30

Las fracciones fueron analizadas mediante HPLC y las fracciones del producto que tenían > 97% de pureza de PEG7-hexil-insulina, monoconjugada con B29, se agruparon. Se removieron el regulador de elución y el disolvente mediante diálisis o diafiltración (COPM 3000-3500) contra regulador de acetato de amonio (0,01 M, pH 7,4) y se intercambiaron en regulador de acetato de amonio y se liofilizaron para producir el polvo blanco de PEG7-hexil-insulina, monoconjugado con B29 (pureza > 97%).

Se usó un método de HPLC analítica utilizando la misma columna y sistema disolvente que el método utilizado en el Ejemplo 41 para controlar la reacción para el análisis de PEG7-hexil-insulina, monoconjugada con B29. Sin embargo, las condiciones de gradiente fueron las siguientes:

Tiempo (min)	% de disolvente B	% de disolvente D	Velocidad de flujo (mL/min)
Inicial (0)	100	0	1,00
30	10	90	1,00
35	100	0	1,00

5 Ejemplo 51

Estudios con Cytosensor

Las células Colo 205 (células de adenocarcinoma colorrectal de ATCC, catálogo # CCL-222) que habían sido privadas de suero por aproximadamente 18 horas se suspendieron en medio RPMI-1640 de baja regulación en el Cytosensor: medio de atrapamiento en agarosa en el Cytosensor en proporción 3:1 y se sembraron dentro de copas tipo cápsula del Cytosensor a razón de 100.000 células/ por gota de 10 μ L. Se permitió que las células se equilibraran en el Cytosensor con el medio RPMI-1640 de baja regulación a una velocidad de flujo de 100 μ L por minuto durante aproximadamente 3 horas hasta que las velocidades de acidificación de la línea base se estabilizaron. Los fármacos de insulina (insulina o conjugados de insulina) se diluyeron hasta 50 nM en medio RPMI-1640 de baja regulación y se aplicaron a las células durante 20 minutos a razón de 100 μ L/minuto. Después de la exposición, se retiraron las soluciones del fármaco y se perfundieron nuevamente las células bajo el flujo continuo del medio de baja regulación únicamente. La recolección de los datos continuó hasta que las velocidades de acidificación regresaron a los niveles basales (aproximadamente una hora a partir de la aplicación de las soluciones del fármaco). Los resultados se ilustran en la Figura 14. Como se utilizó en la Figura 14, la insulina es insulina humana; PEG4 es una mezcla no polidispersa de mPEG4-hexil-insulina, monoconjugados; PEG10 es una mezcla no polidispersa de mPEG10-hexil-insulina, monoconjugados; PEG7 es una mezcla no polidispersa de mPEG7-hexil-insulina, monoconjugados; PEG7_{promedio} es una mezcla polidispersa de mPEG7_{promedio}-hexil-insulina, monoconjugados.

Ejemplo 52

Estabilidad enzimática

Las digestiones con quimotripsina se realizaron en un regulador de fosfato, pH 7,4, a 37°C en un baño de agua con agitación. La concentración de insulina/conjugado de insulina fue de 0,3 mg/mL. La concentración de quimotripsina fue de 2 Unidades/mL. Se removieron muestras de 100 μ L en los puntos de tiempo indicados y se detuvieron las reacciones con 25 μ L de una mezcla 1:1 de ácido trifluoroacético al 0,1%:alcohol isopropílico. Se analizaron las muestras mediante HPLC en fase reversa y se determinaron las concentraciones relativas de insulina/conjugado de insulina mediante el cálculo de las áreas bajo las curvas.

Como se utiliza en la Figura 15, la insulina es insulina humana; PEG4 es una mezcla no polidispersa de mPEG4-hexil-insulina, monoconjugados; PEG10 es una mezcla no polidispersa de mPEG10-hexil-insulina, monoconjugados; PEG7 es una mezcla no polidispersa de mPEG7-hexil-insulina, monoconjugados; PEG7_{promedio} es una mezcla polidispersa de mPEG7_{promedio}-hexil-insulina, monoconjugados.

Ejemplo 53

Actividad dependiente de la dosis

Un modelo animal efectivo para evaluar las formulaciones utiliza perros sabuesos normales en ayuno. A estos perros se les administra de 0,25 mg/kg hasta 1,0 mg/kg de conjugados de insulina para evaluar la eficacia de diversas formulaciones. Este modelo se utilizó para demostrar que los conjugados de insulina de acuerdo con la presente invención proporcionan niveles más bajos de glucosa en una forma dependiente de la dosis mejor que los conjugados de insulina polidispersa, que no hacen parte de la presente invención y se proporcionan para propósitos de comparación.

El protocolo para experimentos con perros requiere de una medición de glucosa en sangre en un tiempo cero justo antes de administrar el fármaco. La formulación en una forma de dosificación oral sólida se inserta luego dentro del

5 hocico del perro. Se recolecta sangre a los 15, 30, 60 y 120 minutos y se miden los niveles de glucosa y se grafican. Entre menores los niveles de glucosa, mejor la actividad del conjugado de insulina. En la Figura 16, se muestra que la disminución de la glucosa, y por lo tanto la actividad de los conjugados de la presente invención depende de la dosis. Para propósitos de comparación, la Figura 17 muestra que la disminución de glucosa de los conjugados de insulina polidispersa en una formulación en cápsula, que no hace parte de la presente invención, es menos dependiente de la dosis que los conjugados de la presente invención.

Ejemplo 54

Actividad y variabilidad entre sujetos

10 Un modelo animal efectivo para la evaluación de las formulaciones utiliza perros sabuesos normales en ayuno. A estos perros se les administra 0,25 mg/kg de conjugados de insulina para evaluar la eficacia de diversas formulaciones. Este modelo se utilizó para demostrar que los conjugados de insulina de acuerdo con la presente invención proporcionan una

menor variabilidad entre sujetos y una mejor actividad que los conjugados de insulina polidispersa, que no son parte de la presente invención pero se proporcionan para propósitos de comparación.

15 El protocolo para experimentos con perros requiere de una medición de glucosa en sangre en un tiempo cero justo antes de administrar el fármaco. La formulación de dosis oral líquida se vierte entonces en la parte posterior del hocico del perro. En cada caso, los perros recibieron 0,25 mg/kg de esta solución. La sangre se recolectó a los 15, 30, 60 y 120 minutos y se midieron y graficaron los niveles de glucosa. Entre menores los niveles de glucosa, mejor la actividad del conjugado de insulina. En las Figuras 18, 19 y 20, los resultados obtenidos con PEG4-hexil-insulina, monoconjugado; PEG7-hexil-insulina, monoconjugado; y PEG10-hexil-insulina, monoconjugado, respectivamente, mostraron que estos
20 conjugados de PEG de la presente invención producen una menor variabilidad entre sujetos y una mayor actividad que los resultados mostrados en la Figura 21 para el PEG7_{promedio}-hexil-insulina, monoconjugado, que no es parte de la presente invención y se proporciona para propósitos de comparación.

25 En la memoria descriptiva, se han divulgado realizaciones típicas preferidas de la invención y, a pesar de que se emplean términos específicos, éstos se utilizan en un sentido genérico y descriptivo únicamente y no para propósitos de limitación, siendo establecido el alcance de la invención en las siguientes reivindicaciones.

Reivindicaciones

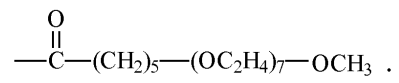
- 5 1. Una mezcla sustancialmente monodispersa de conjugados en la que al menos 95% de los compuestos en la mezcla tienen el mismo peso molecular y cada uno comprende una insulina acoplada a al menos un oligómero que comprende una fracción de polietilenglicol y una fracción lipofílica, en donde la fracción lipofílica es una fracción alquilo lineal no sustituida que tiene 2 a 12 átomos de carbono y covalentemente acoplada a la fracción de polietilenglicol, en donde la mezcla tiene un coeficiente de dispersidad (DC) mayor que 10.000 en donde

$$DC = \frac{\left(\sum_{i=1}^n N_i M_i \right)^2}{\sum_{i=1}^n N_i M_i^2 \sum_{i=1}^n N_i - \left(\sum_{i=1}^n N_i M_i \right)^2}$$

en donde:

- 10 n es el número de moléculas diferentes en la muestra; N_i es el número de i moléculas en la muestra; y M_i es la masa de las i moléculas, y en donde el conjugado comprende al menos un oligómero covalentemente acoplado a la función amina de Lys^{B29} de la insulina.
2. La mezcla sustancialmente monodispersa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el coeficiente de dispersidad es mayor que 10.000.
- 15 3. La mezcla sustancialmente monodispersa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la mezcla de conjugados comprende cada uno insulina humana covalentemente acoplada a la función amina de Lys^{B29} de la insulina humana con la fracción de ácido carboxílico de un ácido carboxílico, que está covalentemente acoplado al extremo distal con la fracción de ácido carboxílico a una fracción de polietilenglicol terminada en metilo que tiene al menos 7 subunidades de polietilenglicol.
- 20 4. La mezcla sustancialmente monodispersa de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la fracción de ácido carboxílico es ácido hexanoico.
5. La mezcla sustancialmente monodispersa de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en donde la mezcla tiene características seleccionadas del grupo que consiste de (a) una actividad *in vivo* o *in vitro* que es mayor que la actividad *in vivo* o *in vitro* de una mezcla polidispersa de conjugados de insulina-oligómero que tiene el mismo peso molecular promedio en número que la mezcla, (b) un aumento de la resistencia a la degradación por quimotripsina cuando se compara con la resistencia a la degradación por quimotripsina de una mezcla polidispersa de conjugados de insulina-oligómero que tiene el mismo peso molecular promedio en número que la mezcla, (c) una variabilidad entre sujetos que es menor que la variabilidad entre sujetos de una mezcla polidispersa de conjugados de insulina-oligómero que tiene el mismo peso molecular promedio en número que la mezcla, y combinaciones de los mismos.
- 25 6. La mezcla sustancialmente monodispersa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la mezcla de conjugados comprende diconjugados.
7. La mezcla sustancialmente monodispersa de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los diconjugados se seleccionan del grupo que consiste en un diconjugado Gly^{A1}/Lys^{B29}, diconjugado Phe^{B1}/Lys^{B29} y combinaciones de los mismos.
- 35 8. La mezcla sustancialmente monodispersa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la insulina está acoplada covalentemente al oligómero mediante un enlace hidrolizable, un enlace no hidrolizable, o ambos.
9. Una composición farmacéutica que comprende:
- la mezcla sustancialmente monodispersa de acuerdo con la reivindicación 1 o 3; y
- un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 10. El uso de una mezcla sustancialmente monodispersa de las reivindicaciones 1-9 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la deficiencia de insulina.

11. La mezcla sustancialmente monodispersa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la insulina es insulina humana y el oligómero tiene la fórmula:



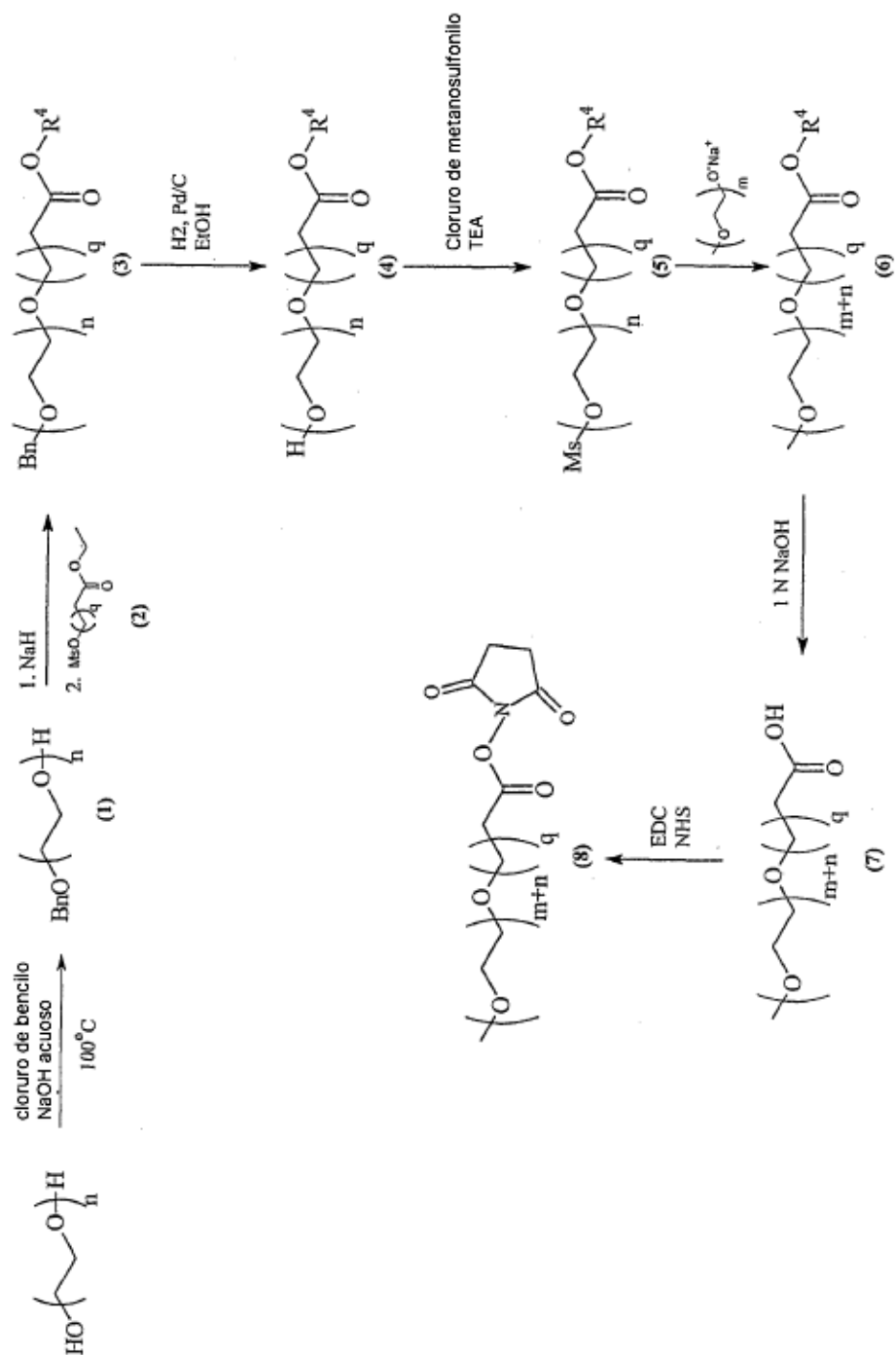


Figura 1

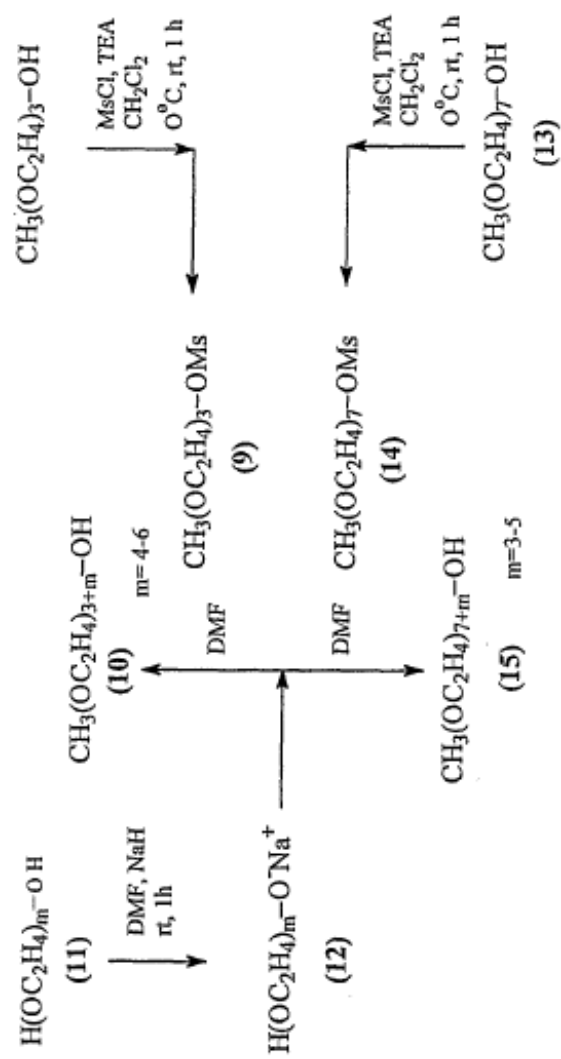


Figura 2

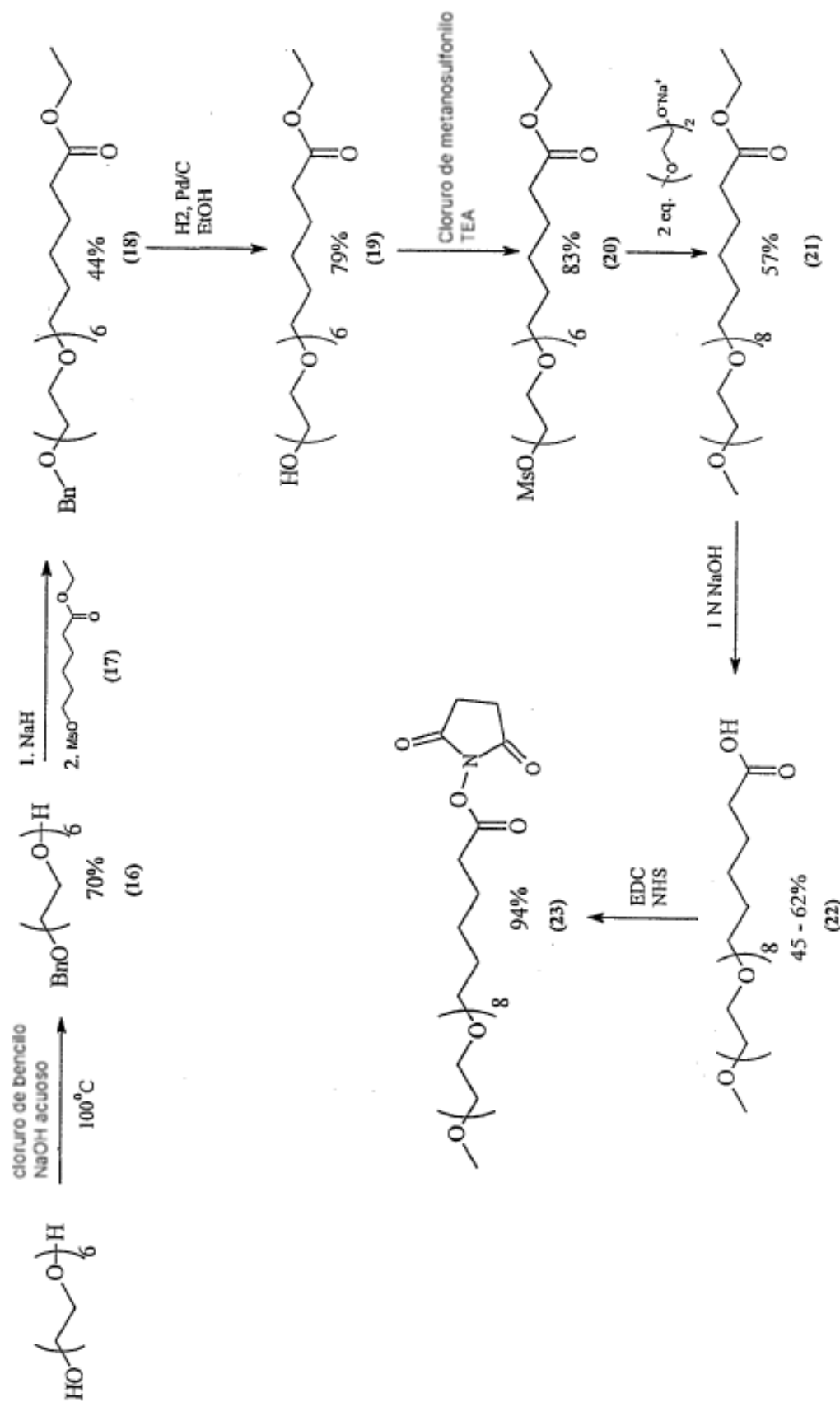


Figura 3

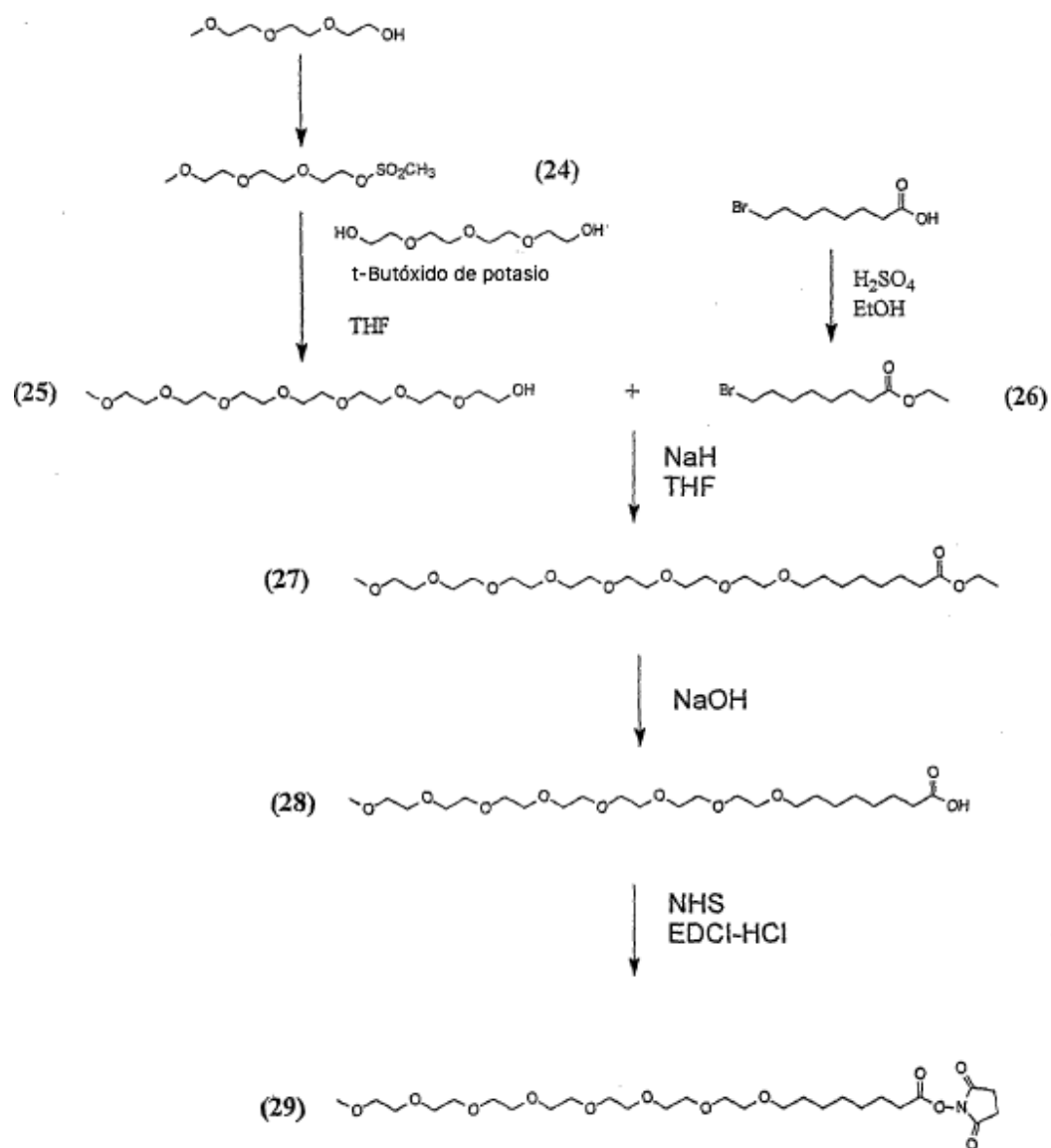


Figura 4

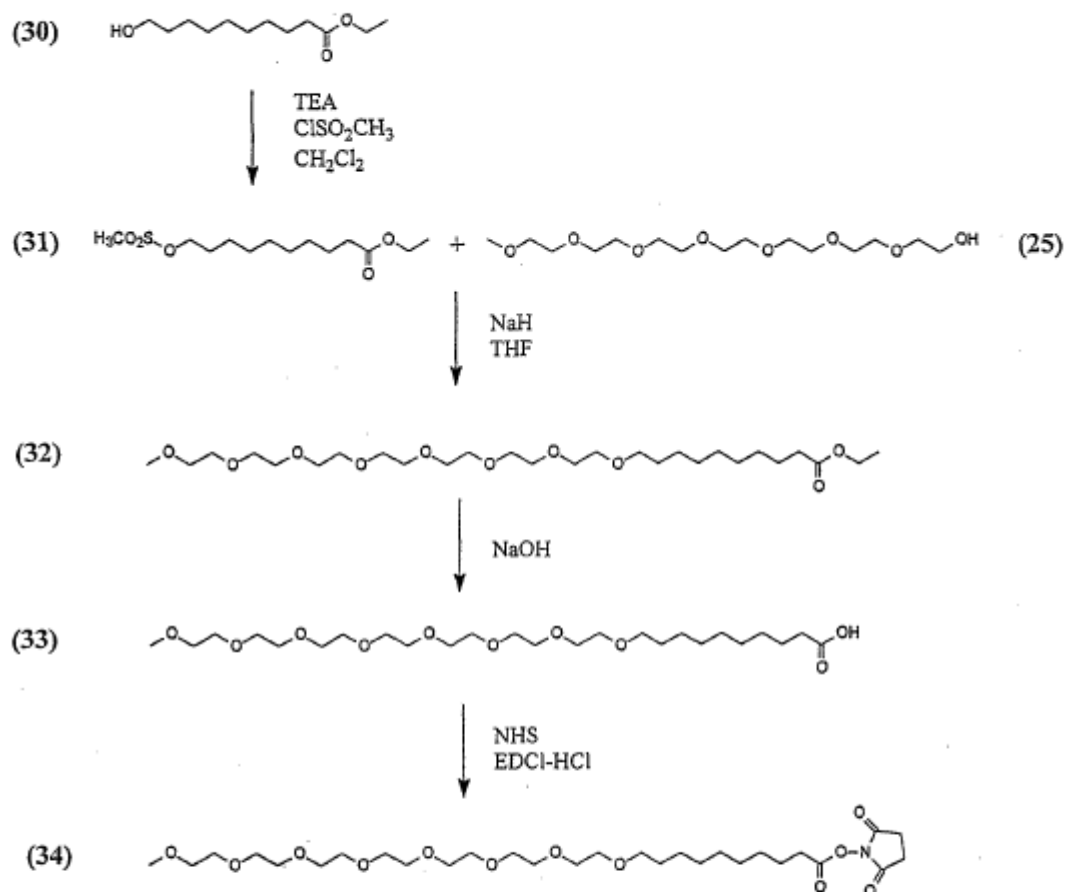


Figura 5

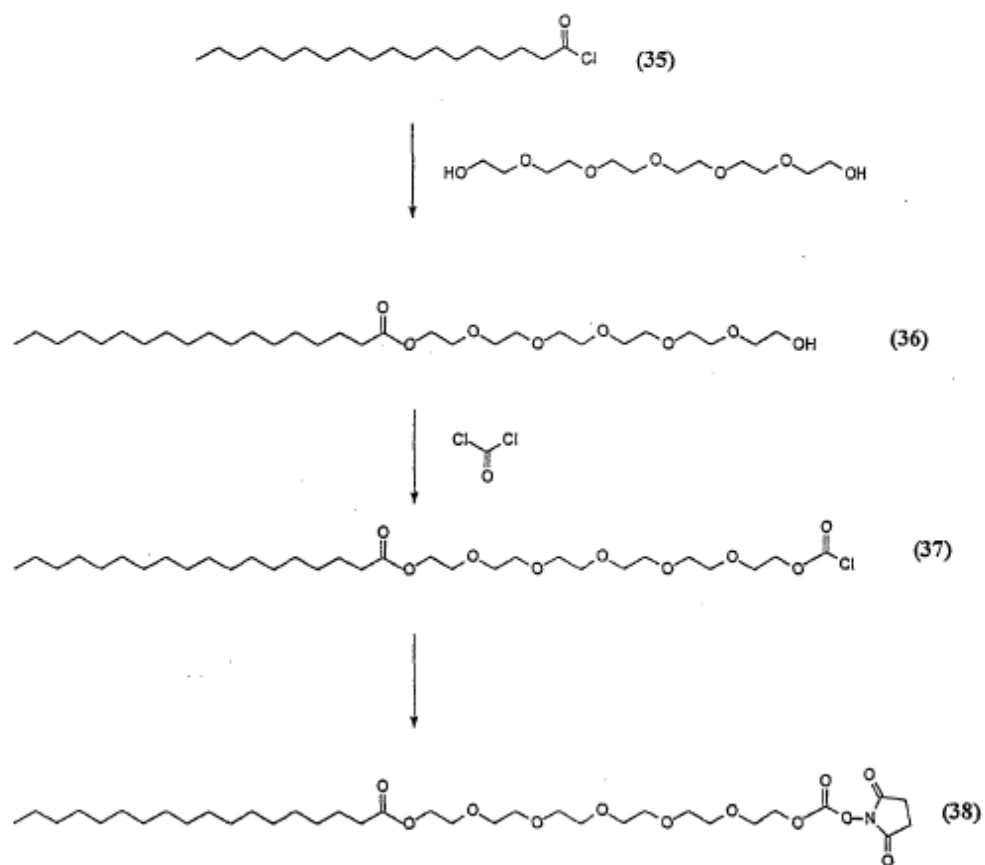


Figura 6

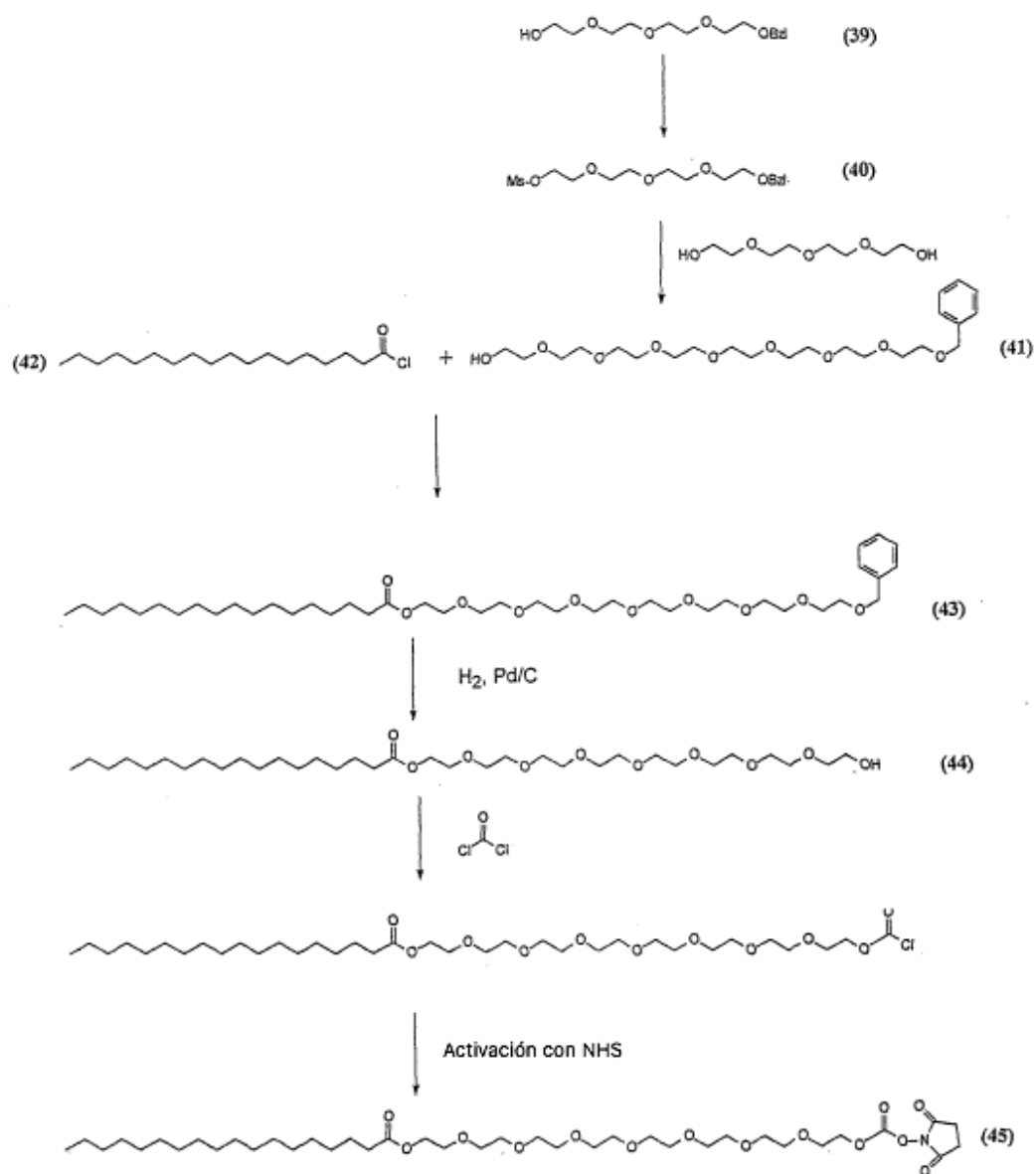


Figura 7

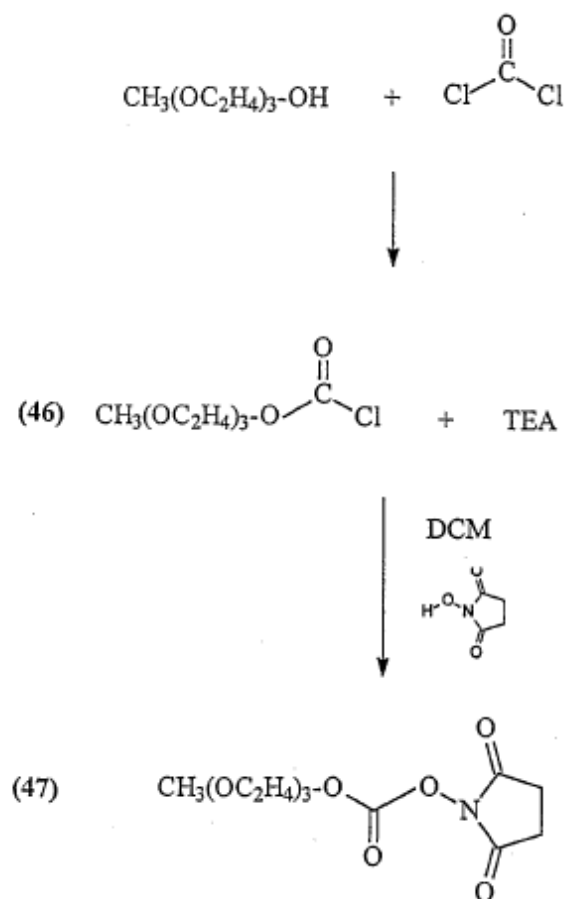


Figura 8

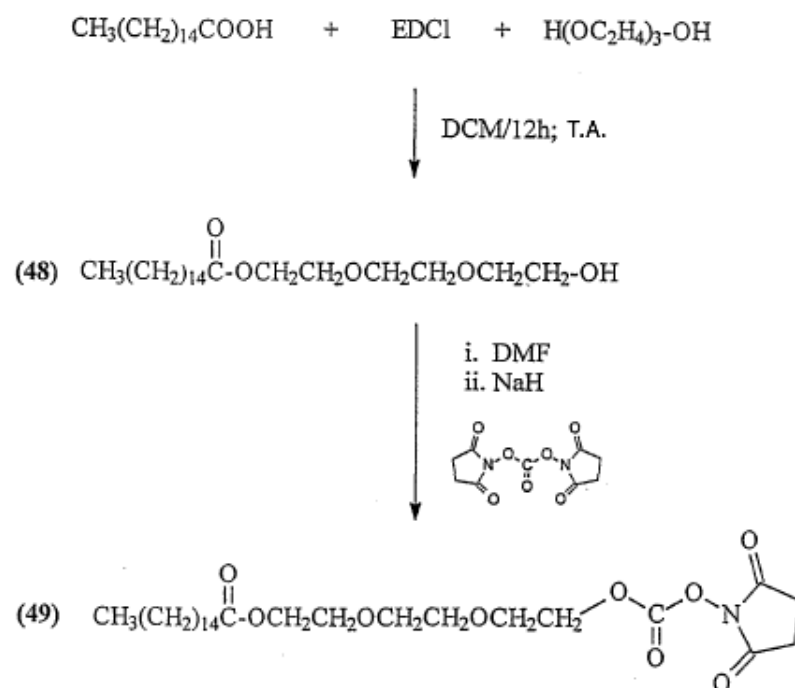


Figura 9

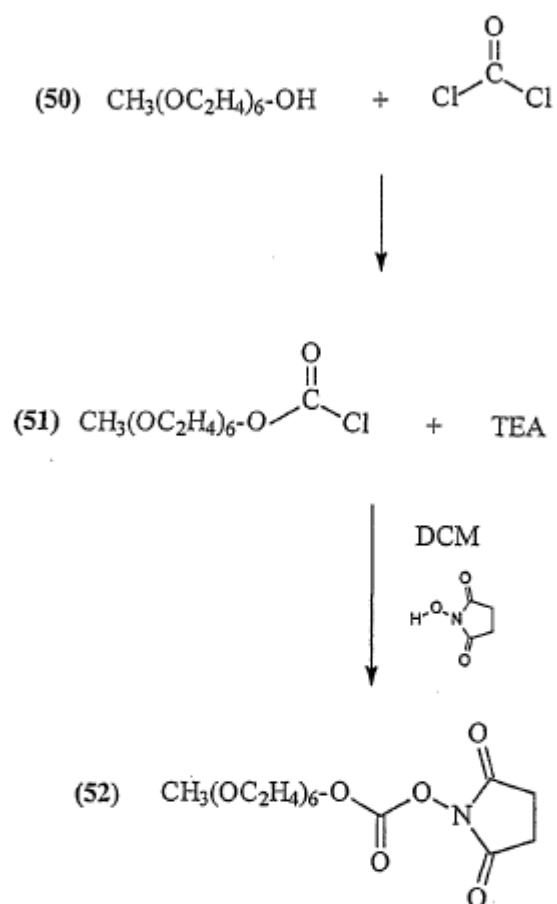


Figura 10

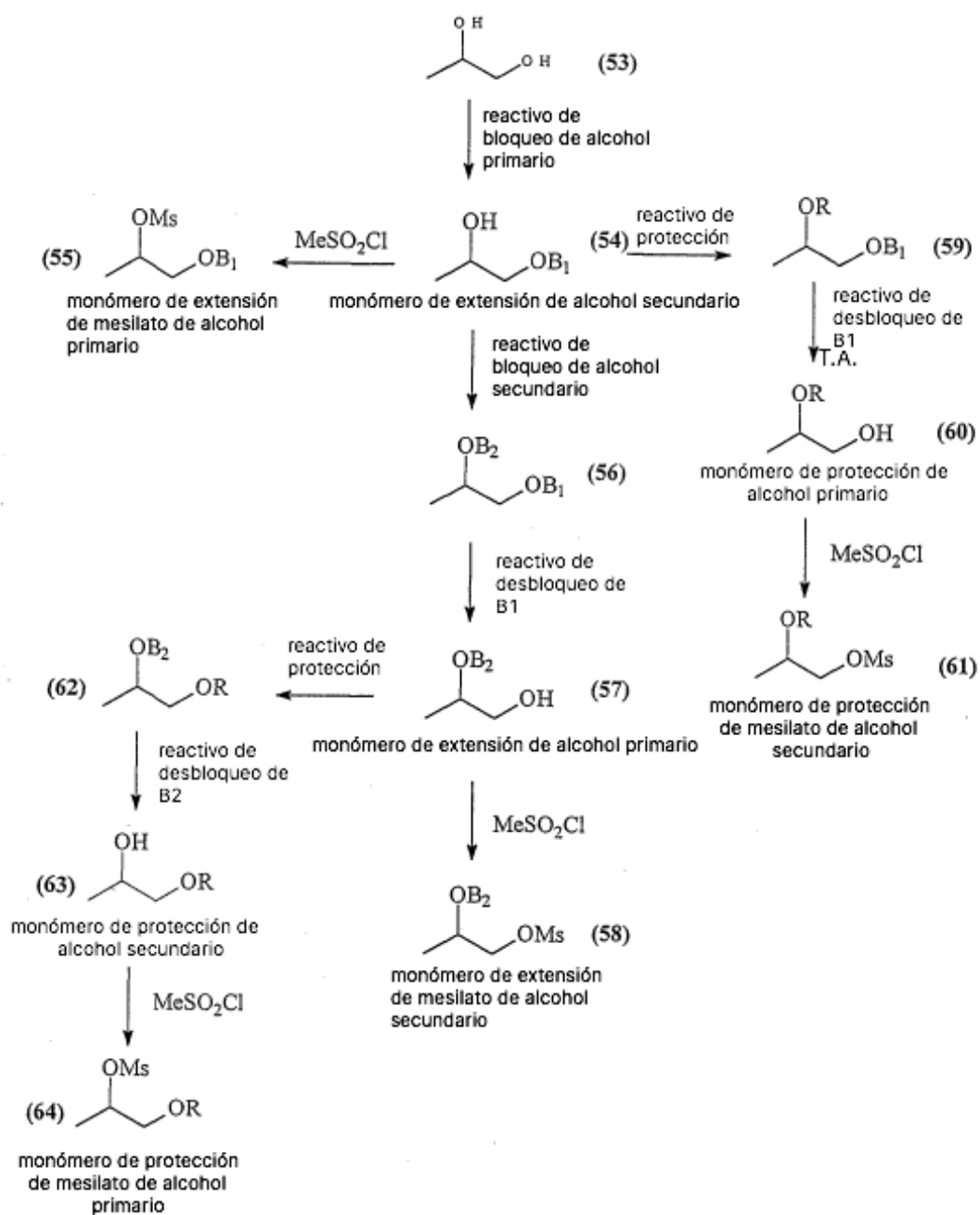


Figura 11

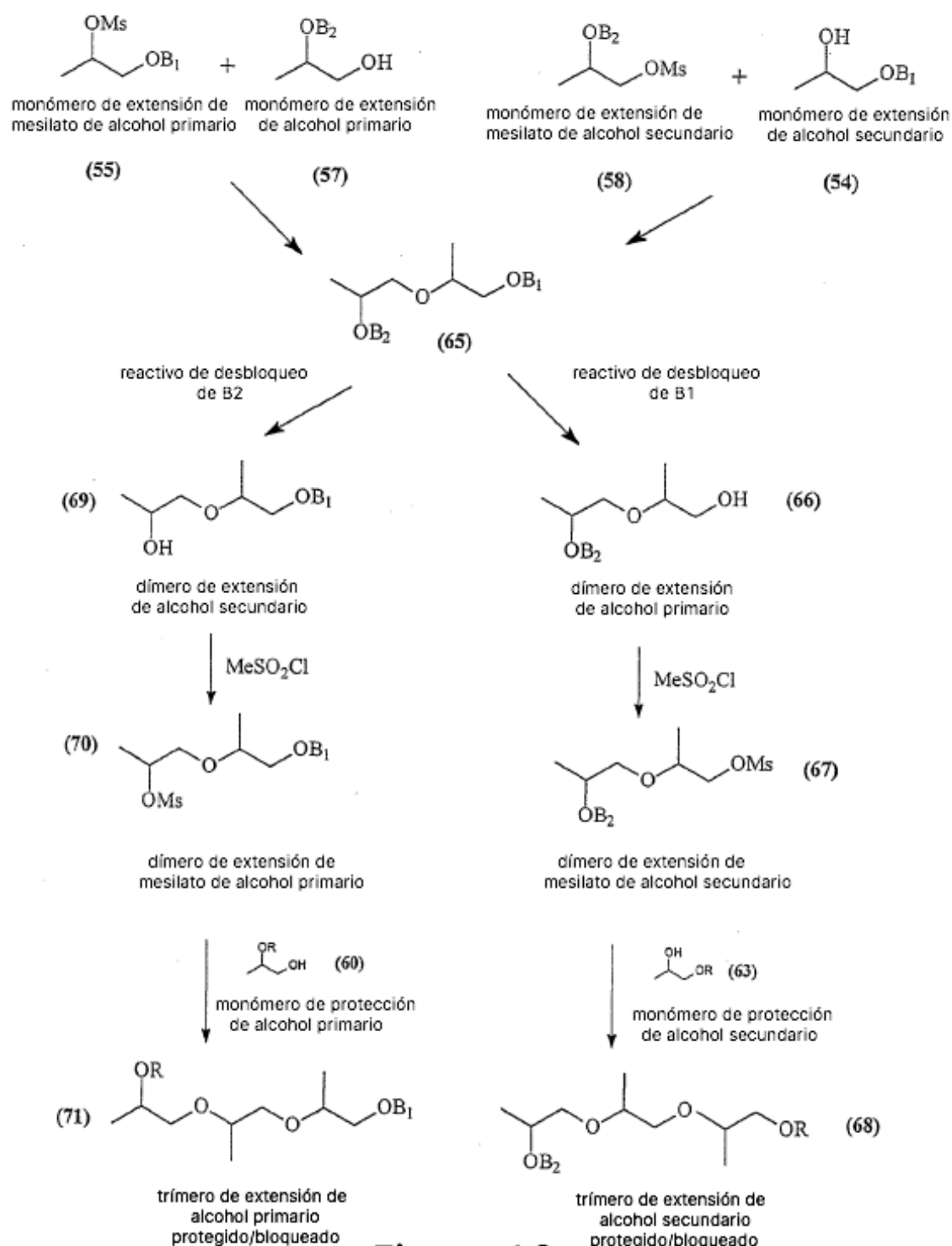


Figura 12

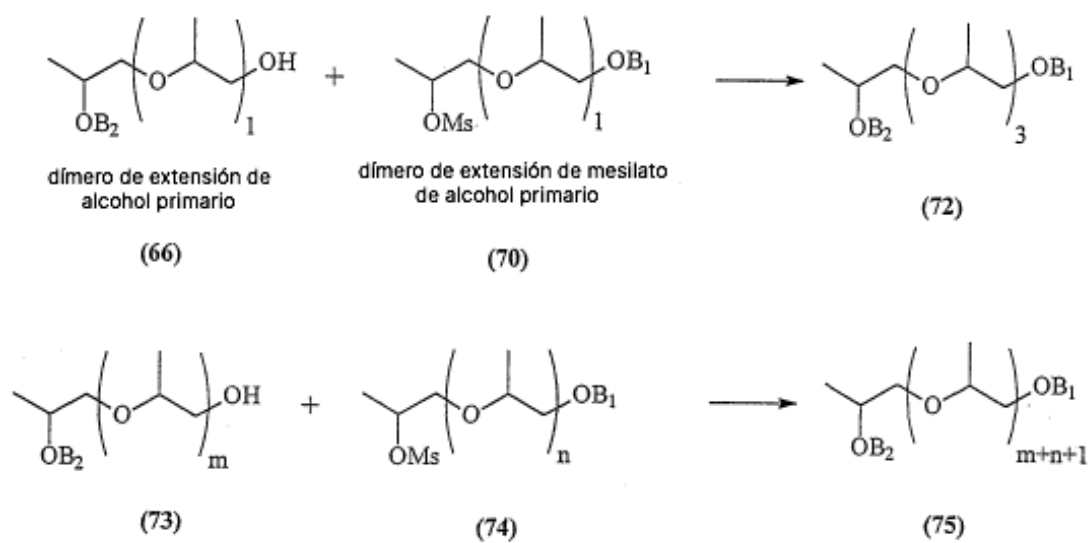


Figura 13

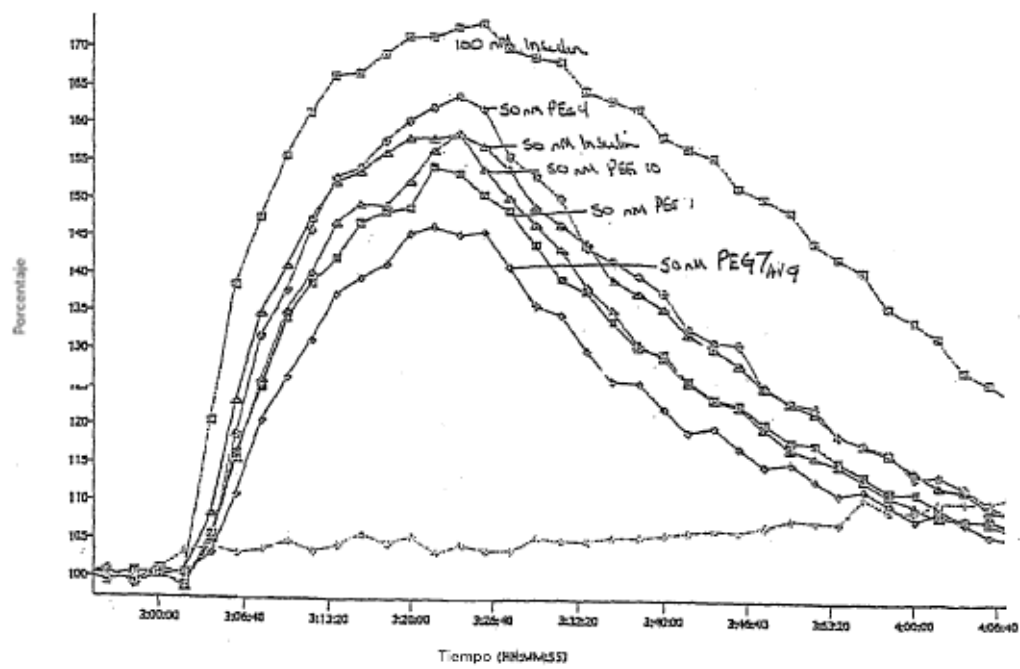


Figura 14

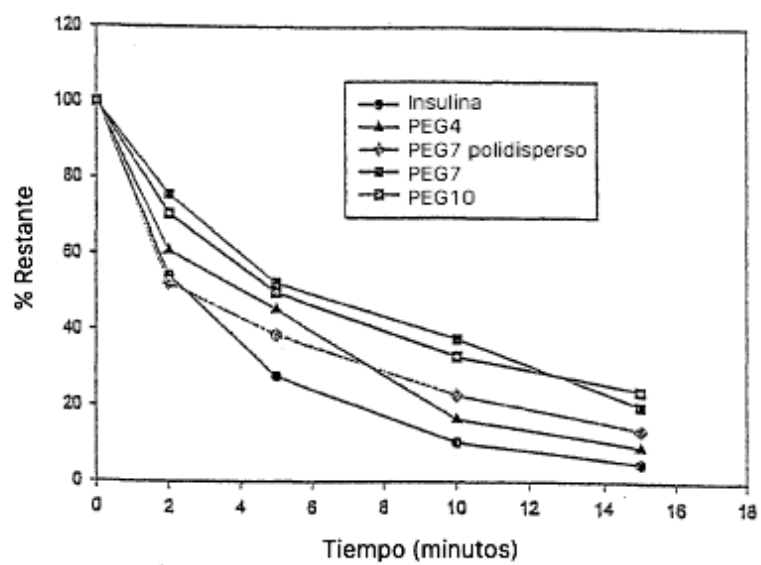


Figura 15

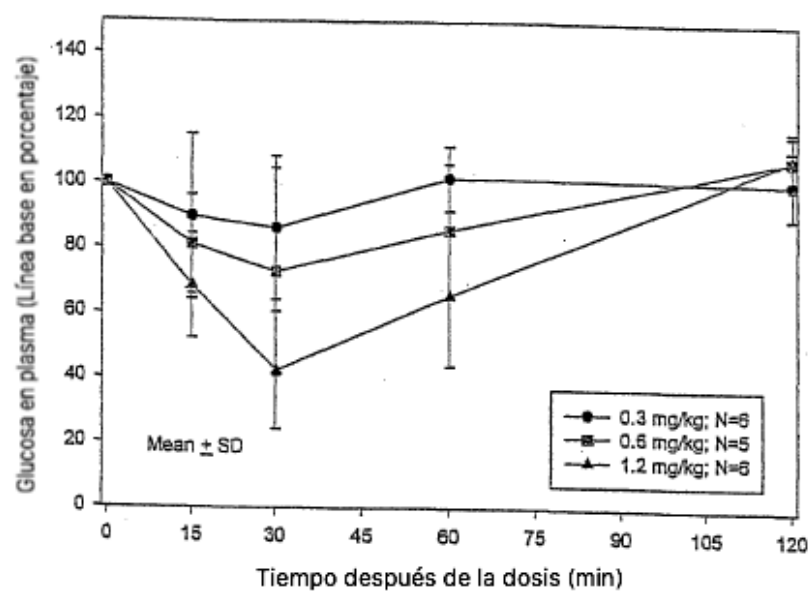


Figura 16

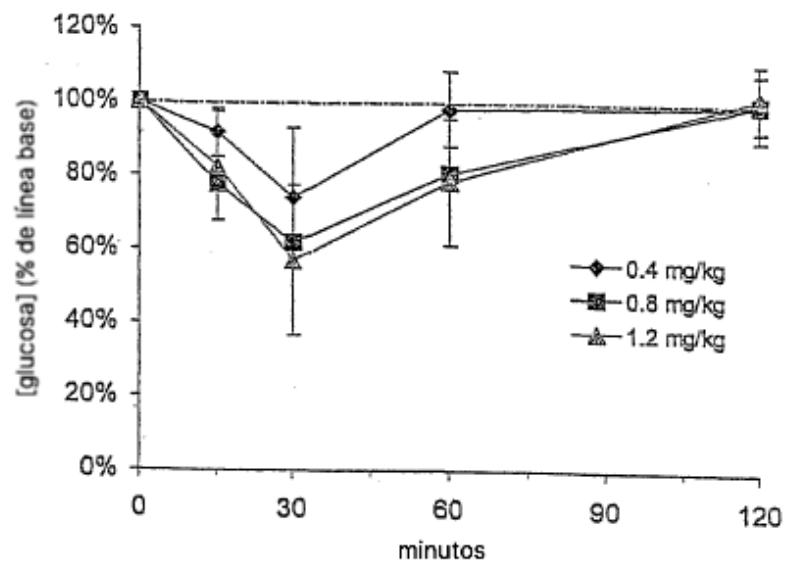


Figura 17

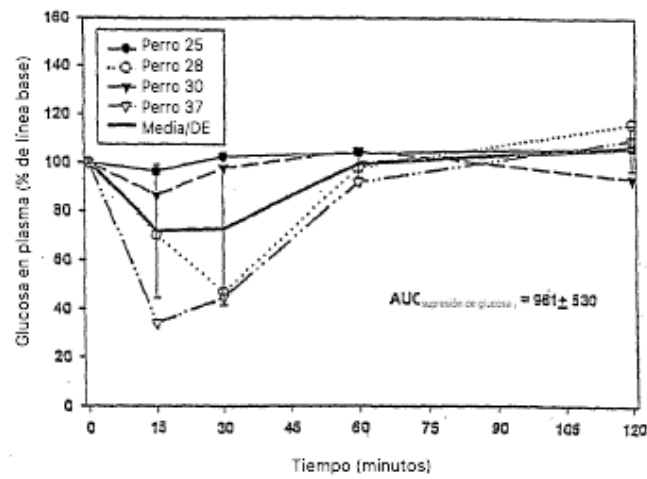


Figura 18

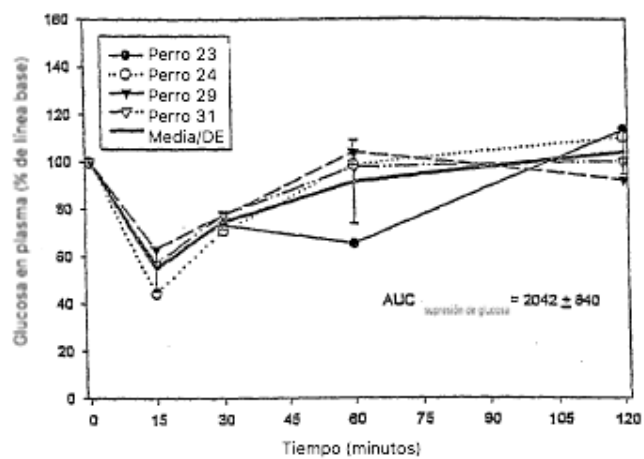


Figura 19

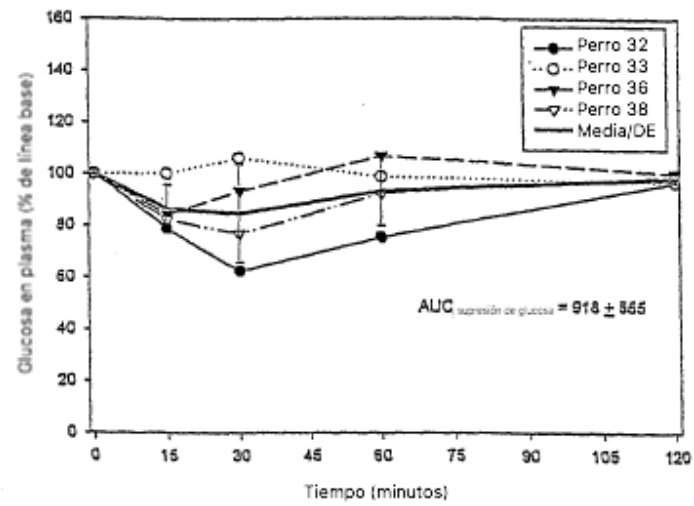


Figura 20

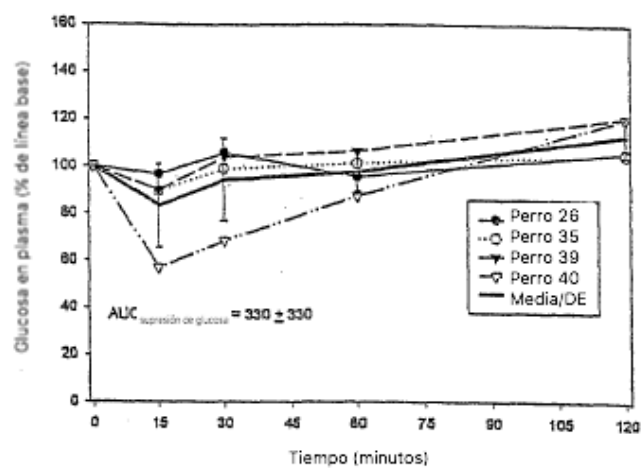


Figura 21