

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 937**

51 Int. Cl.:

A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2004 PCT/US2004/007310**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2004 WO04083234**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2004 E 04719724 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 1613343**

54 Título: **Conjugados de polipéptido de insulina y oligómero, conjugados de polipéptido de proinsulina y oligómero y métodos para su síntesis**

30 Prioridad:

14.03.2003 US 389499

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

19.05.2017

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.;
RADHAKRISHNAN, BALASINGAM;
SOLTERO, RICHARD;
PUSKAS, MONICA y
SANGAL, DITI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 612 937 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

- 5 Conjugados de polipéptido de insulina y oligómero, conjugados de polipéptido de proinsulina y oligómero y métodos para su síntesis
- Campo de la invención
- La presente invención se refiere a conjugados de insulina y métodos para sintetizar tales conjugados.
- 10 Antecedentes de la invención
- El polipéptido de insulina es la principal hormona responsable de controlar el transporte, uso y almacenamiento de glucosa en el cuerpo. Las células-[beta] de los islotes pancreáticos secretan un precursor de insulina de una sola cadena, conocido como proinsulina. La proteólisis de la proinsulina resulta en la eliminación de ciertos aminoácidos básicos en la cadena de proinsulina junto con el péptido conector (péptido C) para producir el polipéptido de insulina biológicamente activo.
- 15 La molécula de insulina se ha conservado mucho en la evolución y consiste, generalmente, en dos cadenas de aminoácidos unidas por puentes disulfuro. En la molécula de insulina humana natural, de dos cadenas (PM 5,800 Dalton), la cadena A se compone de 21 residuos de aminoácidos y tiene glicina en el extremo amino terminal y la cadena B tiene 30 residuos de aminoácidos y fenilalanina en el extremo amino terminal.
- 20 La insulina puede existir como un monómero o puede agregarse como un dímero o un hexámero formado a partir de tres de los dímeros. La actividad biológica, es decir, la capacidad de unirse a receptores y estimular las acciones biológicas de la insulina, reside en el monómero.
- 25 La diabetes es un trastorno biológico que involucra un metabolismo de carbohidratos incorrecto. La diabetes es el resultado de la producción insuficiente de, o la reducción de la sensibilidad a, la insulina. En personas con diabetes, la capacidad normal de usar la glucosa se inhibe, lo que conduce al aumento de los niveles de azúcar en la sangre (hiperglucemia). Dado que la glucosa se acumula en la sangre, los niveles excesivos de azúcar se excretan en la orina (glucosuria). Otros síntomas de diabetes incluyen el aumento del volumen y la frecuencia de las micciones, sed, picazón, hambre, pérdida de peso, y debilidad.
- 30 Existen dos variedades de diabetes. El tipo I es la diabetes mellitus dependiente de insulina, o IDDM. La IDDM se conocía anteriormente como "diabetes con inicio en la juventud". En la IDDM, la insulina no es secretada por el páncreas y debe ser proporcionada desde una fuente externa. La diabetes Tipo II o con inicio en edad adulta puede controlarse normalmente con la dieta, aunque en algunos casos avanzados, se requiere la administración de insulina.
- 35 La diabetes no tratada conduce a la cetosis, la acumulación de cetonas, que son productos de la degradación de las grasas, en la sangre. Tras la cetosis se produce la acumulación de ácido en la sangre (acidosis), náuseas y vómitos. A medida que los productos tóxicos del metabolismo alterado de carbohidratos y grasas se acumulan, el paciente entra en coma diabético, lo que conduce a la muerte. Antes del aislamiento de la insulina en la década de 1920, la mayoría de los pacientes morían poco después de la aparición de la enfermedad.
- 40 El uso de insulina como tratamiento para la diabetes data de 1922, cuando Banting y otros ("Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus," Can. Med. Assoc. J., 12:141-146 (1922)) demostraron que el extracto activo del páncreas tenía efectos terapéuticos en perros diabéticos. En ese mismo año, el tratamiento de un paciente diabético con extractos pancreáticos resultó en una mejora clínica drástica, salvadora.
- 45 Hasta hace poco, se usó la insulina bovina y porcina casi exclusivamente para tratar la diabetes en seres humanos. En la actualidad, sin embargo, se conocen numerosas variaciones en la insulina entre especies. Cada variación difiere de la insulina humana natural en que tiene sustitución de aminoácidos en una o más posiciones en la cadena A y/o la B. A pesar de estas diferencias la mayoría de las insulinas de mamíferos tienen una actividad específica comparable. El advenimiento de la tecnología recombinante ha permitido la fabricación a escala comercial de la insulina humana (por ejemplo, insulina Humulin™, disponible comercialmente de Eli Lilly and Company, Indianapolis, Ind.) o insulina diseñada por ingeniería genética que tiene actividad biológica comparable con la de la insulina humana natural.
- 50 El tratamiento de la diabetes por lo general requiere inyecciones regulares de insulina. Debido a la inconveniencia de las inyecciones de insulina, se han realizado enormes esfuerzos para mejorar la administración de insulina y su bioasimilación.
- 55 Se han realizado intentos de suministrar insulina mediante la administración por vía oral. Los problemas asociados con la administración de insulina por vía oral para lograr la euglucemia en pacientes diabéticos se encuentran bien documentados en la literatura farmacéutica y médica. Las enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal degradan rápidamente la insulina, lo que resulta en productos de degradación biológicamente inactivos. En el estómago, por
- 60
- 65

ejemplo, la insulina administrada por vía oral sufre proteólisis enzimática y degradación ácida. Una degradación proteolítica comparable de insulina se produce en el intestino. En el lumen, la insulina es atacada por una variedad de enzimas que incluyen enzimas gástricas y pancreáticas, exopeptidasas y endopeptidasas, y peptidasas del borde en cepillo. Incluso si la insulina sobrevive a este ataque enzimático, las barreras biológicas que deben atravesarse antes de que la insulina pueda llegar a sus receptores *in vivo* pueden limitar su biodisponibilidad después de la administración de insulina por vía oral. Por ejemplo, la insulina puede tener baja permeabilidad de membrana, lo que limita su capacidad de pasar desde el lumen intestinal hacia el torrente sanguíneo.

Algunos esfuerzos para proporcionar una forma oral de insulina se han enfocado en proporcionar conjugados de insulina y oligómeros. La insulina humana y muchas insulinas estrechamente relacionadas que se usan terapéuticamente contienen tres residuos de aminoácidos que tienen grupos amino primarios libres. Los tres grupos amino primarios, específicamente los N terminales (grupos alfa amino) de las cadenas A y B (Gli^{A1} y Fen^{B1}) y el grupo epsilon amino de la Lis^{B29}, pueden modificarse por conjugación con oligómeros. En dependencia de las condiciones de reacción, la N-acilación de una insulina desprotegida conduce a una mezcla compleja de mono, di, y triconjugados (por ejemplo, insulina monoconjugada en Gli^{A1}, insulina monoconjugada en Fen^{B1}, insulina monoconjugada en Lis^{B29}, insulina diconjugada en Gli^{A1} y Fen^{B1}, insulina diconjugada en Gli^{A1} y Lis^{B29}, insulina diconjugada en Fen^{B1} y Lis^{B29}, e insulina triconjugada en Gli^{A1}, Fen^{B1}, y Lis^{B29}). Cuando un conjugado particular, por ejemplo, insulina monoconjugada en Lis^{B29}, se desea, puede ser trabajoso y/o caro separar (o purificar) una mezcla compleja de conjugados tal para obtener el conjugado deseado.

Como resultado, se han realizado varios esfuerzos para sintetizar selectivamente el conjugado de insulina deseado. Por ejemplo, Muranishi y Kiso, en la solicitud de patente japonesa 1-254,699, proponen una síntesis en cinco etapas para preparar derivados de insulina con ácidos grasos. Los grupos amino A1 y B1 de la insulina se encuentran protegidos (o bloqueados) con p-metoxibenzoxycarbonil azida (pMZ). Después de la acilación con un éster de ácido graso, los grupos de protección (bloqueo) se eliminan para proporcionar insulina monoacilada en Lis(B29) con un ácido graso. Como otro ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,750,497 otorgada a Havelund y otros propone tratar la insulina humana con un reactivo Boc (por ejemplo, di-terc-butil dicarbonato) para formar (A1,B1)-diBoc insulina humana, es decir, insulina humana en la que el extremo N terminal de ambas cadenas A y B están protegidas por un grupo Boc. Después de una purificación opcional, por ejemplo, por HPLC, se introduce un grupo acilo lipofílico en el grupo epsilon-amino de la Lis^{B29} al permitir la reacción del producto con un éster de N-hidroxisuccinimida de la fórmula X-OSu en donde X es el grupo acilo lipofílico a introducir. En la etapa final, se usa ácido trifluoroacético para eliminar los grupos Boc y el producto, insulina humana N^{epsilonB29}-X, se aísla.

Varios otros esfuerzos se han realizado para sintetizar preferencialmente el conjugado de insulina deseado para proporcionar una mezcla de conjugados en la que el conjugado de insulina deseado es el producto preferido. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,646,242 otorgada a Baker y otros, propone una reacción que se realiza sin el uso de grupos protectores de amino. Baker propone la reacción de un éster graso activado con el grupo epsilon-amino de la insulina en condiciones básicas en un solvente polar. La acilación del grupo epsilon-amino depende de la basicidad de la reacción. A un pH mayor que 9.0, la reacción acila preferencialmente el grupo epsilon-amino de la lisina B29 sobre los grupos alpha-amino. Los ejemplos 1 hasta el 4 informan los rendimientos de reacción de la insulina monoconjugada como un porcentaje de la cantidad inicial de insulina entre 67.1 % y 75.5 %. En el Ejemplo 5, Baker propone, además, la acilación de la proinsulina humana con palmitato de N-succinimidilo. Las relaciones exactas de especies aciladas en epsilon-amino respecto a las especies aciladas en alpha-amino no se calcularon. La suma de todas las especies aciladas en epsilon-amino dentro del cromatograma correspondía al 87-90 % del área total, mientras que la suma de todas las sustancias relacionadas (que supuestamente incluyen cualquiera de las especies aciladas en alpha-amino) correspondía a <7 % del área total, para cualquier punto en el tiempo dado.

La patente núm. WO 02/065985 otorgada a Ekwuribe y otros describe la síntesis de insulina conjugada en Lis B29 con oligómero de hexil-PEG7 (HIM2) a partir de proinsulina recombinante sin proceso de transpeptidación.

La presente invención supera las limitaciones anteriores en la técnica al proporcionar métodos para la síntesis sitio específica de conjugados de insulina y oligómero particulares que son menos trabajosos y/o más rentables que los métodos convencionales.

Breve descripción de la invención

Cuando se comparan con los esquemas convencionales descritos anteriormente, las modalidades de la presente invención proporcionan un esquema de fabricación comercialmente más barato y/o de mayor rendimiento para producir conjugados de insulina y oligómero cuando la conjugación sitio específica es conveniente (por ejemplo, cuando es conveniente proporcionar una insulina monoconjugada que tiene el oligómero acoplado a la Lis B-29 de la molécula de insulina). A diferencia de los esquemas convencionales, que proponen la conjugación selectiva de la insulina mediante el bloqueo de los extremos N terminales de la insulina con compuestos tales como p-metoxibenzoxycarbonil azida (Muranishi y Kiso) o mediante el intento de controlar las condiciones de reacción para reducir pero no eliminar la conjugación en los extremos N terminales de la insulina (Baker), las modalidades de la presente invención acoplan el

oligómero a la Lis B-29 de proinsulina artificial (por ejemplo, proinsulina acoplada en el extremo N terminal de su cadena B a un péptido líder).

Después, el péptido C presente y el péptido líder (si está presente) se escinden del conjugado de proinsulina y oligómero para proporcionar insulina monoconjugada en Lis B-29 con el oligómero. Las modalidades de la presente invención pueden proporcionar elevada especificidad de sitio para la modificación en Lis B-29. Los métodos de acuerdo con las modalidades de la presente invención que usan polipéptidos de proinsulina pueden proporcionar elevada conversión a producto modificado en B-29, por ejemplo, con rendimientos tan elevados como 80 % o más, en comparación con los que se obtienen por medio de las rutas de insulina convencionales.

De acuerdo con ciertas modalidades, la invención proporciona un método para sintetizar un conjugado de polipéptido de insulina y oligómero que incluye poner en contacto un polipéptido de proinsulina artificial, como se describe en la reivindicación 1 con un oligómero que comprende una porción hidrofílica y una porción lipofílica en condiciones suficientes para acoplar el oligómero al polipéptido de proinsulina en Lis29 de la cadena B del polipéptido de proinsulina y proporcionar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero, en donde las condiciones suficientes para acoplar el oligómero al polipéptido de proinsulina comprenden la acilación con un éster de hidroxisuccinimida a la Lis29 de la cadena B de la insulina, y en donde la porción hidrofílica comprende una porción de polialquilenglicol, y escindir el péptido líder y los polipéptidos no insulínicos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero con una enzima de escisión para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra modalidades de una vía de síntesis para la preparación de insulina modificada en Lis B-29 con el uso de una proinsulina que tiene un péptido líder;

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

La Figura 3 ilustra un espectro m.s. de monoconjugado de proinsulina II purificado;

La Figura 4 ilustra un espectro m.s. de diconjugado de proinsulina II purificado;

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

La Figura 6 ilustra un espectro m.s. del producto de escisión con tripsina de un monoconjugado de proinsulina II;

La Figura 7 ilustra un perfil de HPLC de insulina(Arg³¹) con hexil-PEG7 escindida por carboxipeptidasa B;

La Figura 8 ilustra un espectro m.s. del producto de la escisión con carboxipeptidasa de conjugado de insulina(Arg³¹) acilada en B-29 con hexil-PEG7;

La Figura 9 ilustra un perfil de HPLC de la producción de insulina-hexil-PEG7 (polidisperso) a partir de monoconjugado de proinsulina II escindido por un cóctel de enzimas de carboxipeptidasa B y tripsina;

La Figura 10 ilustra un espectro m.s. de insulina-hexil-PEGn (polidisperso) por medio de proinsulina II;

La Figura 11 ilustra un perfil de HPLC de la producción de insulina acilada en B-29 con hexil-PEG7 por medio de proinsulina I;

La Figura 12 ilustra un espectro m.s. de insulina acilada en B-29 con hexil-PEG7 por medio de proinsulina I;

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

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

La Figura 15 ilustra un perfil de HPLC de la producción de monoconjugado de insulina con hexil-PEG7 a partir de la reacción de diconjugado de proinsulina I con cóctel de enzimas de carboxipeptidasa B y tripsina;

La Figura 16 ilustra un perfil de HPLC de la producción de insulina (producto secundario) a partir de la reacción de monoconjugado A de proinsulina I con cóctel de enzimas de carboxipeptidasa B y tripsina;

Las Figuras 17a y 17b ilustran los cromatogramas de HPLC del mapeo peptídico de PEG7 HIM2 producido a partir de insulina y PEG7 HIM2 producido a partir de proinsulina;

Las Figuras 18a y 18b ilustran los perfiles de biopotencia de MBGA de conjugados con oligómeros de esta invención producidos a partir de insulina;

Las Figuras 19a y 19b ilustran los perfiles de biopotencia de MBGA de conjugados con oligómeros de esta invención producidos a partir de proinsulina;

La Figura 20 ilustra la estructura de un hexaetilenglicol monohexadecil éter activado (oligómero de hexadecil-PEG6 activado);

La Figura 21 ilustra un espectro de masa de conjugado de Proinsulina II Mono B con hexadecil-PEG6;

La Figura 22 ilustra un espectro de masa de conjugado de Proinsulina II Mono A con hexadecil-PEG6;

La Figura 23 ilustra un espectro de masa de diconjugado de Proinsulina II con hexadecil-PEG6;

La Figura 24 ilustra un cromatograma de HPLC de la reacción de conjugación de hexadecil-PEG6 activado con proinsulina II;

La Figura 25 ilustra un espectro de Es-masa para insulina conjugada en LisB29 con oligómero de hexadecil-PEG6;

La Figura 26 ilustra un cromatograma de HPLC de una reacción con cóctel de enzimas de una mezcla de proinsulina II conjugada con hexadecil-PEG6;

La Figura 27 ilustra las estructuras de octaetilenglicol monohexadecil éter activado (C16-PEG8) y tetraetilenglicol monohexadecil éter activado (C16-PEG4);

La Figura 28 ilustra un espectro de masa MALDI de conjugado en LisB29 con oligómero de hexil-PEG7 a partir de la reacción con cóctel de enzimas de los conjugados de proinsulina natural con oligómero de hexil-PEG7;

La Figura 29 ilustra un espectro de masa MALDI de conjugado en FenB1, LisB29 con di(oligómero de hexil-PEG7) a partir de la reacción con cóctel de enzimas de conjugados de proinsulina natural con oligómero de hexil-PEG7;

5 La Figura 30 ilustra un espectro de masa MALDI de insulina humana aislada a partir de la reacción con cóctel de enzimas de monoconjugado de proinsulina II con oligómero de hexil-PEG7 (proinsulina mono);

La Figura 31 ilustra un espectro de masa MALDI de conjugado de insulina en Lis29 con oligómero de hexil-PEG7 a partir de la reacción con cóctel de enzimas del monoconjugado de proinsulina II con oligómero de hexil-PEG7 (proinsulina II mono);

10 La Figura 32 ilustra un espectro de masa MALDI de conjugado de insulina en Lis29 con oligómero de hexil-PEG7 a partir de la reacción con cóctel de enzimas de diconjugado de proinsulina II con oligómero de hexil-PEG7 (Proinsulina II Di);

La Figura 33 ilustra la conjugación a precursor DesTre de una sola cadena;

La Figura 34 ilustra el constructo 1 sin transpeptidación del precursor de insulina de una sola cadena;

15 La Figura 35 ilustra un constructo sin transpeptidación de un precursor de insulina de una sola cadena con un péptido líder;

La Figura 36 ilustra una ruta directa al conjugado de insulina modificada en Lis B-29 a partir del precursor de insulina de una sola cadena 3 sin transpeptidación; y

20 La Figura 37 ilustra una ruta directa al conjugado de insulina modificada en Lis B-29 a partir de un precursor de insulina de una sola cadena sin transpeptidación por medio de un cóctel de enzimas.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se describirá ahora más completamente de aquí en adelante con referencia a las figuras acompañantes, en las que se muestran varias modalidades de la invención.

Todas las abreviaturas de aminoácidos que se usan en esta descripción son las aceptadas por la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos como se expone en 37 C.F.R. § 1.822(b).

30 Como se usa en la presente descripción, el término "entre" cuando se usa para describir varios intervalos debe interpretarse como que incluye los puntos extremos de los intervalos descritos.

35 Como se usa en la presente descripción, el término "sustancialmente monodispersa" se usa para describir una mezcla de compuestos donde al menos aproximadamente el 95 por ciento de los compuestos en la mezcla tienen el mismo peso molecular.

Como se usa en la presente descripción, el término "monodispersa" se usa para describir una mezcla de compuestos en donde aproximadamente el 100 por ciento de los compuestos en la mezcla tienen el mismo peso molecular.

40 Como se usa en la presente descripción, el término "polipéptido de insulina" significa un polipéptido que tiene al menos parte de la actividad biológica de la insulina (por ejemplo, la capacidad de afectar el cuerpo a través del mecanismo de acción principal de la insulina). Por ejemplo, un polipéptido de insulina puede ser un polipéptido tal como insulina que tiene un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B acoplado al polipéptido de cadena A por puentes disulfuro. En varias modalidades de la presente invención, el polipéptido de insulina puede tener una mayoría de la actividad biológica de la insulina, y puede tener sustancialmente toda la actividad biológica de la insulina, y en algunas modalidades, tiene toda la actividad biológica de la insulina. En ciertas modalidades de esta invención, un polipéptido de insulina puede tener actividad biológica de insulina aumentada. El aumento de la actividad con relación a la insulina está presente, por ejemplo, cuando la administración produce un efecto de disminución de glucosa que es mayor que el efecto de disminución de glucosa de una cantidad de insulina correspondiente.

50 Como se usa en la presente descripción, el término "polipéptido de proinsulina" significa un polipéptido de insulina que está acoplado a uno o más polipéptidos no insulínicos (por ejemplo, péptidos líder y/o péptidos conectores o C) por enlace(s) peptídico(s) que son capaces de escindirse *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, un polipéptido de proinsulina puede incluir un polipéptido de insulina, tal como insulina, que tiene un polipéptido de cadena A acoplado a un polipéptido de cadena B por enlaces tales como puentes disulfuro, y un péptido conector acoplado al extremo C terminal del polipéptido de cadena B y acoplado al extremo N terminal del polipéptido de cadena A por enlaces peptídicos que son capaces de escindirse *in vitro* y/o *in vivo*. Como otro ejemplo, un polipéptido de proinsulina puede incluir un polipéptido de insulina, tal como insulina, que tiene un polipéptido de cadena A acoplado a un polipéptido de cadena B por enlaces tales como puentes disulfuro, un péptido conector acoplado al extremo C terminal del polipéptido de cadena B y acoplado al extremo N terminal del polipéptido de cadena A por enlaces peptídicos que son capaces de escindirse *in vitro* y/o *in vivo*, y un péptido líder acoplado al extremo N terminal del polipéptido de cadena B. Los polipéptidos de proinsulina ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, proinsulina, análogos de proinsulina, fragmentos de proinsulina, fragmentos de análogos de proinsulina, o cualquiera de proinsulina, análogos de proinsulina, fragmentos de proinsulina, fragmentos de análogos de proinsulina que tienen un péptido líder; preproinsulina, análogos de preproinsulina, fragmentos de preproinsulina, fragmentos de análogos de preproinsulina, mini-proinsulina, y proteínas de fusión.

5 Como se usa en la presente descripción, el término "insulina" incluye, pero no se limita a, la insulina de cualquiera de una o más de las siguientes especies: humano, vaca, cerdo, oveja, caballo, perro, pollo, pato o ballena, así como cualquier otra especie actualmente conocida o que se identifique posteriormente por producir insulina. La insulina de esta invención puede proporcionarse mediante fuentes naturales, sintéticas, o diseñadas por ingeniería genética (por ejemplo, recombinantes). En varias modalidades de la presente invención, la insulina puede ser insulina humana.

10 Como se usa en la presente descripción, "precursor de insulina de una sola cadena" o "SCIP" incluye un precursor de polipéptido de insulina que carece de un péptido C. El SCIP puede tener un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, donde el extremo N o C terminal de la cadena A está acoplado al extremo C o N terminal de la cadena B mediante un péptido conector que tiene entre un límite inferior de -10, -9, -8, -7, -6, -5, -4, -3, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 y un límite superior de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 residuos de aminoácidos. El SCIP puede incluir, además, una secuencia líder.

15 Como se usa en la presente descripción, el término "análogo de insulina" incluye insulina en donde uno o más de los aminoácidos se han sustituido mientras conserva parte o toda la actividad de la insulina. El análogo se describe al señalar los aminoácidos de sustitución con la posición de la sustitución como un superíndice seguido de una descripción de la insulina. Por ejemplo, "Pro^{B29}insulina, humana" significa que la lisina que se encuentra típicamente en la posición B29 de una molécula de insulina humana se ha sustituido con prolina. Un análogo de insulina de esta invención puede incluir, además, un polipéptido de insulina que tiene más aminoácidos que el número de aminoácidos presentes en la insulina nativa. Los ejemplos de tales análogos pueden incluir, pero no se limitan a, insulina-Arg^{B31} (producida como se describe en el Ejemplo 14 en la presente descripción, después de la escisión con tripsina del péptido C de la proinsulina, pero antes de la escisión con carboxipeptidasa), insulina-Arg^{A0}, que sería el resultado de la escisión ineficiente de un péptido líder de la cadena A, e insulina-Xaa^{B0}, en donde Xaa es cualquier aminoácido, que podría resultar, por ejemplo, del uso de un péptido C no nativo que se escindió de manera ineficiente. Un análogo de insulina de esta invención incluye, además, un polipéptido de insulina que tiene menos aminoácidos que el número de aminoácidos presentes en la insulina nativa debido a la delección de aminoácidos y/o un polipéptido de insulina que tiene más del número de aminoácidos presentes en la insulina nativa debido a la inserción de aminoácidos adicionales en la cadena de aminoácidos del polipéptido de insulina. Los análogos de insulina de esta invención pueden incluir, además, cualquier combinación de los análogos de insulina descritos para esta invención

20 Los análogos de insulina pueden obtenerse por varios medios, como entenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en la estructura de la insulina sin pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígenos de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Como la capacidad interactiva y la naturaleza de la insulina definen su actividad biológica funcional, ciertas sustituciones de secuencia de aminoácidos pueden hacerse en la secuencia de aminoácidos y sin embargo mantenerse como un polipéptido con propiedades similares.

25 Para hacer tales sustituciones, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en conferir la función biológica interactiva en un polipéptido se entiende generalmente en la técnica. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria del polipéptido resultante, lo que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en base a sus características de hidrofobicidad y carga de la siguiente manera: 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 entenderán los expertos en la técnica, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o puntuación similar y aún resultar en un polipéptido con actividad biológica similar, es decir, aún se obtiene un polipéptido con función biológica equivalente. Para hacer tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 entre sí, aquellos que están dentro de ± 1 entre sí se prefieren particularmente, y aquellos dentro de ± 0.5 entre sí se prefieren aun más particularmente.

30 Además, en la técnica se entiende que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse eficazmente en base a la hidrofiliidad. La patente de los Estados Unidos 4,554,101, proporciona que la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, determinada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la patente de los Estados Unidos 4,554,101, los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a los residuos de aminoácidos: arginina (+3.0); lisina (± 3.0); aspartato ($+3.0 \pm 1$); glutamato ($+3.0 \pm 1$); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0.4); prolina (-0.5 ± 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 entienden los expertos en la técnica, un aminoácido puede sustituirse por otro que tiene un valor de hidrofiliidad similar y aún obtenerse un polipéptido biológicamente equivalente, y en particular, inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 entre sí, aquellos que están dentro de ± 1 entre sí se prefieren particularmente, y aquellos dentro de ± 0.5 entre sí se prefieren aun más particularmente.

5 Como se describió anteriormente, por lo tanto, las sustituciones/inserciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofili-
 10 cidad, carga, tamaño, y similares. Las sustituciones ilustrativas (es decir, aminoácidos que pueden intercambiarse sin alterar significativamente la actividad biológica del polipéptido) que toman en consideración varias de las características anteriores son muy conocidas para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

10 Como entenderán los expertos en la técnica, los análogos de insulina pueden prepararse mediante una variedad de técnicas de síntesis de péptidos reconocidas que incluyen, pero no se limitan a, métodos clásicos (solución), métodos en fase sólida, métodos semisintéticos, y métodos de ADN recombinante.

15 Los ejemplos de análogos de insulina humana incluyen, pero no se limitan a, Gln^{A21} insulina, humana; Gln^{A21} Gln^{B3} insulina, humana; Ala^{A21} insulina, humana; Ala^{A21} Gln^{B3} insulina, humana; Gln^{B3} insulina, humana; Gln^{B30} insulina, humana; Gln^{A21} Glu^{B30} insulina, humana; Gln^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30} insulina, humana; Gln^{B3} Glu^{B30} insulina, humana; Asp^{B28} insulina, humana; Lis^{B28} insulina, humana; Leu^{B28} insulina, humana; Val^{B28} insulina, humana; Ala^{B28} insulina, humana; Asp^{B28} Pro^{B29} insulina, humana; Lis^{B28} Pro^{B29} insulina, humana; Leu^{B28} Pro^{B29} insulina, humana; Val^{B28} Pro^{B29} insulina, humana; Ala^{B28} Pro^{B29} insulina, humana, así como cualquier otro análogo de insulina conocido en la actualidad o que se identifique posteriormente. Un análogo de insulina puede comprender, además, una molécula de insulina que comprende una cadena B con lisinas adicionales añadidas.

25 Como se usa en la presente descripción, el término "fragmento de insulina" incluye un segmento de la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la insulina que conserva parte o toda la actividad de la insulina. Los fragmentos de insulina se denotan mediante la indicación de la o las posiciones en una secuencia de aminoácidos seguida de una descripción del aminoácido. Por ejemplo, un fragmento de "insulina humana B25-B30" sería la secuencia de seis aminoácidos correspondiente a las posiciones B25, B26, B27, B28, B29 y B30 en la secuencia de aminoácidos de la insulina humana.

30 Como se usa en la presente descripción, el término "análogo de fragmento de insulina" incluye un segmento de la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la molécula de insulina en donde uno o más de los aminoácidos en el segmento se han sustituido, insertado y/o eliminado, y/o uno o más aminoácidos exógenos se han insertado, mientras conserva parte o toda la actividad de la insulina.

35 Como se usa en la presente descripción, el término "proinsulina" incluye la proinsulina de cualquiera de una o más de las siguientes especies: humano, vaca, cerdo, oveja, caballo, perro, pollo, pato o ballena, así como cualquier otra especie actualmente conocida o que se identifique posteriormente por producir proinsulina. La proinsulina de esta invención puede proporcionarse mediante fuentes naturales, sintéticas, o diseñadas por ingeniería genética. En general, la proinsulina comprende insulina que tiene un péptido C que conecta el extremo N terminal de la cadena A de la insulina al extremo C terminal de la cadena B de la insulina. La proinsulina puede ser proinsulina humana.

40 Como se usa en la presente descripción, el término "análogo de proinsulina" incluye proinsulina en donde uno o más de los aminoácidos en la proinsulina se han sustituido, insertado y/o eliminado y/o uno o más aminoácidos exógenos se han insertado, como se describió anteriormente con respecto a los análogos de insulina mientras conserva parte o toda la actividad de la porción insulina de la proinsulina. Los análogos de proinsulina con sustituciones se describen al señalar los aminoácidos de sustitución con la posición de la sustitución como un superíndice seguido de una descripción de la proinsulina. Por ejemplo, "Pro^{B29} proinsulina, humana" significa que la lisina que se encuentra típicamente en la posición B29 de una molécula de proinsulina humana se ha sustituido con prolina.

45 Como se usa en la presente descripción, el término "fragmento de proinsulina" incluye un segmento de la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la proinsulina que conserva parte o toda la actividad biológica de la insulina, análogo de insulina o porción de fragmento de insulina del fragmento de proinsulina. Los fragmentos de proinsulina se denotan mediante la indicación de la o las posiciones en una secuencia de aminoácidos seguido de una descripción del aminoácido. Por ejemplo, un fragmento de "proinsulina humana B25-B35" sería la secuencia de once aminoácidos correspondiente a las posiciones B25, B26, B27, B28, B29, B30, B31, B32, B33, B34 y B35 en la secuencia de aminoácidos de la proinsulina humana.

50 Como se usa en la presente descripción, el término "análogo de fragmento de proinsulina" incluye un segmento de la secuencia de aminoácidos que se encuentra en una molécula de proinsulina en donde uno o más de los aminoácidos en el segmento se han sustituido, insertado y/o eliminado, y/o uno o más aminoácidos exógenos se han insertado, como se describió anteriormente con referencia a los análogos de insulina mientras conserva parte o toda la actividad de la insulina, análogo de insulina, fragmento de insulina, o porción de análogo de fragmento de insulina del fragmento de proinsulina.

55 Como se usa en la presente descripción, el término "preproinsulina" incluye la preproinsulina de cualquiera de una o más de las siguientes especies: humano, vaca, cerdo, oveja, caballo, perro, pollo, pato o ballena, así como cualquier

- otra especie actualmente conocida o que se identifique posteriormente por producir preproinsulina. La preproinsulina de esta invención puede proporcionarse mediante fuentes naturales, sintéticas, o diseñadas por ingeniería genética. En general, la preproinsulina es un polipéptido de una sola cadena (por ejemplo, un polipéptido que tiene un péptido líder acoplado al extremo N terminal de la cadena B de la insulina y que tiene el extremo C terminal de la cadena B acoplado al extremo N terminal de la cadena A mediante un péptido conector) en el que la cadena A se acopla a la cadena B mediante, por ejemplo, puentes disulfuro. La preproinsulina puede ser preproinsulina humana.
- 5
- Como se usa en la presente descripción, el término "análogo de preproinsulina" incluye preproinsulina en donde uno o más de los aminoácidos en la preproinsulina se han sustituido, insertado y/o eliminado, y/o uno o más aminoácidos exógenos se han insertado, como se describió anteriormente con respecto a los análogos de insulina mientras conserva parte o toda la actividad de la insulina o la porción de análogo de insulina del análogo de preproinsulina. Un análogo con sustituciones se describe al señalar los aminoácidos de sustitución con la posición de la sustitución como un superíndice seguido de una descripción de la insulina.
- 10
- Como se usa en la presente descripción, el término "fragmento de preproinsulina" incluye un segmento de la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la preproinsulina que conserva parte o toda la actividad biológica de la insulina o porción de fragmento de insulina del fragmento de preproinsulina. Los fragmentos de preproinsulina se denotan mediante la indicación de las posiciones en una secuencia de aminoácidos seguido de una descripción del aminoácido.
- 15
- Como se usa en la presente descripción, el término "análogo de fragmento de preproinsulina" incluye un segmento de la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la molécula de preproinsulina en donde uno o más de los aminoácidos en el segmento se han sustituido, insertado y/o eliminado, y/o uno o más aminoácidos exógenos se han insertado, como se describió anteriormente con referencia a los análogos de insulina mientras conserva parte o toda la actividad de la insulina, análogo de insulina, fragmento de insulina o porción de análogo de fragmento de insulina del análogo de fragmento de preproinsulina.
- 20
- 25
- Como se usa en la presente descripción, el término "miniproinsulina" se refiere a un propolipéptido de insulina de una sola cadena que tiene un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, donde el extremo N o C terminal de la cadena A se acopla al extremo C o N terminal de la cadena B mediante un péptido conector que tiene entre un límite inferior de -10, -9, -8, -7, -6, -5, -4, -3, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 y un límite superior de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 residuos de aminoácidos, y en donde el polipéptido de cadena A se acopla al polipéptido de cadena B por enlaces, tales como puentes disulfuro. Las miniproinsulinas pueden ser varias miniproinsulinas como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, las descritas en la patente de los Estados Unidos núm. 5,157,021 otorgada a Balschmidt y otros y la patente de los Estados Unidos núm. 5,202,415 otorgada a Jonassen y otros.
- 30
- 35
- Como se usa en la presente descripción, el término "péptido C" significa un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos del péptido C de la proinsulina de una de las siguientes especies: humano, mono, vaca, cerdo, oveja, caballo, perro, pollo, pato o ballena, proporcionado mediante fuentes naturales, sintéticas, o diseñadas por ingeniería genética. El péptido C puede ser péptido C humano.
- 40
- Como se usa en la presente descripción, el término "análogo de péptido C" significa un péptido C en donde uno o más de los aminoácidos en el péptido C se han sustituido, insertado y/o eliminado, y/o uno o más aminoácidos exógenos se han insertado, como se describió anteriormente con respecto a los análogos de insulina mientras conserva parte o toda la actividad biológica del péptido C. El análogo de péptido C puede comprender el segmento pentapéptido en el extremo C terminal de un péptido C y/o el segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 de un péptido C. Cuando el análogo de péptido C comprende el segmento pentapéptido, el segmento pentapéptido puede estar en el extremo C terminal del análogo de péptido C. El análogo de péptido C puede comprender el segmento tetrapéptido en el extremo C terminal de un péptido C y/o el segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 de un péptido C. Cuando el análogo de péptido C comprende el segmento tetrapéptido, el segmento tetrapéptido puede estar en el extremo C terminal del análogo de péptido C. El segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 de un péptido C como se describió anteriormente puede ser el segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 del péptido C humano.
- 45
- 50
- Como se usa en la presente descripción, el término "fragmento de péptido C" significa un segmento de la secuencia de aminoácidos del péptido C que conserva parte, sustancialmente toda, o toda la actividad biológica del péptido C. El fragmento de péptido C puede comprender el segmento pentapéptido en el extremo C terminal de un péptido C y/o el segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 de un péptido C. Cuando el fragmento de péptido C comprende el segmento pentapéptido, el segmento pentapéptido puede estar en el extremo C terminal del fragmento de péptido C. El fragmento de péptido C puede comprender, además, el segmento tetrapéptido en el extremo C terminal de un péptido C y/o el segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 de un péptido C. Cuando el fragmento de péptido C comprende el segmento tetrapéptido, el segmento tetrapéptido puede estar en el extremo C terminal del fragmento de péptido C. El fragmento de péptido C puede consistir en un péptido seleccionado del grupo que consiste en el segmento pentapéptido del extremo C terminal de un péptido C, el segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 de un péptido C, y el segmento tetrapéptido del extremo C terminal de un péptido C.
- 55
- 60

El segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 de un péptido C descrito anteriormente puede ser el segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 del péptido C humano.

5 Como se usa en la presente descripción, el término "análogo de fragmento de péptido C" significa un segmento de la secuencia de aminoácidos del péptido C en donde uno o más de los aminoácidos en el segmento se han sustituido, insertado y/o eliminado, y/o uno o más aminoácidos exógenos se han insertado, como se describió anteriormente con referencia a los análogos de insulina mientras conserva parte, sustancialmente toda, o toda la actividad biológica de la insulina. El análogo de fragmento de péptido C puede comprender el segmento pentapéptido en el extremo C terminal de un péptido C y/o el segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 de un péptido C. Cuando el análogo de fragmento de péptido C comprende el segmento pentapéptido, el segmento pentapéptido puede estar en el extremo C terminal del análogo de fragmento de péptido C. El análogo de fragmento de péptido C puede comprender el segmento tetrapéptido en el extremo C terminal de un péptido C y/o el segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 de un péptido C. Cuando el análogo de fragmento de péptido C comprende el segmento tetrapéptido, el segmento tetrapéptido puede estar en el extremo C terminal del análogo de fragmento de péptido C. El segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 de un péptido C descrito anteriormente puede ser el segmento nonapéptido que se encuentra en las posiciones 11-19 del péptido C humano.

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

25 Por ejemplo, los polipéptidos de péptido C tienen utilidad terapéutica que incluye, pero no se limita a, disminución de la hiperfiltración glomerular, aumento del uso de glucosa en músculo esquelético y/o en todo el cuerpo, mejora de la función nerviosa autónoma, y/o una redistribución del flujo sanguíneo microvascular de la piel. Los polipéptidos de péptido C tienen actividad biológica que incluye, pero no se limita a, la capacidad de estimular la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, la capacidad de estimular la actividad de óxido nítrico sintasa endotelial, y/o la capacidad de unirse específicamente a superficies celulares (por ejemplo, en un receptor de superficie acoplado a proteína G) con activación posterior de las rutas de señalización intracelulares dependientes de Ca^{2+} . Los polipéptidos de péptido C pueden tener una constante de velocidad de asociación para la unión a células endoteliales, células de los túbulos renales, y fibroblastos de $\sim 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Los polipéptidos de péptido C pueden ser péptidos C, análogos de péptido C, fragmentos de péptido C, o análogos de fragmentos de péptido C.

35 Como se usa en la presente descripción, el término "polipéptido de propéptido C" significa un polipéptido de péptido C acoplado a uno o más péptidos escindibles para proporcionar el polipéptido de péptido C.

40 Como se usa en la presente descripción, el término "polipéptido de cadena A" significa un polipéptido que es sustancialmente biológicamente equivalente a la cadena A de una molécula de insulina. Por ejemplo, los polipéptidos de cadena A pueden ser análogos de cadena A, como se describió anteriormente con respecto a los análogos de insulina, fragmentos de cadena A, o fragmentos de análogos de cadena A.

45 Como se usa en la presente descripción, el término "polipéptido de cadena B" significa un polipéptido que es sustancialmente biológicamente equivalente a la cadena B de una molécula de insulina. Por ejemplo, los polipéptidos de cadena B pueden ser análogos de cadena B, como se describió anteriormente con respecto a los análogos de insulina, fragmentos de cadena B, o fragmentos de análogos de cadena B.

50 Como se usa en la presente descripción, el término "péptido o polipéptido" significa una secuencia de aminoácidos de al menos residuos de aminoácidos.

Como se usa en la presente descripción, el término "equilibrado anfífilicamente" significa capaz de disolverse sustancialmente en agua y capaz de penetrar membranas biológicas.

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

60 Como se usa en la presente descripción, el término "lipofílico" significa la capacidad de disolverse en lípidos y/o la capacidad de penetrar, interactuar con y/o atravesar membranas biológicas, y el término "porción lipofílica" o "lipófilo" significa una porción que es lipofílica y/o que, cuando se une a otra entidad química, aumenta la lipofilidad de tal entidad química. Los ejemplos de porciones lipofílicas incluyen, pero no se limitan a, alquilos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, colesterilo, adamantilo y similares.

Como se usa en la presente descripción, el término "alquilo de cadena corta" se refiere a porciones de alquilo sustituido o no sustituido que tienen de uno a cinco átomos de carbono.

5 Como se usa en la presente descripción, el término "alquilo de cadena larga" se refiere a porciones de alquilo sustituido o no sustituido que tienen seis o más átomos de carbono.

La presente descripción proporciona, además, métodos para sintetizar un conjugado de polipéptido de insulina y oligómero que incluyen poner en contacto un polipéptido de proinsulina que comprende un polipéptido de insulina acoplado a uno o más péptidos por enlace(s) peptídico(s) capaces de escindirse para producir el polipéptido de insulina con un oligómero en condiciones suficientes para acoplar el oligómero a la porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina y proporcionar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero, y escindir el uno o más péptidos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero. Por ejemplo, los conjugados de insulina y oligómero pueden sintetizarse como se describe en los Ejemplos que se proporcionan más abajo. Una modalidad de una vía de síntesis se proporciona en la Figura 1.

El polipéptido de proinsulina puede ser un análogo de proinsulina que tiene un péptido líder. El análogo de proinsulina que tiene un péptido líder está disponible, por ejemplo, de Itoham Foods, Inc. de Ibaraki Pref, Japón. El péptido líder y el péptido C del análogo de proinsulina carecen de residuos de lisina. El polipéptido de proinsulina puede ser un polipéptido de proinsulina que está disponible por ejemplo, de Biobras de Belo Horizonte, Brasil. El polipéptido de proinsulina tiene un péptido líder acoplado al extremo N terminal de la cadena B de la proinsulina. El péptido líder carece de residuos de lisina.

El polipéptido de insulina puede tener un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B. El polipéptido de cadena A puede carecer de residuos de lisina. El polipéptido de cadena B puede comprender un solo residuo de lisina. El polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B pueden entrecruzarse, y pueden entrecruzarse con el uso de uno o más puentes disulfuro. En algunas modalidades, el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B comprenden cada uno residuos de cisteína, uno o más de los cuales se acoplan con el uso de uno o más puentes disulfuro para entrecruzar el polipéptido de cadena A con el polipéptido de cadena B. El polipéptido de insulina puede ser insulina, un análogo de insulina, un fragmento de insulina, o un fragmento de análogo de insulina.

El uno o más péptidos acoplados al polipéptido de insulina pueden comprender un péptido conector acoplado en un primer extremo al extremo C terminal del polipéptido de cadena B y en un segundo extremo al extremo N terminal del polipéptido de cadena A. En general, la secuencia de aminoácidos del péptido conector no es crítica y el péptido conector puede ser varios péptidos conectores como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de péptido C, péptidos C, y los péptidos conectores en las miniproinsulinas. El péptido conector puede carecer de residuos de lisina. Estas modalidades pueden usar menos reactivos oligoméricos mediante la reducción del número de sitios de conjugación posibles en la molécula de polipéptido de proinsulina.

El uno o más péptidos acoplados al polipéptido de insulina pueden comprender un péptido líder acoplado al extremo N terminal del polipéptido de cadena B. En general, la secuencia de aminoácidos del péptido líder no es crítica. En algunas modalidades, el péptido líder carece de residuos de lisina. Estas modalidades pueden reducir la cantidad de reactivo oligomérico usado al limitar el número de sitios de conjugación en la molécula de polipéptido de proinsulina.

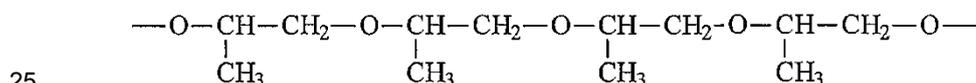
El uno o más péptidos acoplados al polipéptido de insulina pueden comprender un péptido conector como se describió anteriormente y un péptido líder como se describió anteriormente. El uno o más péptidos pueden consistir esencialmente en un péptido conector y un péptido líder, o pueden consistir en un péptido conector y un péptido líder.

Los enlaces peptídicos son enlaces que pueden escindirse de varias maneras como entenderán los expertos en la técnica. Los enlaces peptídicos pueden ser enlaces que pueden escindirse enzimáticamente por enzimas que incluyen, pero no se limitan a, tripsina, carboxipeptidasa B, trombina, pepsina, y quimotripsina. Los enlaces peptídicos que pueden escindirse enzimáticamente se entenderán por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, Arg-Arg, Tre-Arg, Ala-Arg, Tre-Arg-Arg, Tre-Lis, Arg-Gli, y Arg-Fen.

El oligómero puede ser varios oligómeros como entenderán los expertos en la técnica. En general, el oligómero puede ser cualquier oligómero capaz de acoplarse a un polipéptido como entenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, el oligómero puede ser un oligómero polidisperso como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 4,179,337 otorgada a Davis y otros; la patente de los Estados Unidos núm. 5,567,422 otorgada a Greenwald; la patente de los Estados Unidos núm. 5,359,030 otorgada a Ekwuribe; la patente de los Estados Unidos núm. 5,438,040 otorgada a Ekwuribe, la patente de los Estados Unidos núm. 5,681,811 otorgada a Ekwuribe, y la patente de los Estados Unidos núm. 6,309,633 otorgada a Ekwuribe y otros. Como otro ejemplo, el oligómero puede ser un oligómero no polidisperso como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos con núm. de serie 09/873,731 presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe y otros titulada "Methods of Synthesizing Substantially Monodispersed Mixtures of Polymers Having Polyethylene Glycol Mixtures"; la solicitud de patente de los Estados Unidos con núm. de serie 09/873,797 presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe y otros titulada "Mixtures of Drug-Oligomer Conjugates Comprising

Polyalkylene Glycol, Uses Thereof, and Methods of Making Same"; y la solicitud de patente de los Estados Unidos con núm. de serie 09/873,899 presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe y otros titulada "Mixtures of Insulin Drug-Oligomer Conjugates Comprising Polyalkylene Glycol, Uses Thereof, and Methods of Making Same,".

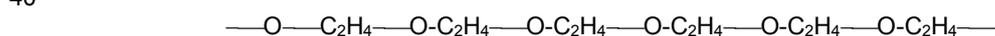
5 El oligómero puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una porción hidrofílica como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol o polipropilenglicol, polioles polioxi-etilenados, copolímeros de estos y copolímeros de bloque de estos, siempre y cuando la hidrofílicidad de los copolímeros de bloque se mantenga. La porción hidrofílica puede ser una porción de polialquilenglicol. La porción de polialquilenglicol tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 subunidades de polialquilenglicol. La porción de polialquilenglicol puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más subunidades de polialquilenglicol. La porción de polialquilenglicol puede tener, además, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 subunidades de polialquilenglicol, y/o entre un límite inferior de 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 subunidades de polialquilenglicol. La porción de polialquilenglicol puede tener entre un límite inferior de 4, 5, o 6 y un límite superior de 6, 7, o 8 subunidades de polialquilenglicol y en ciertas modalidades, la porción de polialquilenglicol tiene 7 subunidades de polialquilenglicol. La porción de polialquilenglicol del oligómero puede ser una porción de polialquilenglicol de alquilo de cadena corta tal como una porción de polietilenglicol, una porción de polipropilenglicol, o una porción de polibutilenglicol. Cuando la porción de polialquilenglicol es una porción de polipropilenglicol, la porción puede tener una estructura uniforme (es decir, no aleatoria). Una porción de polipropilenglicol ilustrativa que tiene una estructura uniforme es la siguiente:



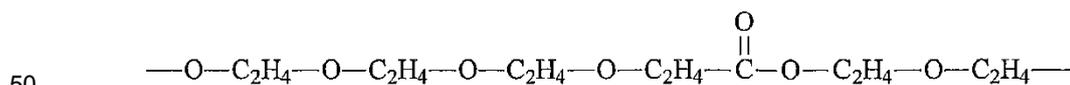
Esta estructura uniforme de polipropilenglicol puede describirse como que tiene sólo un átomo de carbono metil sustituido adyacente a cada átomo de oxígeno en la cadena de polipropilenglicol. Tales porciones uniformes de polipropilenglicol pueden exhibir características tanto lipofílicas como hidrofílicas.

30 El oligómero puede comprender una o más de otras porciones como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, porciones hidrofílicas adicionales, porciones lipofílicas, porciones espaciadoras, porciones enlazantes, y porciones de terminación. Las diversas porciones en el oligómero están acopladas covalentemente entre sí por enlaces hidrolizables o no hidrolizables.

35 El oligómero puede comprender, además, una o más porciones hidrofílicas adicionales (es decir, porciones además de la porción de polialquilenglicol) que incluyen, pero no se limitan a, azúcares, polialquilenglicoles, y copolímeros de poliamina/PEG. Las porciones de polialquilenglicol adyacentes se considerarán la misma porción si están acopladas por enlaces éter. Por ejemplo, la porción



es una porción simple de polietilenglicol que tiene seis subunidades de polietilenglicol. Si esta porción fuera la única porción hidrofílica en el oligómero, el oligómero no contendría una porción hidrofílica adicional. Las porciones de polietilenglicol adyacentes se considerarán porciones diferentes si están acopladas por un enlace distinto a un enlace éter. Por ejemplo, la porción



es una porción de polietilenglicol que tiene cuatro subunidades de polietilenglicol y una porción hidrofílica adicional que tiene dos subunidades de polietilenglicol. Los oligómeros de acuerdo con algunas modalidades de la presente invención pueden comprender una porción de polialquilenglicol y ninguna porción hidrofílica adicional.

55 El oligómero puede comprender, además, una o más porciones lipofílicas como entenderán los expertos en la técnica. La porción lipofílica tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 átomos de carbono. La porción lipofílica puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono. La porción lipofílica puede tener, además, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o átomos de carbono y/o entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 átomos de carbono. La porción lipofílica puede tener entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9, o 10 átomos de carbono y en ciertas modalidades, la porción lipofílica tiene 6 átomos de carbono. La porción lipofílica puede ser, pero no se limita a, porciones alquilo saturadas o insaturadas, lineales o ramificadas, porciones de ácidos grasos saturados o insaturados, lineales o ramificados, colesterol, y

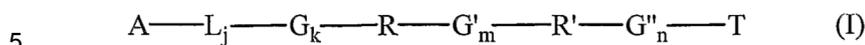
adamantano. Las porciones alquilo ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, porciones alquilo saturadas, lineales tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo y eicosilo; porciones alquilo saturadas, ramificadas tales como isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo; y porciones alquilo insaturadas derivadas de las porciones alquilo saturadas anteriores que incluyen, pero no se limitan a, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. Las porciones de ácidos grasos incluyen, pero no se limitan a, porciones de ácidos grasos insaturados tales como lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, y docosahexaenoato; y porciones de ácidos grasos saturados tales como acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato.

El oligómero puede comprender, además, una o más porciones espaciadoras como entenderán los expertos en la técnica. Las porciones espaciadoras pueden usarse, por ejemplo, para separar una porción hidrofílica de una porción lipofílica, para separar una porción lipofílica o porción hidrofílica del polipéptido de proinsulina, para separar una primera porción hidrofílica o lipofílica de una segunda porción hidrofílica o lipofílica, o para separar una porción hidrofílica o porción lipofílica de una porción enlazante. Las porciones espaciadoras pueden ser, pero no se limitan a, porciones de azúcar, colesterol y glicerina. Las porciones de azúcar pueden ser varias porciones de azúcar como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, porciones monosacarídicas y porciones disacarídicas. Las porciones monosacarídicas pueden tener entre 4 y 6 átomos de carbono.

El oligómero puede comprender, además, una o más porciones enlazantes que se usan para acoplar el oligómero con el polipéptido de proinsulina como entenderán los expertos en la técnica. Las porciones enlazantes pueden ser, pero no se limitan a, porciones alquilo y de ácidos grasos. La porción enlazante alquilo puede ser una porción alquilo saturada o insaturada, lineal o ramificada como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. La porción alcoxi puede ser varias porciones alcoxi que incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, pentiloxi, hexiloxi, heptiloxi, octiloxi, noniloxi, deciloxi, undeciloxi, dodeciloxi, trideciloxi, tetradeciloxi, pentadeciloxi, hexadeciloxi, octadeciloxi, nonadeciloxi, eicosiloxi, isopropoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, 2-metilbutoxi, *terc*-pentiloxi, 2-metilpentiloxi, 3-metilpentiloxi, 2-etilhexiloxi, 2-propilpentiloxi, viniloxi, aliloxi, 1-buteniloxi, 2-buteniloxi, etiniloxi, 1-propiniloxi, y 2-propiniloxi. La porción enlazante alquilo puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono, y puede tener entre 1, 2, 3, 4, o 5 y 8, 9, 10, 11, o 12 átomos de carbono. La porción enlazante de ácido graso puede ser una porción de ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato. La porción enlazante de ácido graso puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono y puede tener, además, entre 1, 2, 3, 4, o 5 y 8, 10, 12, 14 o 16 átomos de carbono.

El oligómero puede comprender, además, una o más porciones de terminación en el uno o más extremos del oligómero, que no están acoplados al polipéptido de insulina. La porción de terminación puede ser una porción alquilo o alcoxi. La porción alquilo o alcoxi puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono. La porción alquilo o alcoxi puede tener, además, entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 átomos de carbono, y/o entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, o 5 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos de carbono. En algunas modalidades, la porción alquilo o alcoxi puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, o 4 y un límite superior de 5, 6, o 7 átomos de carbono. La porción alquilo puede ser una porción alquilo lineal o ramificada, saturada o insaturada como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. La porción alcoxi puede ser varias porciones alcoxi que incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, pentiloxi, hexiloxi, heptiloxi, octiloxi, noniloxi, deciloxi, undeciloxi, dodeciloxi, trideciloxi, tetradeciloxi, pentadeciloxi, hexadeciloxi, octadeciloxi, nonadeciloxi, eicosiloxi, isopropoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, 2-metilbutoxi, *terc*-pentiloxi, 2-metilpentiloxi, 3-metilpentiloxi, 2-etilhexiloxi, 2-propilpentiloxi, viniloxi, aliloxi, 1-buteniloxi, 2-buteniloxi, etiniloxi, 1-propiniloxi, y 2-propiniloxi. La porción de terminación puede ser una porción alquilo de cadena corta tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, o *terc*-pentilo, o una porción alcoxi de cadena corta tal como metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, pentiloxi, o *terc*-pentiloxi. En ciertas modalidades, la porción de terminación es metilo o metoxi. Si bien la porción de terminación puede ser una porción alquilo o alcoxi, debe entenderse que la porción de terminación puede ser varias porciones como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, azúcares, colesterol, alcoholes, ácidos grasos y porciones de mPEG.

El oligómero puede comprender la estructura de Fórmula I:



en donde:

A es una porción activable;

L es una porción enlazante;

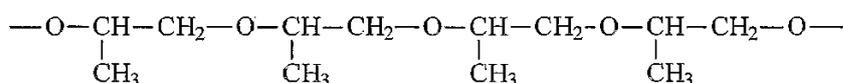
G, G' y G'' son individualmente porciones espaciadoras seleccionadas;

R es una porción lipofílica y R' es una porción de polialquilenglicol, o R' es la porción lipofílica y R es la porción de polialquilenglicol (solo uno de R o R' debe estar presente y típicamente, cuando R' está ausente, G'' también estará ausente y cuando R está ausente, G también está ausente);

T es una porción de terminación; y

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

La porción de polialquilenglicol puede tener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 subunidades de polialquilenglicol. La porción de polialquilenglicol puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más subunidades de polialquilenglicol. La porción de polialquilenglicol puede tener, además, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 subunidades de polialquilenglicol, y/o entre un límite inferior de 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 subunidades de polialquilenglicol. En ciertas modalidades, la porción de polialquilenglicol tiene entre un límite inferior de 4, 5, o 6 y un límite superior de 6, 7, o 8 subunidades de polialquilenglicol y la porción de polialquilenglicol puede tener 7 subunidades de polialquilenglicol. La porción de polialquilenglicol del oligómero puede ser una porción de polialquilenglicol de alquilo de cadena corta tal como una porción de polietilenglicol, una porción de polipropilenglicol, o una porción de polibutilenglicol. Cuando la porción de polialquilenglicol es una porción de polipropilenglicol, la porción puede tener una estructura uniforme (es decir, no aleatoria). Una porción de polipropilenglicol ilustrativa que tiene una estructura uniforme es la siguiente:



Esta estructura uniforme de polipropilenglicol puede describirse como que tiene sólo un átomo de carbono metil sustituido adyacente a cada átomo de oxígeno en la cadena de polipropilenglicol. Tales porciones uniformes de polipropilenglicol pueden exhibir características tanto lipofílicas como hidrofílicas.

La porción lipofílica puede ser una porción lipofílica como entenderán los expertos en la técnica. La porción lipofílica tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 átomos de carbono. La porción lipofílica puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono. La porción lipofílica puede tener, además, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o átomos de carbono y/o puede tener entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 átomos de carbono. La porción lipofílica puede tener entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9, o 10 átomos de carbono y la porción lipofílica puede tener 6 átomos de carbono. La porción lipofílica puede ser, pero no se limita a, porciones alquilo saturadas o insaturadas, lineales o ramificadas, porciones de ácidos grasos saturados o insaturados, lineales o ramificados, colesterol, y adamantano. Las porciones alquilo ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, porciones alquilo saturadas, lineales tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo y eicosilo; porciones alquilo saturadas, ramificadas tales como isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo; y porciones alquilo insaturadas derivadas de las porciones alquilo saturadas anteriores que incluyen, pero no se limitan a, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. Las porciones de ácidos grasos incluyen, pero no se limitan a, porciones de ácidos grasos insaturados tales como lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, y docosahexaenoato; y porciones de ácidos grasos saturados tales como acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato.

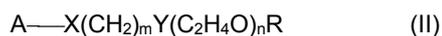
Las porciones espaciadoras, G, G' y G'' pueden ser porciones espaciadoras como entenderán los expertos en la técnica. Las porciones espaciadoras pueden ser, pero no se limitan a, porciones de azúcar, porciones de colesterol y de glicerina. Las porciones de azúcar pueden ser varias porciones de azúcar como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, porciones monosacarídicas y porciones disacarídicas. Las porciones monosacarídicas pueden tener entre 4 y 6 átomos de carbono. Los oligómeros de ciertas modalidades no incluyen porciones espaciadoras (es decir, k, m y n son 0).

La porción enlazadora, L, puede usarse para acoplar el oligómero con el fármaco (por ejemplo, un fármaco de insulina) como entenderán los expertos en la técnica. Las porciones enlazantes pueden ser, pero no se limitan a, porciones alquilo y de ácidos grasos. La porción enlazante alquilo puede ser una porción alquilo saturada o insaturada, lineal o ramificada como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. La porción alcoxi puede ser varias porciones alcoxi que incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, pentiloxi, hexiloxi, heptiloxi, octiloxi, noniloxi, deciloxi, undeciloxi, dodeciloxi, trideciloxi, tetradeciloxi, pentadeciloxi, hexadeciloxi, octadeciloxi, nonadeciloxi, eicosiloxi, isopropoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, 2-metilbutoxi, *terc*-pentiloxi, 2-metilpentiloxi, 3-metilpentiloxi, 2-etilhexiloxi, 2-propilpentiloxi, viniloxi, aliloxi, 1-buteniloxi, 2-buteniloxi, etiniloxi, 1-propiniloxi, y 2-propiniloxi. La porción enlazante alquilo puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono, y puede tener entre 1, 2, 3, 4, o 5 y 8, 9, 10, 11, o 12 átomos de carbono. La porción enlazante de ácido graso puede ser una porción de ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, laureleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato. La porción enlazante de ácido graso puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono y puede tener entre 1, 2, 3, 4, o 5 y 8, 10, 12, 14 o 16 átomos de carbono.

La porción de terminación, T, puede ser una porción alquilo o alcoxi. La porción alquilo o alcoxi puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono. La porción alquilo o alcoxi puede tener, además, entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 átomos de carbono, y/o entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, o 5 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos de carbono. En ciertas modalidades, la porción alquilo o alcoxi puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, o 4 y un límite superior de 5, 6, o 7 átomos de carbono. La porción alquilo puede ser varias porciones alquilo lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. Las porciones alcoxi ilustrativas pueden ser varias porciones alcoxi que incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, pentiloxi, hexiloxi, heptiloxi, octiloxi, noniloxi, deciloxi, undeciloxi, dodeciloxi, trideciloxi, tetradeciloxi, pentadeciloxi, hexadeciloxi, octadeciloxi, nonadeciloxi, eicosiloxi, isopropoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, 2-metilbutoxi, *terc*-pentiloxi, 2-metilpentiloxi, 3-metilpentiloxi, 2-etilhexiloxi, 2-propilpentiloxi, viniloxi, aliloxi, 1-buteniloxi, 2-buteniloxi, etiniloxi, 1-propiniloxi, y 2-propiniloxi. La porción de terminación puede ser una porción alquilo de cadena corta tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, o *terc*-pentilo, o una porción alcoxi de cadena corta tal como metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, pentiloxi, o *terc*-pentiloxi. La porción de terminación puede ser metilo o metoxi. Si bien la porción de terminación puede ser una porción alquilo o alcoxi, debe entenderse que la porción de terminación puede ser varias porciones como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, porciones de azúcar, colesterol, alcoholes, porciones de ácidos grasos y porciones de mPEG.

La porción activable, A, puede ser una porción que permite el acoplamiento del oligómero a un agente activante para formar un oligómero activado capaz de acoplarse con el polipéptido de proinsulina. La porción activable puede ser varias porciones activables como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, -C(O)-OH, C(S)-OH, -C(S)-SH, -OH, -SH, y NH₂.

El oligómero puede comprender la estructura de Fórmula II:



en donde:

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

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

Y es un éster, un éter, un carbamato, un carbonato, o una porción de enlace amida, y puede ser una porción de enlace éter;

m está entre un límite inferior de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30, y puede estar entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,

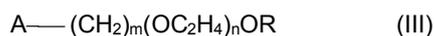
20, 21, o 22, y puede estar, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14, y/o entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9, o 10;

n está entre un límite inferior de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50, y puede estar entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20, y puede estar, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 6, 7, o 8 subunidades de polialquilenglicol, y/o entre un límite inferior de 4, 5, o 6 y un límite superior de 6, 7, o 8 subunidades de polialquilenglicol, y en ciertas modalidades, es 7;

m y n no son 0 ambos; y

R es una porción alquilo, una porción de azúcar, colesterol, adamantano, una porción de alcohol, o una porción de ácido graso. La porción alquilo puede ser porciones alquilo lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. La porción alquilo puede ser una porción alquilo de cadena corta tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, o *terc*-pentilo. La porción alquilo puede ser, además, alquilo de C₁ a C₃. La porción alquilo en ciertas modalidades es metilo. La porción de ácido graso puede ser una porción de ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato.

El oligómero puede comprender la estructura de Fórmula III:



en donde:

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

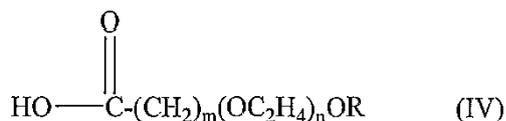
m está entre un límite inferior de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30, y puede estar entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22, y puede estar, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14, y/o entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9, o 10;

n está entre un límite inferior de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50, y puede estar entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20, y puede estar, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 subunidades de polialquilenglicol, y/o entre un límite inferior de 4, 5, o 6 y un límite superior de 6, 7, o 8 subunidades de polialquilenglicol, y en ciertas modalidades es 7;

m y n no son 0 ambos; y

R es una porción alquilo, una porción de azúcar, colesterol, adamantano, una porción de alcohol, o una porción de ácido graso. La porción alquilo puede ser porciones alquilo lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. La porción alquilo puede ser una porción alquilo de cadena corta tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, o *terc*-pentilo. La porción alquilo puede ser, además, alquilo de C₁ a C₃. La porción alquilo en ciertas modalidades es metilo. La porción de ácido graso puede ser una porción de ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato.

El oligómero puede comprender la estructura de Fórmula IV:



en donde:

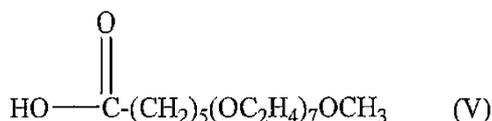
m está entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30, y puede estar entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,

21, o 22, y puede estar, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14, y/o entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9, o 10;

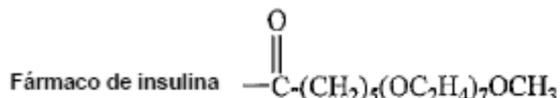
n está entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50, y puede estar entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20, y puede estar, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 subunidades de polialquilenglicol, y/o entre un límite inferior de 4, 5, o 6 y un límite superior de 6, 7, o 8 subunidades de polialquilenglicol, y en ciertas modalidades, es 7; y

R es una porción alquilo, una porción de azúcar, colesterol, adamantano, una porción de alcohol, o una porción de ácido graso. La porción alquilo puede ser porciones alquilo lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. La porción alquilo puede ser una porción alquilo de cadena corta tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, o *terc*-pentilo. La porción alquilo puede ser, además, alquilo de C₁ a C₃. La porción alquilo en ciertas modalidades es metilo. La porción de ácido graso puede ser una porción de ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato.

El oligómero puede comprender la estructura de Fórmula V:



El oligómero puede acoplarse covalentemente al polipéptido de insulina como un fármaco de insulina. Por ejemplo, un oligómero puede comprender la estructura Va:



en donde el fármaco de insulina es un polipéptido de insulina como se describe en la presente descripción. Cuando el fármaco de insulina es una insulina humana y el conjugado de Fórmula Va consiste en un solo oligómero acoplado a la lisina en la posición B29 de la insulina humana, el conjugado de insulina y oligómero se denomina HIM2.

El oligómero puede acoplarse al polipéptido de insulina con el uso de un enlace hidrolizable (por ejemplo, un enlace éster o carbonato). Un acoplamiento hidrolizable puede proporcionar un conjugado de polipéptido de insulina y oligómero que actúa como un profármaco. En ciertos casos, por ejemplo donde el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero es biológicamente inactivo (es decir, el conjugado carece de la capacidad de afectar el cuerpo a través del mecanismo de acción principal del polipéptido de insulina), un acoplamiento hidrolizable puede proporcionar un efecto de liberación en el tiempo o de liberación controlada, lo que proporciona el polipéptido de insulina biológicamente activo durante un período de tiempo dado a medida que uno o más oligómeros se escinden de sus conjugados de polipéptido de insulina y oligómero biológicamente inactivos respectivos para proporcionar el polipéptido de insulina biológicamente activo. En algunas modalidades, el oligómero puede escindirse de un polipéptido de proinsulina o un polipéptido de insulina para producir insulina. Un enlace hidrolizable puede incluirse dentro del oligómero para producir un profármaco que produce una porción activa conjugada.

El oligómero puede acoplarse al polipéptido de insulina con el uso de un enlace no hidrolizable (por ejemplo, un enlace carbamato, amida, o éter). El uso de un enlace no hidrolizable puede preferirse cuando es conveniente permitir que el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero biológicamente inactivo circule en el torrente sanguíneo durante un período de tiempo prolongado, preferentemente, al menos 2 horas. Cuando el oligómero se acopla al polipéptido de insulina con el uso de una porción de enlace que comprende una porción carbonilo, tal como un éster, un carbamato, un carbonato, o una porción de enlace amida, el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero resultante es un conjugado de polipéptido de insulina y acil oligómero.

Los oligómeros descritos anteriormente están disponibles comercialmente o pueden sintetizarse por varios métodos como entenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, los oligómeros polidispersos pueden sintetizarse por los métodos que se proporcionan en una o más de las siguientes referencias: La patente de los Estados Unidos núm. 4,179,337 otorgada a Davis y otros; la patente de los Estados Unidos núm. 5,567,422 otorgada a Greenwald; la patente de los Estados Unidos núm. 5,359,030 otorgada a Ekwuribe; la patente de los Estados Unidos núm. 5,438,040 otorgada

a Ekwuribe, la patente de los Estados Unidos núm. 5,681,811 otorgada a Ekwuribe, la patente de los Estados Unidos núm. 6,309,633 otorgada a Ekwuribe y otros Los oligómeros no polidispersos (por ejemplo, sustancialmente monodispersos y monodispersos) pueden sintetizarse por los métodos que se proporcionan en una o más de las siguientes referencias: la solicitud de patente de los Estados Unidos con núm. de serie 09/873,731 presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe y otros titulada "Methods of Synthesizing Substantially Monodispersed Mixtures of Polymers Having Polyethylene Glycol Mixtures"; la solicitud de patente de los Estados Unidos con núm. de serie 09/873,797 presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe y otros titulada "Mixtures of Drug-Oligomer Conjugates Comprising Polyalkylene Glycol, Uses Thereof, and Methods of Making Same"; y la solicitud de patente de los Estados Unidos con núm. de serie 09/873,899 presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe y otros titulada "Mixtures of Insulin Drug-Oligomer Conjugates Comprising Polyalkylene Glycol, Uses Thereof, and Methods of Making Same". Los oligómeros pueden ser sustancialmente monodispersos y pueden ser, además, monodispersos. Los métodos ilustrativos para sintetizar oligómeros monodispersos se proporcionan en los Ejemplos que se proporcionan en la presente descripción.

El contacto del polipéptido de proinsulina con el oligómero en condiciones suficientes para proporcionar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero puede realizarse con el uso de varias condiciones como entenderán los expertos en la técnica. El contacto del polipéptido de proinsulina con el oligómero en condiciones suficientes para proporcionar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero comprende poner con contacto el oligómero con un agente activante en condiciones suficientes para proporcionar un oligómero activado; y poner en contacto el oligómero activado con el polipéptido de proinsulina en condiciones suficientes para proporcionar el conjugado de polipéptido de proinsulina. El oligómero activado puede formarse *ex situ* o *in situ*.

El agente activante puede ser varios agentes activantes capaces de activar uno o más de los oligómeros descritos anteriormente de manera que el oligómero sea capaz de reaccionar con funciones hidroxilo y/o funciones amino nucleofílicas en el polipéptido de proinsulina como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, N-hidroxisuccinimida, *p*-nitrofenil clorofornato, 1,3-diciclohexilcarbodiimida, y hidroxibenzotriazida.

El experto en la técnica entenderá las condiciones suficientes para acoplar el agente activante al oligómero para proporcionar un oligómero activado. Por ejemplo, el experto en la técnica puede referirse a R.C. Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS. A GUIDE TO FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS (2d Edición, Nueva York, Wiley-VCH, 1999).

Las condiciones suficientes para acoplar el oligómero activado al polipéptido de proinsulina se entenderán para un experto en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido de proinsulina puede disolverse en un solvente aprótico dipolar, tal como dimetilsulfóxido, para proporcionar una solución de polipéptido de proinsulina. Un agente amortiguador, tal como trietilamina, puede añadirse a la solución de polipéptido de proinsulina. El oligómero activado disuelto en un solvente anhidro tal como acetonitrilo puede añadirse después a la solución de polipéptido de proinsulina. El experto en la técnica puede referirse, además, a R.C. Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS. A GUIDE TO FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS (2d Edición, Nueva York, Wiley-VCH, 1999). La relación molar de oligómero activado respecto a polipéptido de proinsulina puede ser mayor que aproximadamente 1:1, mayor que aproximadamente 2:1, mayor que aproximadamente 3:1, mayor que aproximadamente 4:1, y/o mayor que aproximadamente 5:1.

Más de un oligómero (es decir, una pluralidad de oligómeros) pueden acoplarse a la porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina. Alternativamente, el(los) oligómero(s) puede(n) acoplarse a una porción de polipéptido no insulínico de un polipéptido de proinsulina, por ejemplo, para facilitar la purificación de la insulina conjugada. Los oligómeros en la pluralidad pueden ser iguales. Sin embargo, debe entenderse que los oligómeros en la pluralidad pueden ser diferentes entre sí, o, alternativamente, algunos de los oligómeros en la pluralidad pueden ser iguales y algunos pueden ser diferentes. Cuando una pluralidad de oligómeros se acopla a la porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina, uno o más de los oligómeros pueden acoplarse a la porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina con enlaces hidrolizables y uno o más de los oligómeros pueden acoplarse a la porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina con enlaces no hidrolizables. Alternativamente, todos los enlaces que acoplan la pluralidad de oligómeros a la porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina pueden ser hidrolizables, pero tener grados variables de capacidad de hidrólisis de manera que, por ejemplo, uno o más de los oligómeros se elimina rápidamente del polipéptido de insulina o porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina por hidrólisis en el cuerpo y uno o más de los oligómeros se elimina lentamente del polipéptido de insulina o porción de polipéptido de insulina por hidrólisis en el cuerpo.

El oligómero puede acoplarse a la porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina y opcionalmente a la porción de polipéptido no insulínico del polipéptido de proinsulina en varios residuos nucleofílicos de la porción de polipéptido de insulina y/o la porción de polipéptido no insulínico que incluyen, pero no se limitan a, funciones hidroxilo y/o funciones amino nucleofílicas. Las funciones hidroxilo nucleofílicas pueden encontrarse, por ejemplo, en los residuos de serina y/o tirosina, y las funciones amino nucleofílicas pueden encontrarse, por ejemplo, en los residuos de histidina y/o lisina, y/o en uno o más extremos N terminales del polipéptido. Cuando un oligómero se acopla al uno o más extremos N terminales del polipéptido de proinsulina, el acoplamiento puede formar una amina secundaria. Cuando el polipéptido de proinsulina tiene un péptido líder acoplado al extremo N terminal del polipéptido de cadena B, los extremos N terminales de la molécula de insulina pueden protegerse de la conjugación (por ejemplo, acilación). Cuando

el polipéptido de proinsulina es proinsulina humana que tiene un péptido líder acoplado al extremo N terminal de la cadena B, por ejemplo, el oligómero puede acoplarse a las tres funcionalidades amino de la proinsulina: el extremo N terminal del péptido líder, la funcionalidad amino del residuo de Lis en el péptido C, y la funcionalidad amino de Lis^{B29}. Tras la escisión del péptido líder y el péptido C, se encuentra que el oligómero se ha acoplado de manera sitio específica a la Lis^{B29} de la insulina para proporcionar un solo conjugado de insulina, la insulina monoconjugada con un oligómero en Lis^{B29}.

La escisión del uno o más péptidos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero puede realizarse por varios procesos como entenderán los expertos en la técnica. En algunas modalidades, la escisión del uno o más péptidos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero comprende poner con contacto el conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero con una o más enzimas que son capaces de escindir el(los) enlace(s) entre el uno o más péptidos y el polipéptido de insulina en condiciones suficientes para escindir el uno o más péptidos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero. Como se describe en varias referencias, por ejemplo, Kemmler y otros "Studies on the Conversion of Proinsulin to Insulin," *J. Biol. Chem.*, **246**: 6786-6791 (1971), el experto en la técnica entenderá cómo seleccionar las enzimas adecuadas en vista del(de los) enlace(s) peptídico(s) particular(es) a escindir y cómo proporcionar condiciones suficientes para escindir el uno o más péptidos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero. La una o más enzimas pueden comprender, por ejemplo, varias enzimas que incluyen, pero no se limitan a, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa B, y mezclas de estas. En ciertas modalidades, la una o más enzimas son tripsina, carboxipeptidasa B, y mezclas de estas.

El péptido conector puede tener un residuo aminoacídico terminal en el primer extremo. La escisión del péptido conector del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero puede comprender poner en contacto el conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero con una primera enzima en condiciones suficientes para proporcionar un conjugado de polipéptido de insulina con residuo aminoacídico terminal y oligómero, y poner en contacto el conjugado de polipéptido de insulina con residuo aminoacídico terminal y oligómero con una segunda enzima en condiciones suficientes para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero. El contacto del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero con una primera enzima y el contacto del conjugado de polipéptido de insulina con residuo aminoacídico terminal y oligómero con una segunda enzima puede producirse sustancialmente de forma simultánea, por ejemplo cuando la primera enzima y la segunda enzima se proporcionan en forma de una mezcla o cóctel. En ciertas modalidades, la primera enzima puede ser tripsina y la segunda enzima puede ser carboxipeptidasa B. El residuo aminoacídico terminal puede ser cualquiera de varios residuos, tales como un residuo de arginina o un residuo de Glu, el último de los cuales puede escindirse con Glu-C-peptidasa. Por ejemplo, el residuo aminoacídico terminal puede ser un residuo de arginina cuando el polipéptido de insulina es insulina y el péptido conector es péptido C humano.

La escisión del uno o más péptidos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero proporciona un producto conjugado de polipéptido de insulina y oligómero que consiste en un solo conjugado de polipéptido de insulina y oligómero (es decir, carece sustancialmente de conjugados de polipéptido de insulina y oligómero adicionales). El producto conjugado de polipéptido de insulina y oligómero puede consistir, además, en un solo monoconjugado de polipéptido de insulina y oligómero. Por ejemplo, en modalidades descritas anteriormente en las que el polipéptido de proinsulina comprende un polipéptido de insulina que tiene un polipéptido de cadena A carente de residuos de lisina y un polipéptido de cadena B que comprende un solo residuo de lisina, el producto conjugado de polipéptido de insulina y oligómero puede consistir en un solo monoconjugado de polipéptido de insulina y oligómero donde el oligómero está acoplado al residuo de lisina del polipéptido de cadena B. Como otro ejemplo, cuando el polipéptido de proinsulina es proinsulina con un péptido líder, la escisión del péptido C y el péptido líder del conjugado de proinsulina y oligómero proporciona un monoconjugado de insulina y oligómero, en donde la insulina está monoconjugada en Lis^{B29}.

Las modalidades de los métodos para sintetizar conjugados de polipéptido de insulina y oligómero descritos anteriormente pueden resultar en un rendimiento de conjugados y/o diconjugados de polipéptido de insulina y oligómero que es mayor que 75, 76, 77, 78, o 79 por ciento. En ciertas modalidades, el rendimiento es mayor que 80, 81, 82, 83, 84, o 85 por ciento. En ciertas otras modalidades, el rendimiento es mayor que 86, 87, 88, 89, o 90 por ciento. Aún en otras modalidades, el rendimiento es mayor que 91, 92, 93, 94, o 95 por ciento. Cuando el conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero se proporciona al poner en contacto un oligómero activado con el conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero, un exceso de oligómeros activados puede usarse para lograr mayores rendimientos. Por ejemplo, los rendimientos descritos en la presente descripción pueden obtenerse en varias modalidades con el uso de una relación molar de oligómero activado respecto a polipéptido de proinsulina mayor que aproximadamente 2:1, mayor que aproximadamente 3:1, mayor que aproximadamente 4:1, y/o mayor que aproximadamente 5:1. En algunas modalidades, rendimientos mayores que 91, 92, 93, 94, o 95 por ciento se obtienen con el uso de una relación molar de oligómero activado respecto a polipéptido de proinsulina mayor que aproximadamente 4:1, y en algunas modalidades, mayor que aproximadamente 5:1.

Se proporcionan métodos para sintetizar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero que incluyen poner en contacto un polipéptido de proinsulina que comprende un polipéptido de insulina acoplado a uno o más péptidos por enlace(s) peptídico(s) capaces de escindirse para producir el polipéptido de insulina con un oligómero en condiciones

suficientes para acoplar el oligómero a la porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina y proporcionar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero. Por ejemplo, los conjugados de proinsulina y oligómero pueden sintetizarse como se describe en los Ejemplos que se proporcionan más abajo. Una modalidad de una vía de síntesis se proporciona en la Figura 1.

5

El polipéptido de proinsulina puede ser varios polipéptidos de proinsulina que comprenden un polipéptido de insulina acoplado a uno o más péptidos por enlace(s) peptídico(s) capaces de escindirse para producir el polipéptido de insulina como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, proinsulina, análogos de proinsulina, fragmentos de proinsulina, análogos de fragmentos de proinsulina, miniproinsulina, SCIP, o proteínas de fusión. El polipéptido de proinsulina puede ser un análogo de proinsulina que tiene un péptido líder. El análogo de proinsulina que tiene un péptido líder puede obtenerse, por ejemplo, de Itoham Foods, Inc. de Ibaraki Pref, Japón. El péptido líder y el péptido C del análogo de proinsulina carecen de residuos de lisina. El polipéptido de proinsulina puede ser un polipéptido de proinsulina que puede obtenerse, por ejemplo, de Biobras de Belo Horizonte, Brasil. El polipéptido de proinsulina tiene un péptido líder acoplado al extremo N terminal de la cadena B de la proinsulina. El péptido líder carece de residuos de lisina.

El polipéptido de insulina puede tener un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B. El polipéptido de cadena A puede carecer de residuos de lisina. El polipéptido de cadena B puede comprender un solo residuo de lisina. El polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B pueden entrecruzarse, y pueden entrecruzarse con el uso de uno o más puentes disulfuro. El polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B pueden comprender cada uno residuos de cisteína, uno o más de los cuales se acoplan con el uso de uno o más puentes disulfuro para entrecruzar el polipéptido de cadena A con el polipéptido de cadena B. El polipéptido de insulina puede ser insulina, un análogo de insulina, un fragmento de insulina, o un fragmento de análogo de insulina.

El uno o más péptidos acoplados al polipéptido de insulina pueden comprender un péptido conector acoplado en un primer extremo al extremo C terminal del polipéptido de cadena B y en un segundo extremo al extremo N terminal del polipéptido de cadena A. En general, la secuencia de aminoácidos del péptido conector no es crítica y el péptido conector puede ser varios péptidos conectores como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de péptido C, péptidos C, y los péptidos conectores en las miniproinsulinas. El péptido conector puede carecer de residuos de lisina.

Estas modalidades pueden usar menos reactivos oligoméricos mediante la reducción del número de sitios de conjugación posibles en la molécula de polipéptido de proinsulina.

Se proporciona un método para sintetizar un conjugado de polipéptido de péptido C y oligómero, que incluye poner en contacto un polipéptido de propéptido C que comprende un polipéptido de péptido C acoplado a uno o más péptidos por enlace(s) peptídico(s) escindibles para producir el polipéptido de péptido C con un oligómero en condiciones suficientes para acoplar el oligómero a la porción de polipéptido de péptido C del polipéptido de propéptido C y proporcionar un conjugado de polipéptido de propéptido C y oligómero, y escindir el uno o más péptidos del conjugado de polipéptido de propéptido C y oligómero para proporcionar el conjugado de polipéptido de péptido C y oligómero.

El polipéptido de propéptido C puede ser varios polipéptidos de propéptido C como entenderán los expertos en la técnica. El polipéptido de propéptido C puede ser un polipéptido de proinsulina, y en algunas modalidades, el polipéptido de propéptido C es proinsulina.

45

El polipéptido de péptido C puede ser varios polipéptidos de péptido C como entenderán los expertos en la técnica. En algunas modalidades, el polipéptido de péptido C es péptido C.

El uno o más péptidos acoplados al polipéptido de péptido C pueden ser varios péptidos como entenderán los expertos en la técnica. El uno o más péptidos pueden comprender un polipéptido de insulina y/o el uno o más polipéptidos pueden ser un polipéptido de insulina. El polipéptido de insulina puede carecer de residuos de lisina, lo cual puede reducir la cantidad de reactivos oligoméricos usados para conjugar el polipéptido de propéptido C. El uno o más péptidos pueden ser, además, insulina o insulina acoplada en el extremo N terminal de la cadena B a un péptido líder.

Los enlaces peptídicos son enlaces que pueden escindirse de varias maneras como entenderán los expertos en la técnica. Los enlaces peptídicos pueden ser enlaces que pueden escindirse enzimáticamente por enzimas que incluyen, pero no se limitan a, tripsina, carboxipeptidasa B, trombina, pepsina, y quimotripsina. Los enlaces peptídicos que pueden escindirse enzimáticamente se entenderán por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, Arg-Arg, Tre-Arg, Ala-Arg, Tre-Arg-Arg, Tre-Lis, Arg-Gli, y Arg-Fen.

60

El oligómero puede ser varios oligómeros como entenderán los expertos en la técnica. En general, el oligómero puede ser cualquier oligómero capaz de acoplarse a un polipéptido como entenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, el oligómero puede ser un oligómero polidisperso como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 4,179,337 otorgada a Davis y otros; la patente de los Estados Unidos núm. 5,567,422 otorgada a Greenwald; la patente de los Estados Unidos núm. 5,359,030 otorgada a Ekwuribe; la patente de los Estados Unidos núm. 5,438,040 otorgada a

65

12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono. La porción lipofílica puede tener, además, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o átomos de carbono, y/o entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 átomos de carbono. La porción lipofílica puede tener, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9, o 10 átomos de carbono y en ciertas modalidades, la porción lipofílica tiene 6 átomos de carbono. La porción lipofílica puede ser, pero no se limita a porciones alquilo saturadas o insaturadas, lineales o ramificadas, porciones de ácidos grasos saturados o insaturados, lineales o ramificados, colesterol, y adamantano. Las porciones alquilo ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, porciones alquilo saturadas, lineales tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo y eicosilo; porciones alquilo saturadas, ramificadas tales como isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo; y porciones alquilo insaturadas derivadas de las porciones alquilo saturadas anteriores que incluyen, pero no se limitan a, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. Las porciones de ácidos grasos incluyen, pero no se limitan a, porciones de ácidos grasos insaturados tales como lauroleato, miristoleato, palmitleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, y docosahexaenoato; y porciones de ácidos grasos saturados tales como acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato.

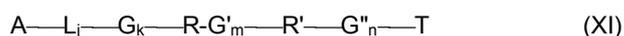
El oligómero puede comprender, además, una o más porciones espaciadoras como entenderán los expertos en la técnica. Las porciones espaciadoras pueden usarse, por ejemplo, para separar una porción hidrofílica de una porción lipofílica, para separar una porción lipofílica o porción hidrofílica del polipéptido de péptido C, para separar una primera porción hidrofílica o lipofílica de una segunda porción hidrofílica o lipofílica, o para separar una porción hidrofílica o porción lipofílica de una porción enlazante. Las porciones espaciadoras pueden ser, pero no se limitan a, porciones de azúcar, colesterol y glicerina. Las porciones de azúcar pueden ser varias porciones de azúcar como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, porciones monosacáridicas y porciones disacáridicas. Las porciones monosacáridicas pueden tener entre 4 y 6 átomos de carbono.

El oligómero puede comprender, además, una o más porciones enlazantes que se usan para acoplar el oligómero con el polipéptido de péptido C como entenderán los expertos en la técnica. Las porciones enlazantes pueden ser, pero no se limitan a, porciones alquilo y de ácidos grasos. La porción enlazante alquilo puede ser una porción alquilo saturada o insaturada, lineal o ramificada como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. La porción alcoxi puede ser varias porciones alcoxi que incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, pentiloxi, hexiloxi, heptiloxi, octiloxi, noniloxi, deciloxi, undeciloxi, dodeciloxi, trideciloxi, tetradeciloxi, pentadeciloxi, hexadeciloxi, octadeciloxi, nonadeciloxi, eicosiloxi, isopropoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, 2-metilbutoxi, *terc*-pentiloxi, 2-metilpentiloxi, 3-metilpentiloxi, 2-etilhexiloxi, 2-propilpentiloxi, viniloxi, aliloxi, 1-buteniloxi, 2-buteniloxi, etiniloxi, 1-propiniloxi, y 2-propiniloxi. La porción enlazante alquilo puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono, y puede tener, además, entre 1, 2, 3, 4, o 5 y 8, 9, 10, 11, o 12 átomos de carbono. La porción enlazante de ácido graso puede ser una porción de ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, lauroleato, miristoleato, palmitleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato. La porción enlazante de ácido graso puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono y puede tener, además, entre 1, 2, 3, 4, o 5 y 8, 10, 12, 14 o 16 átomos de carbono.

El oligómero puede comprender, además, una o más porciones de terminación en el uno o más extremos del oligómero, que no están acoplados al polipéptido de péptido C. La porción de terminación puede ser una porción alquilo o alcoxi. La porción alquilo o alcoxi puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono. La porción alquilo o alcoxi puede tener, además, entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 átomos de carbono, y/o entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, o 5 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos de carbono. En ciertas modalidades, la porción alquilo o alcoxi puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, o 4 y un límite superior de 5, 6, o 7 átomos de carbono. La porción alquilo puede ser una porción alquilo lineal o ramificada, saturada o insaturada como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. La porción alcoxi puede ser varias porciones alcoxi que incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, pentiloxi, hexiloxi, heptiloxi, octiloxi, noniloxi, deciloxi, undeciloxi, dodeciloxi, trideciloxi, tetradeciloxi, pentadeciloxi, hexadeciloxi, octadeciloxi, nonadeciloxi, eicosiloxi, isopropoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, 2-metilbutoxi, *terc*-pentiloxi, 2-metilpentiloxi, 3-metilpentiloxi, 2-etilhexiloxi, 2-propilpentiloxi, viniloxi, aliloxi, 1-buteniloxi, 2-buteniloxi,

5 etiniloxi, 1-propiniloxi, y 2-propiniloxi. La porción de terminación puede ser una porción alquilo de cadena corta tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, o *terc*-pentilo, o una porción alcoxi de cadena corta tal como metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, pentiloxi, o *terc*-pentiloxi. En ciertas modalidades, la porción de terminación es metilo o metoxi. Si bien la porción de terminación puede ser una porción alquilo o alcoxi, debe entenderse que la porción de terminación puede ser varias porciones como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, azúcares, colesterol, alcoholes, ácidos grasos y porciones de PEG.

10 El oligómero puede comprender la estructura de Fórmula XI:



en donde:

15 A es una porción activable;

L es una porción enlazante;

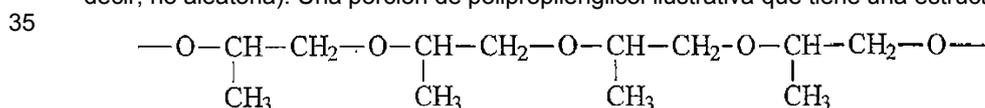
G, G' y G'' son individualmente porciones espaciadoras seleccionadas;

R es una porción lipofílica y R' es una porción de polialquilenglicol, o R' es la porción lipofílica y R es la porción de polialquilenglicol y sólo uno de R y R' puede estar presente;

T es una porción de terminación; y

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

La porción de polialquilenglicol puede tener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 subunidades de polialquilenglicol. La porción de polialquilenglicol puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más subunidades de polialquilenglicol. La porción de polialquilenglicol puede tener, además, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 subunidades de polialquilenglicol, y/o entre un límite inferior de 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 subunidades de polialquilenglicol. En algunas modalidades, la porción de polialquilenglicol puede tener entre un límite inferior de 4, 5, o 6 y un límite superior de 6, 7, o 8 subunidades de polialquilenglicol y en ciertas modalidades, la porción de polialquilenglicol tiene 7 subunidades de polialquilenglicol. La porción de polialquilenglicol del oligómero puede ser una porción de polialquilenglicol de alquilo de cadena corta tal como una porción de polietilenglicol, una porción de polipropilenglicol, o una porción de polibutilenglicol. Cuando la porción de polialquilenglicol es una porción de polipropilenglicol, la porción puede tener una estructura uniforme (es decir, no aleatoria). Una porción de polipropilenglicol ilustrativa que tiene una estructura uniforme es la siguiente:



40 Esta estructura uniforme de polipropilenglicol puede describirse como que tiene sólo un átomo de carbono metil sustituido adyacente a cada átomo de oxígeno en la cadena de polipropilenglicol. Tales porciones uniformes de polipropilenglicol pueden exhibir características tanto lipofílicas como hidrofílicas.

45 La porción lipofílica puede ser una porción lipofílica como entenderán los expertos en la técnica. La porción lipofílica tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 átomos de carbono. La porción lipofílica puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono. La porción lipofílica puede tener, además, entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o átomos de carbono, y/o entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 átomos de carbono. En algunas modalidades, la porción lipofílica puede tener entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9, o 10 átomos de carbono y en ciertas modalidades, la porción lipofílica tiene 6 átomos de carbono. La porción lipofílica puede ser, pero no se limita a, porciones alquilo saturadas o insaturadas, lineales o ramificadas, porciones de ácidos grasos saturados o insaturados, lineales o ramificados, colesterol, y adamantano. Las porciones alquilo ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, porciones alquilo saturadas, lineales tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo y eicosilo; porciones alquilo saturadas, ramificadas tales como isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo; y porciones alquilo insaturadas derivadas de las porciones alquilo saturadas anteriores que incluyen, pero no se limitan a, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. Las porciones de ácidos grasos incluyen, pero no se limitan a, porciones de ácidos grasos insaturados tales como lauroleato, miristoleato, palmitleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, y docosahexaenoato; y porciones de ácidos grasos saturados tales como acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato.

65 Las porciones espaciadoras, G, G' y G'', son porciones espaciadoras como entenderán los expertos en la técnica. Las

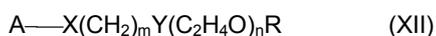
porciones espaciadoras pueden ser, pero no se limitan a, porciones de azúcar, porciones de colesterol y de glicerina. Las porciones de azúcar pueden ser varias porciones de azúcar como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, porciones monosacáridicas y porciones disacáridicas. Las porciones monosacáridicas pueden tener entre 4 y 6 átomos de carbono. Los oligómeros de ciertas modalidades no incluyen porciones espaciadoras (es decir, k, m y n son 0).

La porción enlazante, L, puede usarse para acoplar el oligómero con el polipéptido de péptido C como entenderán los expertos en la técnica. Las porciones enlazantes pueden ser, pero no se limitan a, porciones alquilo y de ácidos grasos. La porción enlazante alquilo puede ser una porción alquilo saturada o insaturada, lineal o ramificada como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. La porción alcoxi puede ser varias porciones alcoxi que incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, pentiloxi, hexiloxi, heptiloxi, octiloxi, noniloxi, deciloxi, undeciloxi, dodeciloxi, trideciloxi, tetradeciloxi, pentadeciloxi, hexadeciloxi, octadeciloxi, nonadeciloxi, eicosiloxi, isopropoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, 2-metilbutoxi, *terc*-pentiloxi, 2-metilpentiloxi, 3-metilpentiloxi, 2-etilhexiloxi, 2-propilpentiloxi, viniloxi, aliloxi, 1-buteniloxi, 2-buteniloxi, etiniloxi, 1-propiniloxi, y 2-propiniloxi. La porción enlazante alquilo puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono, y puede tener, además, entre 1, 2, 3, 4, o 5 y 8, 9, 10, 11, o 12 átomos de carbono. La porción enlazante de ácido graso puede ser una porción de ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosaheenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato. La porción enlazante de ácido graso puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono y puede tener entre 1, 2, 3, 4, o 5 y 8, 10, 12, 14 o 16 átomos de carbono.

La porción de terminación, T, puede ser una porción alquilo o alcoxi. La porción alquilo o alcoxi puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 átomos de carbono. La porción alquilo o alcoxi puede tener, además, entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 átomos de carbono, y/o entre un límite inferior de 1, 2, 3, 4, o 5 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos de carbono. En algunas modalidades, la porción alquilo o alcoxi puede tener entre un límite inferior de 1, 2, 3, o 4 y un límite superior de 5, 6, o 7 átomos de carbono. La porción alquilo puede ser varias porciones alquilo lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. Las porciones alcoxi ilustrativas pueden ser varias porciones alcoxi que incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, pentiloxi, hexiloxi, heptiloxi, octiloxi, noniloxi, deciloxi, undeciloxi, dodeciloxi, trideciloxi, tetradeciloxi, pentadeciloxi, hexadeciloxi, octadeciloxi, nonadeciloxi, eicosiloxi, isopropoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, 2-metilbutoxi, *terc*-pentiloxi, 2-metilpentiloxi, 3-metilpentiloxi, 2-etilhexiloxi, 2-propilpentiloxi, viniloxi, aliloxi, 1-buteniloxi, 2-buteniloxi, etiniloxi, 1-propiniloxi, y 2-propiniloxi. La porción de terminación puede ser una porción alquilo de cadena corta tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, o *terc*-pentilo, o una porción alcoxi de cadena corta tal como metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, pentiloxi, o *terc*-pentiloxi. En ciertas modalidades, la porción de terminación es metilo o metoxi. Si bien la porción de terminación puede ser una porción alquilo o alcoxi, debe entenderse que la porción de terminación puede ser varias porciones como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, porciones de azúcar, colesterol, alcoholes, porciones de ácidos grasos y porciones de mPEG.

La porción activable, A, es una porción que permite el acoplamiento del oligómero a un agente activante para formar un oligómero activado capaz de acoplarse con el polipéptido de proinsulina. La porción activable puede ser varias porciones activables como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, -C(O)-OH, C(S)-OH, -C(S)-SH, -OH, -SH, y NH₂.

El oligómero puede comprender la estructura de Fórmula XII:



60

en donde:

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

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

Y es un éster, un éter, un carbamato, un carbonato, o una porción de enlace amida, y puede ser una porción de enlace éter;

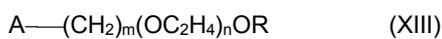
m está entre un límite inferior de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30, y puede estar entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22, y puede estar, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14, y/o entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9, o 10;

n está entre un límite inferior de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50, y puede estar entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20, y puede estar, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 subunidades de polialquilenglicol. En algunas modalidades, n puede estar entre un límite inferior de 4, 5, o 6 y un límite superior de 6, 7, o 8 subunidades de polialquilenglicol, y en ciertas modalidades, n es 7;

m y n no son 0 ambos; y

R es una porción alquilo, una porción de azúcar, colesterol, adamantano, una porción de alcohol, o una porción de ácido graso. La porción alquilo puede ser porciones alquilo lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. La porción alquilo puede ser una porción alquilo de cadena corta tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, o *terc*-pentilo. La porción alquilo puede ser, además, alquilo de C₁ a C₃. En ciertas modalidades, la porción alquilo es metilo. La porción de ácido graso puede ser una porción de ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato.

El oligómero puede comprender la estructura de Fórmula XIII:



en donde:

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

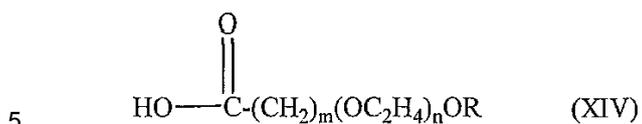
m puede estar entre un límite inferior de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30, y puede estar entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22, y puede estar, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14, y/o entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9, o 10;

n puede estar entre un límite inferior de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50, y puede estar entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20, y puede estar, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 subunidades de polialquilenglicol. En algunas modalidades, n puede estar entre un límite inferior de 4, 5, o 6 y un límite superior de 6, 7, o 8 subunidades de polialquilenglicol, y en ciertas modalidades, n es 7;

m y n no son 0 ambos; y

R es una porción alquilo, una porción de azúcar, colesterol, adamantano, una porción de alcohol, o una porción de ácido graso. La porción alquilo puede ser porciones alquilo lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. La porción alquilo puede ser una porción alquilo de cadena corta tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, o *terc*-pentilo. La porción alquilo puede ser, además, alquilo de C₁ a C₃. En algunas modalidades, la porción alquilo es metilo. La porción de ácido graso puede ser una porción de ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, lauroleato, miristoleato, palmitoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosahexaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato.

El oligómero puede comprender la estructura de Fórmula XIV:



en donde:

m puede estar entre un límite inferior de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30, y puede estar entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22, y puede estar, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 y un límite superior de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14, y/o entre un límite inferior de 3, 4, 5, 6, o 7 y un límite superior de 6, 7, 8, 9, o 10;

n puede estar entre un límite inferior de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 y un límite superior de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50, y puede estar entre un límite inferior de 2, 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20, y puede estar, además, entre un límite inferior de 3, 4, 5, o 6 y un límite superior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 subunidades de polialquilenglicol. En algunas modalidades, n puede estar entre un límite inferior de 4, 5, o 6 y un límite superior de 6, 7, o 8 subunidades de polialquilenglicol, y en ciertas modalidades, n puede ser 7;

m y n no son 0 ambos; y

R es una porción alquilo, una porción de azúcar, colesterol, adamantano, una porción de alcohol, o una porción de ácido graso. La porción alquilo puede ser porciones alquilo lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, isopropilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 2-metilbutilo, *terc*-pentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, 2-propilpentilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, etinilo, 1-propinilo, y 2-propinilo. La porción alquilo puede ser una porción alquilo de cadena corta tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, o *terc*-pentilo. La porción alquilo puede ser, además, alquilo de C₁ a C₃. En ciertas modalidades, la porción alquilo puede ser metilo. La porción de ácido graso puede ser una porción de ácido graso saturado o insaturado, lineal o ramificado como entenderán los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, lauroleato, miristoleato, palmítoleato, oleato, elaidato, erucato, linoleato, linolenato, araquidonato, eicosapentaenoato, docosaheptaenoato, acetato, caproato, caprilato, caprato, laurato, araquidato, behenato, lignocerato, y cerotato.

En las diversas modalidades del método para sintetizar conjugados de polipéptido de péptido C y oligómero descrito anteriormente, el oligómero se acopla covalentemente al polipéptido de péptido C. En algunas modalidades, el oligómero se acopla al polipéptido de péptido C con el uso de un enlace hidrolizable (por ejemplo, un enlace éster o carbonato). Un acoplamiento hidrolizable puede proporcionar un conjugado de polipéptido de péptido C y oligómero que actúa como un profármaco. En ciertos casos, por ejemplo donde el conjugado de polipéptido de péptido C y oligómero es biológicamente inactivo (es decir, el conjugado carece de la capacidad de afectar el cuerpo a través del mecanismo de acción principal del polipéptido de péptido C), un acoplamiento hidrolizable puede proporcionar un efecto de liberación en el tiempo o de liberación controlada, lo que proporciona el polipéptido de péptido C biológicamente activo durante un período de tiempo dado a medida que uno o más oligómeros se escinden de sus conjugados de polipéptido de péptido C y oligómero biológicamente inactivos respectivos para proporcionar el polipéptido de péptido C biológicamente activo. En modalidades alternativas, el oligómero se escinde para producir péptido C. En otras modalidades, el oligómero se acopla al polipéptido de péptido C con el uso de un enlace no hidrolizable (por ejemplo, un enlace carbamato, amida, o éter). El uso de un enlace no hidrolizable puede ser preferible cuando es conveniente permitir que el conjugado de polipéptido de péptido C y oligómero biológicamente inactivo circule en el torrente sanguíneo durante un período de tiempo prolongado, preferentemente, al menos 2 horas. Cuando el oligómero se acopla al polipéptido de péptido C con el uso de una porción de enlace que comprende una porción carbonilo, tal como un éster, un carbamato, un carbonato, o una porción de enlace amida, el conjugado de polipéptido de péptido C y oligómero resultante es un conjugado de polipéptido de péptido C y acil oligómero.

Los oligómeros empleados en los diversos métodos para sintetizar los conjugados de polipéptido de péptido C y oligómero descritos anteriormente están disponibles comercialmente o pueden sintetizarse por varios métodos como entenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, los oligómeros polidispersos pueden sintetizarse por los métodos que se proporcionan en una o más de las siguientes referencias: La patente de los Estados Unidos núm. 4,179,337 otorgada a Davis y otros; la patente de los Estados Unidos núm. 5,567,422 otorgada a Greenwald; la patente de los Estados Unidos núm. 5,359,030 otorgada a Ekwuribe; la patente de los Estados Unidos núm. 5,438,040 otorgada a Ekwuribe, la patente de los Estados Unidos núm. 5,681,811 otorgada a Ekwuribe, la patente de los Estados Unidos núm. 6,309,633 otorgada a Ekwuribe y otros. Los oligómeros no polidispersos (por ejemplo, sustancialmente monodispersos y monodispersos) pueden sintetizarse por los métodos que se proporcionan en una o más de las siguientes referencias: la solicitud de patente de los Estados Unidos con núm. de serie 09/873,731 presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe y otros titulada "Methods of Synthesizing Substantially Monodispersed Mixtures of Polymers Having Polyethylene Glycol Mixtures"; la solicitud de patente de los Estados Unidos con núm. de serie 09/873,797 presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe y otros titulada "Mixtures of Drug-Oligomer Conjugates Comprising

5 Polyalkylene Glycol, Uses Thereof, and Methods of Making Same"; y la solicitud de patente de los Estados Unidos con
núm. de serie 09/873,899 presentada el 4 de junio de 2001 por Ekwuribe y otros titulada "Mixtures of Insulin Drug-
Oligomer Conjugates Comprising Polyalkylene Glycol, Uses Thereof, and Methods of Making Same". Los oligómeros de
acuerdo con las modalidades de la presente invención pueden ser sustancialmente monodispersos y pueden ser,
además, monodispersos. Los métodos ilustrativos para sintetizar oligómeros monodispersos se proporcionan en los
Ejemplos que se proporcionan en la presente descripción.

10 El contacto del polipéptido de propéptido C con el oligómero en condiciones suficientes para proporcionar un conjugado
de polipéptido de propéptido C y oligómero puede realizarse con el uso de varias condiciones como entenderán los
expertos en la técnica. El contacto del polipéptido de propéptido C con el oligómero en condiciones suficientes para
proporcionar un conjugado de polipéptido de propéptido C y oligómero comprende poner con contacto el oligómero con
un agente activante en condiciones suficientes para proporcionar un oligómero activado; y poner en contacto el
oligómero activado con el polipéptido de propéptido C en condiciones suficientes para proporcionar el conjugado de
polipéptido de propéptido C. El oligómero activado puede formarse *ex situ* o *in situ*.

15 El agente activante puede ser varios agentes activantes capaces de activar uno o más de los oligómeros descritos
anteriormente de manera que el oligómero sea capaz de reaccionar con funciones hidroxilo y/o funciones amino
nucleofílicas en el polipéptido de proinsulina como entenderán los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan
a, N-hidroxisuccinimida, *p*-nitrofenil cloroforniato, 1,3-diciclohexilcarbodiimida, y hidroxibenzotriazida.

20 El experto en la técnica entenderá las condiciones suficientes para acoplar el agente activante al oligómero para
proporcionar un oligómero activado. Por ejemplo, el experto en la técnica puede referirse a R.C. Larock,
COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS. A GUIDE TO FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS (2d
Edición, Nueva York, Wiley-VCH, 1999).

25 Las condiciones suficientes para acoplar el oligómero activado al polipéptido de propéptido C se entenderán por un
experto en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido de propéptido C puede disolverse en un solvente aprótico dipolar, tal
como dimetilsulfóxido, para proporcionar una solución de polipéptido de propéptido C. Un agente amortiguador, tal como
trietilamina, puede añadirse a la solución de polipéptido de propéptido C. El oligómero activado disuelto en un solvente
anhidro tal como acetonitrilo puede añadirse después a la solución de polipéptido de propéptido C. El experto en la
técnica puede referirse, además, a R.C. Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS. A GUIDE TO
FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS (2d Edición, Nueva York, Wiley-VCH, 1999). La relación molar de oligómero
activado respecto a polipéptido de propéptido C puede ser mayor que aproximadamente 1:1, mayor que
aproximadamente 2:1, mayor que aproximadamente 3:1, mayor que aproximadamente 4:1, y/o mayor que
aproximadamente 5:1.

35 En las diversas modalidades de métodos para sintetizar los conjugados de polipéptido de péptido C y oligómero
descritos anteriormente, más de un oligómero (es decir, una pluralidad de oligómeros) pueden acoplarse a la porción de
polipéptido de péptido C del polipéptido de propéptido C. En otras modalidades, el(los) oligómero(s) puede(n)
conjugarse a las porciones de polipéptido de péptido C e insulina del polipéptido de propéptido C, por ejemplo, para
facilitar la separación. Los oligómeros en la pluralidad pueden ser iguales. Sin embargo, debe entenderse que los
oligómeros en la pluralidad pueden ser diferentes entre sí, o, alternativamente, algunos de los oligómeros en la
pluralidad pueden ser iguales y algunos pueden ser diferentes. Cuando una pluralidad de oligómeros se acopla a la
porción de polipéptido de péptido C del polipéptido de propéptido C, uno o más de los oligómeros pueden acoplarse a la
porción de polipéptido de péptido C del polipéptido de propéptido C con enlaces hidrolizables y uno o más de los
oligómeros pueden acoplarse a la porción de polipéptido de péptido C del polipéptido de propéptido C con enlaces no
hidrolizables. Alternativamente, todos los enlaces que acoplan la pluralidad de oligómeros a la porción de polipéptido de
péptido C del polipéptido de propéptido C pueden ser hidrolizables, pero tener grados variables de capacidad de
hidrólisis de manera que, por ejemplo, uno o más de los oligómeros se eliminan rápidamente del polipéptido de péptido
C o porción de polipéptido de péptido C del polipéptido de propéptido C por hidrólisis en el cuerpo y uno o más de los
oligómeros se eliminan lentamente del polipéptido de péptido C o porción de polipéptido de péptido C por hidrólisis en el
cuerpo.

40 En las diversas modalidades de los métodos para sintetizar conjugados de polipéptido de péptido C y oligómero
descritos anteriormente, el oligómero puede acoplarse a la porción de polipéptido de péptido C del polipéptido de
propéptido C (y opcionalmente a la porción de polipéptido de insulina y/o la porción de polipéptido líder cuando está
presente) en varios residuos nucleofílicos de la porción de polipéptido de péptido C que incluyen, pero no se limitan a,
funciones hidroxilo y/o funciones amino nucleofílicas. Las funciones hidroxilo nucleofílicas pueden encontrarse, por
ejemplo, en los residuos de serina y/o tirosina, y las funciones amino nucleofílicas pueden encontrarse, por ejemplo, en
los residuos de histidina y/o lisina, y/o en uno o más extremos N terminales del polipéptido. Cuando un oligómero se
acopla al uno o más extremos N terminales del polipéptido de proinsulina, el acoplamiento puede formar una amina
secundaria.

60 La escisión del uno o más péptidos del conjugado de polipéptido de propéptido C y oligómero para proporcionar el
conjugado de polipéptido de péptido C y oligómero puede realizarse por varios procesos como entenderán los expertos

5 en la técnica. La escisión del uno o más péptidos del conjugado de polipéptido de propéptido C y oligómero comprende poner con contacto el conjugado de polipéptido de propéptido C y oligómero con una o más enzimas que son capaces de escindir el(los) enlace(s) entre el uno o más péptidos y el polipéptido de péptido C en condiciones suficientes para escindir el uno o más péptidos del conjugado de polipéptido de propéptido C y oligómero. Como se describe en varias referencias, por ejemplo, Kemmler y otros "Studies on the Conversion of Proinsulin to Insulin," *J. Biol. Chem.*, **246**: 6786-6791 (1971), el experto en la técnica entenderá cómo seleccionar las enzimas adecuadas en vista del(de los) enlace(s) peptídico(s) particular(es) a escindir y cómo proporcionar condiciones suficientes para escindir el uno o más péptidos del conjugado de polipéptido de propéptido C y oligómero. La una o más enzimas pueden comprender varias enzimas que incluyen, pero no se limitan a, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa B, y mezclas de estas. En algunas modalidades, la una o más enzimas pueden ser tripsina, carboxipeptidasa B, y mezclas de estas.

10 La presente descripción proporciona un método para sintetizar un conjugado de polipéptido de insulina y oligómero que comprende:

15 (a) poner en contacto un polipéptido de proinsulina con un oligómero que comprende una porción hidrofílica y/o una porción lipofílica en condiciones suficientes para acoplar el oligómero al polipéptido de proinsulina y proporcionar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero, en donde el polipéptido de proinsulina comprende:

(i) un polipéptido de insulina; y
(ii) uno o más polipéptidos no insulínicos acoplados al polipéptido de insulina por enlace(s) peptídico(s) capaces de escindirse para producir el polipéptido de insulina; y

20 (b) escindir el uno o más polipéptidos no insulínicos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero. El aumento de la actividad con relación a la insulina está presente, por ejemplo, cuando la administración produce un efecto de disminución de glucosa que es mayor que el efecto de disminución de glucosa de una cantidad de insulina correspondiente.

25 El polipéptido de proinsulina puede comprender múltiples sitios de conjugación; y puede producirse un polipéptido de proinsulina con oligómero que comprende múltiples oligómeros y/o el polipéptido de proinsulina puede comprender uno o más sitios de conjugación en la porción de polipéptido de insulina de este, y puede producirse un polipéptido de proinsulina con oligómero que comprende uno o más oligómeros en la porción de polipéptido de insulina de este. En otra modalidad, los métodos pueden comprender un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero en donde uno o más de los polipéptidos no insulínicos no están conjugados.

30 Un polipéptido de proinsulina de los métodos puede comprender al menos un sitio de conjugación en la porción de polipéptido de insulina de este; y al menos un sitio de conjugación en una o más porciones de polipéptido no insulínico de este; y puede producirse un polipéptido de proinsulina con oligómero que puede comprender al menos un oligómero acoplado a la porción de polipéptido de insulina de este; y al menos un oligómero acoplado a una o más de las porciones de polipéptido no insulínico de este.

35 Los métodos de esta descripción pueden comprender, además, poner en contacto el oligómero con un agente activante en condiciones suficientes para proporcionar un oligómero activado capaz de acoplarse a una funcionalidad nucleofílica en el polipéptido de proinsulina; y poner en contacto el oligómero activado con el polipéptido de proinsulina en condiciones suficientes para proporcionar el conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero. En ciertas modalidades, los métodos pueden realizarse *in situ*.

40 En algunas modalidades de los métodos, la relación molar de oligómero activado respecto a polipéptido de proinsulina puede ser mayor que aproximadamente 1:1, mayor que aproximadamente 3:1, y/o mayor que aproximadamente 4:1.

45 El oligómero en los métodos puede comprender una porción de polietilenglicol y en algunas modalidades, el oligómero puede consistir esencialmente en una porción de polietilenglicol.

50 En los métodos, el polipéptido de insulina puede comprender un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, y puede comprender uno o más polipéptidos no insulínicos que comprenden un péptido conector acoplado en un primer extremo al extremo C terminal del polipéptido de cadena B y acoplado en un segundo extremo al extremo N terminal del polipéptido de cadena A. En algunas modalidades, la cadena B puede comprender un sitio de conjugación en B29, y el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero puede conjugarse en el sitio de conjugación B29. En otras modalidades, el polipéptido de proinsulina puede tener una sola lisina en B29, y el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero puede ser un monoconjugado en B29. En modalidades adicionales, el oligómero puede acoplarse a la lisina en la posición B29 de la insulina y a la fenilalanina en la posición B1 de la insulina, para formar de esta manera un diconjugado en B1, B29. El oligómero puede acoplarse, además, en el sitio de conjugación en B1 en la cadena B de la insulina, lo que resulta en un conjugado de polipéptido de insulina y oligómero que está conjugado en el sitio de conjugación B1. Aún en modalidades adicionales, el péptido conector puede ser un polipéptido de péptido C, que puede comprender una lisina, y los métodos de esta invención pueden producir un polipéptido de proinsulina con oligómero en el que la(s) lisina(s) del polipéptido de péptido C está(n) acoplada(s) a oligómero(s). En otras modalidades, el péptido conector puede carecer de residuos de lisina.

65 Además, en los métodos de esta descripción, el polipéptido de proinsulina puede comprender un péptido líder acoplado

al extremo N terminal del polipéptido de cadena B y el péptido líder puede comprender una lisina, y puede producirse un polipéptido de proinsulina con oligómero en el que la(s) lisina(s) del péptido líder está(n) acoplada(s) a oligómero(s). En algunas modalidades, el péptido líder puede carecer de residuos de lisina.

5 En algunas modalidades de los métodos, puede producirse un polipéptido de proinsulina con oligómero que comprende un oligómero acoplado en un extremo N terminal del péptido líder y en algunas modalidades, el uno o más o más polipéptidos no insulínicos pueden comprender un péptido líder acoplado al extremo N terminal del polipéptido de cadena B. El péptido líder puede comprender una lisina y puede producirse un polipéptido de proinsulina con oligómero en el que la(s) lisina(s) del péptido C está(n) acoplada(s) a oligómero(s). En otras modalidades, el péptido líder puede carecer de residuos de lisina.

10 En otras modalidades de los métodos, el polipéptido de proinsulina puede comprender un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, y el extremo C terminal del polipéptido de cadena B puede acoplarse al extremo N terminal del polipéptido de cadena A.

15 En algunas modalidades de los métodos, el polipéptido de proinsulina puede acoplarse en el extremo N terminal de la cadena B a un péptido líder por un enlace peptídico escindible. En otras modalidades, el polipéptido de insulina puede ser insulina y el oligómero puede acoplarse a la lisina en la posición B29 de la insulina o el oligómero puede acoplarse en la posición B1 y en la posición B29 de la insulina para formar un diconjugado.

20 Aún en otras modalidades de los métodos, el polipéptido de insulina puede ser un análogo de insulina que puede ser, pero no se limita a, Gln^{A21}insulina, humana; Gln^{A21} Gln^{B3} insulina, humana; Ala^{A21} insulina, humana; Ala^{A21} Gln^{B3} insulina, humana; Gln^{B3} insulina, humana; Gln^{B30} insulina, humana; Gln^{A21} Glu^{B30} insulina, humana; Gln^{A21} Gln^{B3} Glu^{B30} insulina, humana; Gln^{B3} Glu^{B30} insulina, humana; Asp^{B28} insulina, humana; Lis^{B28}insulina, humana; Leu^{B28} insulina, humana; Val^{B28} insulina, humana; Ala^{B28}insulina, humana; Asp^{B28} Pro^{B29} insulina, humana; Lis^{B28} Pro^{B29} insulina, humana; Leu^{B28} Pro^{B29} insulina, humana; Val^{B28} Pro^{B29} insulina, humana; Ala^{B28} Pro^{B29} insulina, humana.

25 El conjugado de polipéptido de insulina y oligómero puede estar equilibrado anfífilicamente y/o el oligómero puede estar presente como una mezcla sustancialmente monodispersa y/o el oligómero puede estar presente como una mezcla monodispersa.

30 La porción hidrofílica del oligómero puede ser una porción de polialquilenglicol y/o la porción de polialquilenglicol puede ser una porción de polietilenglicol. La porción de polialquilenglicol puede tener entre 1 y 50 subunidades de polialquilenglicol, entre 3 y 50 subunidades de polialquilenglicol, entre 2 y 10 subunidades de polialquilenglicol, entre 4 y 10 subunidades de polialquilenglicol, y/o al menos 2 subunidades de polialquilenglicol.

35 La porción lipofílica puede ser una porción alquilo o de ácido graso y la porción lipofílica puede tener entre 1 y 28 átomos de carbono, entre 2 y 24 átomos de carbono, entre 3 y 18 átomos de carbono, entre 4 y 12 átomos de carbono, entre 5 y 7 átomos de carbono, y/o entre 4 y 14 átomos de carbono.

40 La escisión de uno o más polipéptidos no insulínicos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero puede comprender poner en contacto el conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero con una o más enzimas que son capaces de escindir el(los) enlace(s) entre el uno o más polipéptidos no insulínicos y el polipéptido de insulina en condiciones suficientes para escindir el uno o más polipéptidos no insulínicos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero. La una o más enzimas pueden ser, por ejemplo, tripsina, carboxipeptidasa B, y/o mezclas de estas.

45 El péptido conector puede tener un residuo aminoacídico terminal en el primer extremo, y la escisión del péptido conector del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero puede comprender poner en contacto el conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero con una primera enzima en condiciones suficientes para proporcionar un conjugado de polipéptido de insulina con residuo aminoacídico terminal y oligómero; y poner en contacto el conjugado de polipéptido de insulina con residuo aminoacídico terminal y oligómero con una segunda enzima en condiciones suficientes para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero. El residuo aminoacídico terminal puede ser un residuo de arginina, el polipéptido de insulina puede ser insulina, y el péptido conector puede ser péptido C humano. En estas modalidades, el contacto del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero con una primera enzima y el contacto del conjugado de polipéptido de insulina con residuo aminoacídico terminal y oligómero con una segunda enzima puede producirse sustancialmente de forma simultánea. Además, la primera enzima y la segunda enzima pueden proporcionarse en una mezcla que comprende la primera enzima y la segunda enzima y en algunas modalidades, la primera enzima puede ser tripsina, y la segunda enzima puede ser carboxipeptidasa B.

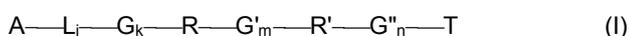
50 Los métodos pueden comprender, además, modificar químicamente uno o más de los oligómeros del conjugado de polipéptido de insulina y oligómero, activar uno o más de los oligómeros del conjugado de polipéptido de insulina y oligómero, alargar uno o más de los oligómeros del conjugado de polipéptido de insulina y oligómero y/o acortar uno o más de los oligómeros del conjugado de polipéptido de insulina y oligómero.

En los métodos de esta descripción, el rendimiento de conjugado de polipéptido de insulina y oligómero puede ser mayor que 75 por ciento, mayor que 85 por ciento, mayor que aproximadamente 90 por ciento, mayor que 95 por ciento, y/o mayor que 99 por ciento.

Los métodos de esta descripción comprenden, además, un método para sintetizar un polipéptido de insulina, que comprende sintetizar un conjugado de polipéptido de insulina y oligómero como se describe en la presente descripción e hidrolizar el(los) oligómero(s) del conjugado de polipéptido y oligómero para producir el polipéptido de insulina.

En la presente descripción se proporciona, además, un método para sintetizar insulina, que comprende sintetizar un conjugado de polipéptido de insulina y oligómero como se describe en la presente descripción e hidrolizar el(los) oligómero(s) del conjugado de polipéptido y oligómero para producir insulina.

En modalidades adicionales, la presente descripción proporciona un método para sintetizar un conjugado de polipéptido de insulina y oligómero que comprende: poner en contacto un polipéptido de proinsulina que comprende un polipéptido de insulina acoplado a uno o más polipéptidos no insulínicos por enlace(s) peptídico(s) capaces de escindirse para producir el polipéptido de insulina con un oligómero que comprende la estructura de Fórmula I:



en donde:

A es una porción activable;

L es una porción enlazante opcional;

G, G' y G'' son cada una porciones espaciadoras opcionales;

R es una porción lipofílica y R' es una porción de polialquilenglicol, o R' es la porción lipofílica y R es la porción de polialquilenglicol, y en donde, (i) R y R' están ambas presentes, o (ii) R y G están ausentes y L está acoplada a G' si está presente o a R' si G' no está presente, o (iii) R' y G'' están ausentes y T está acoplado a G' si está presente o a R si G' no está presente;

T es una porción de terminación; y

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

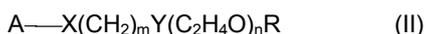
en condiciones suficientes para acoplar el oligómero a la porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina y proporcionar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero; y

(b) escindir el uno o más polipéptidos no insulínicos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero.

En ciertas modalidades de los métodos de esta descripción, R y R' pueden estar ambos presentes; R y G pueden estar ausentes y L puede acoplarse a G' si está presente o a R' si G' no está presente; R' puede ser una porción de polietilenglicol; R' y G'' pueden estar ausentes y T puede acoplarse a G' si está presente o a R si G' no está presente; A puede ser -C(O)-OH, C(S)-OH, -C(S)-SH, -OH, -SH, y/o NH₂; L puede ser una porción alquilo o una porción de ácido graso; G, G' y G'' pueden seleccionarse individualmente de porciones de azúcar, colesterol, y porciones de glicerina; y/o T puede ser alquilo y alcoxi.

En modalidades específicas de los métodos de esta descripción, A puede ser una porción de ácido carboxílico; R puede ser una porción alquilo que tiene entre 3 y 8 átomos de carbono; R' puede ser un polietilenglicol que tiene entre 4 y 10 subunidades de polietilenglicol; T puede ser un alquilo de cadena corta o alcoxi de cadena corta; y j, k, m y n pueden ser 0. En otras modalidades, A puede ser una porción de ácido carboxílico; R puede ser una porción alquilo que tiene entre 3 y 8 átomos de carbono; R' puede ser un polietilenglicol que tiene 7 subunidades de polietilenglicol; T puede ser metoxi; y j, k, m y n pueden ser 0.

En la presente descripción se proporciona, además, un método para sintetizar un conjugado de polipéptido de insulina y oligómero que comprende: poner en contacto un polipéptido de proinsulina que comprende un polipéptido de insulina acoplado a uno o más polipéptidos no insulínicos por enlace(s) peptídico(s) capaces de escindirse para producir el polipéptido de insulina con un oligómero que comprende la estructura de Fórmula II:



en donde:

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

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

Y es un éster, un éter, un carbamato, un carbonato, o una porción de enlace amida;

m está entre 0 y 30;

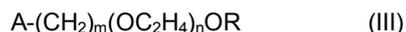
n está entre 0 y 50;

m y n no son 0 ambos; y

R es una porción alquilo, una porción de azúcar, colesterol, adamantano, una porción de alcohol, o una porción de ácido graso;

en condiciones suficientes para acoplar el oligómero a la porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina y proporcionar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero; y escindir el uno o más polipéptidos no insulínicos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero.

Se proporciona, además, un método para sintetizar un conjugado de polipéptido de insulina y oligómero que comprende: poner en contacto un polipéptido de proinsulina que comprende un polipéptido de insulina acoplado a uno o más polipéptidos no insulínicos por enlace(s) peptídico(s) capaces de escindirse para producir el polipéptido de insulina con un oligómero que comprende la estructura de Fórmula III:



en donde:

A es $-C(O)-OH$, $C(S)-OH$, $-C(S)-SH$, $-OH$, $-SH$, o NH_2 ;

m está entre 0 y 25;

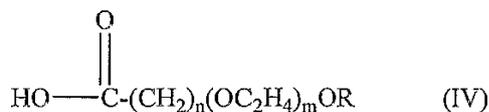
n está entre 0 y 25;

m y n no son 0 ambos; y

R es alquilo;

en condiciones suficientes para acoplar el oligómero a la porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina y proporcionar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero; y escindir el uno o más polipéptidos no insulínicos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero.

Adicionalmente se proporciona un método para sintetizar un conjugado de polipéptido de insulina y oligómero que comprende: poner en contacto un polipéptido de proinsulina que comprende un polipéptido de insulina que tiene un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, que comprende un residuo de lisina; un péptido conector acoplado en un primer extremo al extremo C terminal del polipéptido de cadena B y acoplado en un segundo extremo al extremo N terminal del polipéptido de cadena A; y un péptido líder acoplado al extremo N terminal del polipéptido de cadena B con un oligómero que comprende la estructura de Fórmula IV:



en donde:

m está entre 0 y 30;

n está entre 0 y 50;

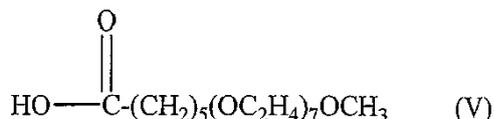
m y n no son 0 ambos; y

R es alquilo;

en condiciones suficientes para acoplar el oligómero al residuo de lisina del polipéptido de cadena B de la porción de polipéptido de insulina del polipéptido de proinsulina y proporcionar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero; y escindir enzimáticamente el péptido conector y el péptido líder del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero.

En los métodos descritos en la presente descripción, m puede estar entre 3 y 16, entre 4 y 14, y/o entre 5 y 10. En algunas modalidades, n puede estar entre 3 y 18, entre 4 y 14 y/o entre 5 y 10 y R puede ser un alquilo de cadena corta, R puede ser un alquilo C1 a C3, y/o R puede ser un metilo.

La presente descripción proporciona, además, un método para sintetizar un conjugado de insulina y oligómero que comprende: poner en contacto un polipéptido de proinsulina, que comprende proinsulina acoplada en su extremo N terminal a un péptido líder, con un oligómero que comprende la estructura de Fórmula V:

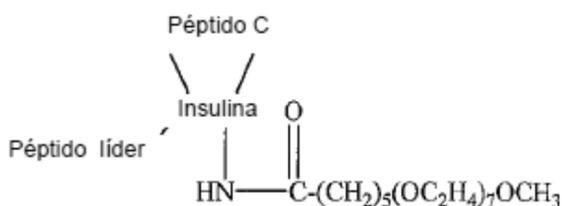


en condiciones suficientes para acoplar el oligómero al residuo de lisina B29 de la proinsulina y proporcionar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero; y escindir enzimáticamente el péptido C y el péptido líder del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero para proporcionar el conjugado de insulina y oligómero.

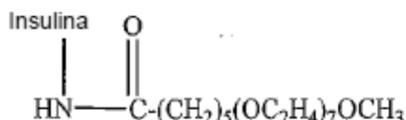
En los métodos descritos en la presente descripción, la escisión enzimática del péptido C y el péptido líder del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero puede comprender poner en contacto el conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero con una primera enzima en condiciones suficientes para proporcionar un conjugado de (Arg³¹)-insulina y oligómero; y poner en contacto el conjugado de polipéptido de (Arg³¹)-insulina y oligómero con una segunda enzima en condiciones suficientes para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero. La primera enzima puede ser tripsina y la segunda enzima puede ser carboxipeptidasa B.

En la presente descripción se proporciona, además, un método para sintetizar un conjugado de polipéptido de insulina y acil oligómero, que comprende escindir enzimáticamente uno o más polipéptidos no insulínicos de un conjugado de polipéptido de proinsulina y acil oligómero para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y acil oligómero.

En otra modalidad, la presente descripción proporciona un método para sintetizar un conjugado de insulina y acil oligómero que comprende escindir enzimáticamente un péptido líder y un péptido C de un conjugado de polipéptido de proinsulina y acil oligómero que comprende la siguiente estructura:



para proporcionar el conjugado de insulina y acil oligómero que comprende la siguiente estructura:



En los métodos descritos en la presente descripción, el péptido líder puede carecer de residuos de lisina y/o la escisión enzimática del péptido C y el péptido líder del conjugado de polipéptido de proinsulina y acil oligómero puede comprender poner en contacto el conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero con una primera enzima en condiciones suficientes para proporcionar un conjugado de (Arg³¹)-insulina y oligómero; y poner en contacto el conjugado de polipéptido de (Arg³¹)-insulina y oligómero con una segunda enzima en condiciones suficientes para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero. La primera enzima puede ser tripsina y la segunda enzima puede ser carboxipeptidasa B.

En la presente descripción se proporciona, además, un método para sintetizar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero que comprende poner en contacto un polipéptido de proinsulina con un oligómero que comprende una porción hidrofílica y una porción lipofílica en condiciones suficientes para proporcionar el conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero.

Se proporciona, además, un método para sintetizar un conjugado de polipéptido de péptido C y oligómero que comprende: poner en contacto un polipéptido de propéptido C que comprende un polipéptido de péptido C acoplado a uno o más polipéptidos no insulínicos por enlace(s) peptídico(s) escindible(s) para producir el polipéptido de péptido C con un oligómero en condiciones suficientes para acoplar el oligómero a la porción de polipéptido de péptido C del polipéptido de propéptido C y proporcionar un conjugado de polipéptido de propéptido C y oligómero; y escindir el uno o más polipéptidos no insulínicos del conjugado de polipéptido de propéptido C y oligómero para proporcionar el conjugado de polipéptido de péptido C y oligómero. El polipéptido de péptido C puede ser péptido C, el polipéptido de propéptido C puede ser un polipéptido de proinsulina, y/o el polipéptido de propéptido C puede ser proinsulina.

Se apreciará que aunque la discusión anterior se enfoca principalmente en polipéptidos de insulina y similares, los principios de la descripción pueden aplicarse de igual modo a la fabricación de otros propolipéptidos. Así, por ejemplo, los principios de la descripción pueden aplicarse a polipéptidos pro-X, donde X puede ser, pero no se limita a, insulina, hormona paratiroidea (1-34) (PTH (1-34)), péptido natriurético humano de tipo B (hBNP), péptido natriurético atrial (ANP), péptido similar a glucagón 1 (GLP 1), factor de liberación de colecistoquinina luminal (LCRF), péptido C, leu-encefalina, met-encefalina, lisina-leu-encefalina, así como cualquier otro polipéptido o análogo de un polipéptido actualmente conocido o que se identifique posteriormente, para el que pueda producirse un propolipéptido y/o pueda producirse un polipéptido a partir de un propolipéptido de acuerdo con la presente descripción.

Así, en una modalidad, la presente descripción proporciona un método para sintetizar un conjugado de polipéptido X y

- oligómero. El método incluye, generalmente, poner en contacto un polipéptido pro-X con un oligómero que comprende una porción hidrofílica y/o una porción lipofílica. La etapa de contacto se produce, generalmente, en condiciones suficientes para acoplar el oligómero al polipéptido pro-X y proporcionar un conjugado de polipéptido pro-X y oligómero. El polipéptido pro-X incluye, generalmente, un polipéptido X y uno o más polipéptidos no X acoplados al polipéptido X por enlace(s) peptídico(s) capaces de escindirse para producir el polipéptido X. Después de la conjugación, el método incluye, generalmente, escindir el uno o más polipéptidos no X del conjugado de polipéptido pro-X y oligómero para proporcionar el conjugado de polipéptido X y oligómero.
- 5 El polipéptido pro-X puede incluir múltiples sitios de conjugación, y puede producirse un polipéptido pro-X y oligómero que comprende múltiples oligómeros. El polipéptido pro-X puede incluir uno o más sitios de conjugación en la porción de polipéptido X de este, y puede producirse un polipéptido pro-X con oligómero que comprende uno o más oligómeros en la porción de polipéptido X de este. Los métodos de esta descripción pueden usarse, además, para producir un conjugado de polipéptido pro-X y oligómero en donde uno o más de los polipéptidos no X no están conjugados.
- 10 El polipéptido pro-X puede incluir al menos un sitio de conjugación en la porción de polipéptido X de este. El polipéptido pro-X puede incluir al menos un sitio de conjugación en una o más porciones de polipéptido no X de este. Puede producirse un polipéptido pro-X con oligómero que puede incluir al menos un oligómero acoplado a la porción de polipéptido X de este; y al menos un oligómero acoplado a una o más de las porciones de polipéptido no X de este.
- 15 Los métodos de esta descripción pueden incluir, además, poner en contacto el oligómero con un agente activante en condiciones suficientes para proporcionar un oligómero activado capaz de acoplarse a una funcionalidad nucleofílica en el polipéptido pro-X; y poner en contacto el oligómero activado con el polipéptido pro-X en condiciones suficientes para proporcionar el conjugado de polipéptido pro-X y oligómero. Los métodos pueden realizarse in situ.
- 20 En algunas modalidades de los métodos de esta descripción, la relación molar de oligómero activado respecto a polipéptido pro-X puede ser mayor que aproximadamente 1:1, mayor que aproximadamente 3:1, y/o mayor que aproximadamente 4:1.
- 25 En algunas modalidades, el oligómero se acopla al polipéptido pro-X en un sitio de conjugación que está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos del sitio de hidrólisis (contando el último péptido que queda después de la hidrólisis como el aminoácido 1 del sitio de hidrólisis).
- 30 Los oligómeros usados pueden incluir una porción de polietilenglicol y en algunas modalidades, el oligómero puede consistir esencialmente en una porción de polietilenglicol. La porción de polietilenglicol puede incluir, en algunas modalidades 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 subunidades de polietilenglicol, y puede ser lineal, ramificada, y/o en bucle.
- 35 En los métodos de esta descripción, el polipéptido X puede incluir dos o más cadenas polipeptídicas, y puede incluir uno o más polipéptidos no X acoplados a las cadenas polipeptídicas. Las cadenas polipeptídicas pueden incluir sitios de conjugación, tales como amino terminales y/o grupos funcionales conjugables, tales como cadenas laterales de lisina. El conjugado de polipéptido X y oligómero puede conjugarse en uno o más de los sitios de conjugación. En algunas modalidades, el polipéptido pro-X puede tener una sola lisina, y el conjugado de polipéptido X y oligómero puede ser un monoconjugado. Aún en modalidades adicionales, el polipéptido pro-X puede incluir un péptido conector o un polipéptido de péptido C que conecta una o más subunidades del polipéptido pro-X. Los métodos pueden producir un polipéptido pro-X con oligómero en el que la(s) lisina(s) del polipéptido conector o péptido C está(n) acoplada(s) a oligómero(s). En otras modalidades, el péptido conector o péptido C puede carecer de residuos de lisina.
- 40 El polipéptido pro-X puede incluir un péptido líder acoplado a un extremo N terminal del polipéptido pro-X o una subunidad de polipéptido de este. El péptido líder puede incluir una o más lisinas, y puede producirse un polipéptido pro-X con oligómero en el que la(s) lisina(s) del péptido líder está(n) acoplada(s) a oligómero(s). En algunas modalidades, el péptido líder puede carecer de residuos de lisina.
- 45 En algunas modalidades de los métodos de esta descripción, puede producirse un polipéptido pro-X con oligómero que comprende un oligómero acoplado en un extremo N terminal del péptido líder. El uno o más polipéptidos no X pueden incluir un péptido líder acoplado a un extremo N terminal del polipéptido X. El péptido líder puede incluir una lisina y puede producirse un conjugado de polipéptido pro-X y oligómero en el que la(s) lisina(s) del péptido C está(n) acoplada(s) a oligómero(s). En otras modalidades, el péptido líder puede carecer de residuos de lisina.
- 50 El polipéptido pro-X puede incluir un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, y el extremo C terminal del polipéptido de cadena B puede acoplarse al extremo N terminal del polipéptido de cadena A.
- 55 El polipéptido pro-X puede acoplarse en el extremo N terminal de la cadena B a un péptido líder por un enlace peptídico escindible. En otras modalidades, el polipéptido X puede ser insulina y el oligómero puede acoplarse a la lisina en la posición B29 de la insulina.
- 60
- 65

El método de la descripción puede usarse para producir péptidos nativos conjugados, así como análogos de péptidos nativos conjugados.

5 El conjugado de polipéptido X y oligómero puede estar equilibrado anfífilicamente. El polipéptido X con oligómero puede ser soluble en solventes orgánicos así como en agua. El oligómero puede estar presente como una mezcla sustancialmente monodispersa y/o el oligómero puede estar presente como una mezcla monodispersa. La porción hidrofílica del oligómero puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en una porción de polialquilenglicol y/o la porción de polialquilenglicol puede ser una porción de polietilenglicol. La porción de polialquilenglicol puede tener
10 entre 1 y 50 subunidades de polialquilenglicol, entre 3 y 50 subunidades de polialquilenglicol, entre 2 y 10 subunidades de polialquilenglicol, entre 4 y 10 subunidades de polialquilenglicol, y/o al menos 2 subunidades de polialquilenglicol.

La porción lipofílica puede ser una porción alquilo o de ácido graso y la porción lipofílica puede tener entre 1 y 28 átomos de carbono, entre 2 y 24 átomos de carbono, entre 3 y 18 átomos de carbono, entre 4 y 12 átomos de carbono,
15 entre 5 y 7 átomos de carbono, y/o entre 4 y 14 átomos de carbono.

La escisión de uno o más polipéptidos no X del conjugado de polipéptido pro-X y oligómero puede incluir poner en contacto el conjugado de polipéptido pro-X y oligómero con una o más enzimas que son capaces de escindir el(los) enlace(s) entre el uno o más polipéptidos no X y el polipéptido X en condiciones suficientes para escindir el uno o más polipéptidos no X del conjugado de polipéptido pro-X y oligómero. La una o más enzimas pueden ser, por ejemplo, tripsina, carboxipeptidasa B, y/o mezclas de estas.
20

El péptido conector puede tener un residuo aminoacídico terminal en el primer extremo, y la escisión del péptido conector del conjugado de polipéptido pro-X y oligómero puede incluir poner en contacto el conjugado de polipéptido pro-X y oligómero con una primera enzima en condiciones suficientes para proporcionar un conjugado de polipéptido X con residuo aminoacídico terminal y oligómero; y poner en contacto el conjugado de polipéptido X con residuo aminoacídico terminal y oligómero con una segunda enzima en condiciones suficientes para proporcionar el conjugado de polipéptido X y oligómero. El residuo aminoacídico terminal puede ser un residuo de arginina, el polipéptido X puede ser insulina, y el péptido conector puede ser péptido C humano.
25
30

El contacto del conjugado de polipéptido pro-X y oligómero con una primera enzima y el contacto del conjugado de polipéptido X con residuo aminoacídico terminal y oligómero con una segunda enzima puede producirse sustancialmente de forma simultánea. Además, la primera enzima y la segunda enzima pueden proporcionarse en una mezcla que comprende la primera enzima y la segunda enzima y en algunas modalidades, la primera enzima puede ser tripsina, y la segunda enzima puede ser carboxipeptidasa B.
35

Los métodos de esta descripción pueden incluir, además, modificar químicamente uno o más de los oligómeros del conjugado de polipéptido X y oligómero, activar el uno o más de los oligómeros del conjugado de polipéptido X y oligómero, alargar uno o más de los oligómeros del conjugado de polipéptido X y oligómero y/o acortar uno o más de los oligómeros del conjugado de polipéptido X y oligómero.
40

En los métodos de esta descripción, el rendimiento del conjugado de polipéptido X y oligómero puede ser mayor que 75 por ciento, mayor que 85 por ciento, mayor que aproximadamente 90 por ciento, mayor que 95 por ciento, y/o mayor que 99 por ciento.
45

Los métodos de esta descripción, incluyen, además, un método para sintetizar un polipéptido X, que comprende sintetizar un conjugado de polipéptido X y oligómero como se describe en la presente descripción e hidrolizar el(los) oligómero(s) del conjugado de polipéptido y oligómero para producir el polipéptido X.

50 En la presente descripción se proporciona, además, un método para sintetizar un polipéptido X, que comprende sintetizar un conjugado de polipéptido X y oligómero como se describe en la presente descripción e hidrolizar el(los) oligómero(s) del conjugado de polipéptido y oligómero para producir polipéptido X.

Un producto de los métodos puede ser proinsulina o péptido pro-X conjugado parcialmente escindido, por ejemplo, escisión parcial del péptido C o péptido conector.
55

Los oligómeros útiles para la conjugación de polipéptidos pro-X incluyen oligómeros como se describe en la presente descripción, tales como oligómeros de las Fórmulas I, II, III, IV, V, y VI descritas anteriormente.

60 Se proporciona una composición farmacéutica que incluye (i) un conjugado de polipéptido y oligómero que comprende un propolipéptido que comprende un polipéptido bioactivo acoplado a un péptido por un enlace peptídico que es escindible *in vitro* o *in vivo* para producir el polipéptido bioactivo y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se proporcionan, además, composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero de acuerdo con las modalidades de la presente descripción. Los conjugados de polipéptido de proinsulina y
65

oligómero descritos anteriormente pueden formularse para su administración en un portador farmacéutico de acuerdo con técnicas conocidas. Ver, por ejemplo, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy* (9na Ed. 1995).

5 En la fabricación de una composición farmacéutica, el conjugado de propolipéptido y oligómero se mezcla típicamente con, *inter alia*, un portador farmacéuticamente aceptable. El portador debe ser, por supuesto, aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente en 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, preferentemente, con el conjugado de propolipéptido y oligómero como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, una tableta, que puede contener de aproximadamente 0.01 o 0.5 % a aproximadamente 95 % o 99 % en peso del conjugado de propolipéptido y oligómero. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse por cualquiera de las técnicas de farmacia muy conocidas, lo que incluye, pero sin limitarse a, la mezcla de los componentes, lo que incluye opcionalmente uno o más ingredientes accesorios.

15 En algunas modalidades, el propolipéptido es proinsulina, un análogo de proinsulina, un fragmento de proinsulina, un análogo de fragmento de proinsulina, preproinsulina, un análogo de preproinsulina, un fragmento de preproinsulina, o un análogo de fragmento de preproinsulina y la afección tratable es una deficiencia de insulina, tal como diabetes Tipo I o Tipo II.

20 La presente descripción proporciona, además, composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de insulina y oligómero y/o péptido C y oligómero y/o conjugados de propéptido de insulina y oligómero de esta invención en un portador farmacéuticamente aceptable y métodos para administrar dichas composiciones farmacéuticas a un sujeto para tratar una deficiencia de insulina o un trastorno asociado con una deficiencia de insulina.

25 Como se usa en la presente descripción, un "portador farmacéuticamente aceptable" de acuerdo con la presente descripción es un componente tal como un portador, diluyente, o excipiente de una composición que es compatible con los otros ingredientes de la composición en que puede combinarse con los compuestos y/o composiciones de la presente descripción sin eliminar la actividad biológica de los compuestos o las composiciones, y es adecuado para su uso en sujetos como se proporciona en la presente descripción sin efectos secundarios adversos excesivos (tales como toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y muerte). Los efectos secundarios son "excesivos" cuando su riesgo es mayor que el beneficio proporcionado por la composición farmacéutica. Los ejemplos no limitantes de componentes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándares tales como soluciones salinas reguladas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua o emulsiones agua/aceite, microemulsiones, y varios tipos de agentes humectantes.

35 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir varios excipientes adecuados como entenderán los expertos en la técnica, tales como los que se encuentran en el National Formulary 19, páginas 2404-2406 (2000). Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden incluir agentes lubricantes tales como, por ejemplo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes aglutinantes tales como almidones, goma arábiga, celulosa microcristalina, celulosa, metilcelulosa, y jarabe; agentes antiapelmazantes tales como silicato de calcio; agentes de revestimiento tales como metacrilatos y goma laca; agentes conservantes tales como hidroxibenzoatos de metilo y propilo; agentes edulcorantes; o agentes saborizantes. Pueden usarse, además, polioles y rellenos inertes. Los ejemplos de polioles incluyen, pero no se limitan a, manitol, sorbitol, xilitol, sacarosa, maltosa, glucosa, lactosa, dextrosa, y similares. Otros rellenos inertes que pueden usarse abarcan los que se conocen en la técnica y son útiles en la fabricación de varias formas de dosificación. Si se desea, las formulaciones sólidas pueden incluir otros componentes tales como agentes de carga y/o agentes de granulación, y similares. Los productos farmacéuticos de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida, o retrasada del ingrediente activo después de la administración a un sujeto mediante el empleo de procedimientos muy conocidos en la técnica.

50 La presente descripción proporciona, además, composiciones farmacéuticas que incluyen aquellas adecuadas para la administración por vía oral, rectal, tópica, 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, superficies de la piel y las mucosas, que incluyen las superficies de las vías respiratorias) y transdérmica, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y la gravedad de la afección tratada y de la naturaleza del conjugado de fármaco de insulina y oligómero particular usado.

60 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración por vía oral pueden presentarse en unidades discretas, tales como cápsulas, sellos para medicamentos, pastillas, o tabletas, que contienen cada uno una cantidad predeterminada de los conjugados de fármaco de insulina y 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 de agua en aceite. Tales formulaciones pueden prepararse por cualquier método de farmacia adecuado que incluya la etapa de poner en asociación el conjugado de fármaco de insulina y oligómero y un portador adecuado (que puede contener uno o más ingredientes accesorios como se señaló anteriormente). En general, la composición farmacéutica de la invención puede prepararse por mezcla uniforme e íntima del conjugado de fármaco de insulina y oligómero con un portador líquido o sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, la conformación de la mezcla resultante.

La composición farmacéutica puede ser una composición farmacéutica líquida adecuada para la administración por vía oral. Cuando la composición farmacéutica es una composición farmacéutica líquida, la composición puede incluir un agente amortiguador como se describió anteriormente. Las composiciones farmacéuticas líquidas pueden tener un pH que es fisiológicamente compatible. Las composiciones farmacéuticas líquidas pueden tener un pH que está entre 6.2 y 9.0. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas líquidas tienen un pH que está entre un límite inferior de 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, o 7.7 y un límite superior de 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, o 8.9. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas líquidas tienen un pH que está entre 7.0 y 8.5. En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas líquidas de acuerdo con modalidades de la presente invención tienen un pH que está entre 7.4 y 8.2.

En otras modalidades la composición farmacéutica es una composición farmacéutica sólida adecuada para la administración por vía oral. La composición farmacéutica sólida puede prepararse por varios métodos como entenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, una tableta puede prepararse mediante la compresión o moldeo de un polvo o gránulos que contienen la mezcla de conjugado de fármaco de insulina y oligómero, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas pueden prepararse por compresión, en una máquina adecuada, de la mezcla en una forma de flujo libre, tal como un polvo o gránulos mezclados opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, y/o agente(s) activo(s) de superficie/dispersantes. Las tabletas moldeadas pueden fabricarse por moldeo, en una máquina adecuada, de la composición en polvo humedecida con un aglutinante líquido inerte.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración por vía bucal (sublingual) incluyen pastillas que comprenden el conjugado de fármaco de insulina y oligómero en una base saborizada, usualmente un edulcorante artificial y acacia o tragacanto; y comprimidos que comprenden el conjugado de fármaco de insulina y oligómero en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que comprenden el conjugado de fármaco de insulina y oligómero, cuyas preparaciones pueden ser isotónicas con la sangre del receptor previsto. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que hacen la composición isotónica con la sangre del receptor previsto. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo ámpulas y frascos sellados, y pueden almacenarse en una condición seca por congelación (liofilizada) que sólo requiere la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyección inmediatamente antes del uso.

Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo descrito anteriormente. Por ejemplo, puede proporcionarse una composición estéril inyectable, estable, que comprende el conjugado de fármaco de insulina y oligómero en una forma de dosificación unitaria en un recipiente sellado. El conjugado de fármaco de insulina y oligómero se proporciona en forma de un liofilizado que es capaz de reconstituirse con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado para formar una composición líquida adecuada para inyectarla en un sujeto.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, además, un componente amortiguador. El componente amortiguador puede comprender varios agentes amortiguadores como entenderán los expertos en la técnica. Los agentes amortiguadores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido fosfórico), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico), bases orgánicas (por ejemplo, tris base (tris(hidroximetil)aminometano), trolamina (trietanolamina), o histadina), y mezclas de estos. El componente amortiguador puede comprender una base orgánica, y puede comprender tris base, trolamina, o una mezcla de estos. En algunas modalidades, el componente amortiguador comprende un ácido orgánico y una base orgánica, y puede comprender ácido cítrico y tris base, trolamina, o una mezcla de estos. El agente amortiguador puede estar presente en una cantidad que amortiguará la composición farmacéutica contra el ambiente ácido que puede experimentarse en el intestino como entenderá el experto en la técnica.

La forma de dosificación unitaria de las composiciones puede encontrarse en el intervalo de aproximadamente 1.0 µg a aproximadamente 10 gramos del conjugado de fármaco de insulina y oligómero. Cuando el conjugado de fármaco de insulina y oligómero es sustancialmente insoluble en agua, puede emplearse una cantidad suficiente de agente emulsionante que sea fisiológicamente aceptable en cantidad suficiente para emulsionar el conjugado de fármaco de insulina y oligómero en un portador acuoso. Uno de tales agentes emulsionantes útiles es la fosfatidilcolina.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración por vía rectal pueden presentarse supositorios de dosis unitaria. Estos pueden prepararse mediante la mezcla del conjugado de fármaco de insulina y oligómero con uno o más portadores sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y posterior conformación de la mezcla resultante.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la aplicación tópica a la piel pueden adoptar la forma de un ungüento, crema, loción, pasta, gel, rocío, aerosol, parche transdérmico o aceite. Los portadores que pueden usarse

incluyen, pero no se limitan a, gelatina de petróleo, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos, y combinaciones de dos o más de estos.

5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos que se adaptan para mantenerse en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Las composiciones adecuadas para la administración transdérmica pueden suministrarse, además, por iontoforesis (ver, por ejemplo, *Pharmaceutical Research* 3 (6):318 (1986)) y adoptarán, típicamente, la forma de una solución acuosa opcionalmente amortiguada del conjugado de fármaco de insulina y oligómero. Las formulaciones adecuadas comprenden citrato o amortiguador bis\tris (pH 6) o etanol/agua y pueden contener, por ejemplo, de 0.1 a 10 0.2 M de ingrediente activo.

Se proporcionan, además, métodos para tratar una deficiencia de insulina y/o trastornos asociados con una deficiencia de insulina en un sujeto que necesita este tratamiento mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las diversas composiciones farmacéuticas de la presente descripción. La cantidad eficaz del conjugado de fármaco de insulina y oligómero, puede variar un tanto de conjugado a conjugado, y de sujeto a sujeto, y dependerá, por ejemplo, de factores tales como la edad y afección del sujeto, la gravedad de la afección a tratar y/o la vía de suministro. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por un experto en la técnica por referencia a los textos y la literatura pertinentes y/o mediante el uso de experimentación de rutina. (Ver, por ejemplo, *Remington, The Science and Practice of Pharmacy* (9na Ed. 1995). Una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones farmacéuticas de esta descripción puede incluir aquellas cantidades que resultan en, o mantienen, los niveles de glucosa en sangre en un intervalo normal, como bien conocerá el experto en la técnica.

25 Un sujeto de esta descripción puede ser cualquier animal que produce insulina y es por lo tanto susceptible a deficiencia de insulina y/o trastornos relacionados con una deficiencia de insulina y serán capaces de tratarse con las composiciones de esta invención. El sujeto puede ser cualquier mamífero y el mamífero puede ser un ser humano.

En la presente descripción se proporcionan, además, métodos para tratar una afección tratable por un polipéptido bioactivo en un sujeto que necesita este tratamiento que incluyen administrar al sujeto una cantidad eficaz de un conjugado de propolipéptido y oligómero, cuyo conjugado comprende el polipéptido bioactivo acoplado a un péptido por un enlace peptídico que es escindible *in vivo* para producir el polipéptido bioactivo, y un oligómero acoplado a la porción de polipéptido bioactivo del propolipéptido.

35 Como un ejemplo, una dosis de aproximadamente 1.0 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, que incluye cualquier intervalo de dosis entre estos valores, tendrá eficacia terapéutica, con todos los pesos calculados en base al peso del conjugado de insulina y/o fármaco de insulina y oligómero. Los problemas de toxicidad al mayor nivel pueden restringir las dosis intravenosas a un nivel más bajo tal como hasta aproximadamente 10 mg/kg, con todos los pesos calculados en base al peso de la base activa. Una dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg puede emplearse para la administración por vía oral. Típicamente, una dosis de aproximadamente 0.5 mg/kg a 5 mg/kg puede emplearse para inyección intramuscular. La frecuencia de administración puede ser, por ejemplo, de una, dos o tres veces al día o según sea necesario para controlar la afección. El control de la afección y la eficacia del tratamiento puede determinarse fácilmente por los expertos en la técnica del estudio y/o tratamiento de deficiencias de insulina y/o trastornos relacionados. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por infusión continua. La duración del tratamiento depende del tipo de deficiencia de insulina tratada y puede ser por tanto 45 tiempo como la vida del sujeto.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

50 Ejemplo 1

Síntesis de éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ílico de ácido 6-(2-{2-[2-(2-12-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-etoxil-etoxi)-etoxi]-etoxi)-hexanoico (8)

55 Hexaetilenglicol monobencil éter (1). Una solución acuosa de hidróxido de sodio preparada por disolución de 3.99 g (100 mmol) de NaOH en 4 ml de agua se añadió lentamente a hexaetilenglicol monodisperso (28.175 g, 25 ml, 100 mmol). Se añadió cloruro de bencilo (3.9 g, 30.8 mmol, 3.54 ml) y la mezcla de reacción se calentó con agitación a 100 °C durante 18 horas. Después, la mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con salmuera (250 ml) y se extrajo con cloruro de metileno (200 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera una vez, se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío hasta un aceite pardo oscuro. La mezcla de producto crudo se purificó *via* cromatografía instantánea (gel de sílice, gradiente de elución: acetato de etilo a 9/1 acetato de etilo/metanol) para producir 8.099 g (70 %) de compuesto monodisperso 1 en forma de un aceite amarillo.

65 6-Metilsulfoniloxihexanoato de etilo (2). Una solución de 6-hidroxihexanoato de etilo monodisperso (50.76 ml, 50.41 g,

227 mmol) en diclorometano seco (75 ml) se enfrió en un baño de hielo y se colocó en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió trietilamina (34.43 ml, 24.99 g, 247 mmol). Una solución de cloruro de metanosulfonilo (19.15 ml, 28.3 g, 247 mmol) en diclorometano seco (75 ml) se añadió gota a gota desde un embudo de adición. La mezcla se agitó durante tres horas y media, se dejó que llegara lentamente a la temperatura ambiente mientras el baño de hielo se derretía. La mezcla se filtró a través de gel de sílice, y el filtrado se lavó sucesivamente con agua, NaHCO₃ saturado, agua y salmuera. Los orgánicos se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío hasta un aceite amarillo pálido. La purificación final del producto crudo se logró por cromatografía instantánea (gel de sílice, 1/1 hexanos/acetato de etilo) para proporcionar el compuesto monodisperso 2 (46.13 g, 85 %) en forma de un aceite transparente, incoloro. FAB MS: *m/e* 239 (M+H), 193 (M-C₂H₅O).

Éster etílico del ácido 6-{2-[2-(2-[2-(2-benciloxietoxi)etoxi]etoxi)-etoxi]-etoxi}-hexanoico (3). Se suspendió hidruro sódico (3.225 g o una dispersión al 60 % en aceite, 80.6 mmol) en 80 ml de tolueno anhidro, se colocó en una atmósfera de nitrógeno y se enfrió en un baño de hielo. Una solución del alcohol monodisperso 9 (27.3 g, 73.3 mmol) en 80 ml de tolueno seco se añadió a la suspensión de NaH. La mezcla se agitó a 0 °C durante treinta minutos, se dejó que llegara a temperatura ambiente y se agitó durante otras cinco horas, tiempo durante el cual la mezcla se convirtió en una solución parda transparente. El mesilato monodisperso 10 (19.21 g, 80.6 mmol) en 80 ml de tolueno seco se añadió a la mezcla de NaH/alcohol, y las soluciones combinadas se agitaron a temperatura ambiente durante tres días. La mezcla de reacción se detuvo con 50 ml de metanol y se filtró a través de alúmina básica. El filtrado se concentró al vacío y se purificó por cromatografía instantánea (gel de sílice, gradiente de elución: 3/1 acetato de etilo/hexanos a acetato de etilo) para producir el compuesto monodisperso 3 en forma de un aceite amarillo pálido (16.52 g, 44 %). FAB MS: *m/e* 515 (M+H).

Ester etílico del ácido 6-{2-[2-(2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etoxi)-etoxi]-etoxi}-hexanoico (4). Se disolvió éter bencilico sustancialmente monodisperso 3 (1.03 g, 2.0 mmol) en 25 ml de etanol. A esta solución se añadió 270 mg 10 % Pd/C, y la mezcla se colocó en una atmósfera de nitrógeno y se agitó durante cuatro horas, tiempo en el cual la TLC mostró la desaparición completa del material de partida. La mezcla de reacción se filtró a través de Celita 545 para eliminar el catalizador, y el filtrado se concentró al vacío para producir el compuesto monodisperso 4 en forma de un aceite transparente (0.67 g, 79 %). FAB MS: *m/e* 425 (M+H), 447 (M+Na).

Éster etílico del ácido 6-{2-[2-(2-[2-(2-metilsulfoniletoxi)etoxi]etoxi)-etoxi]-etoxi}-hexanoico (5). El alcohol monodisperso 4 (0.835 g, 1.97 mmol) se disolvió en 3.5 ml de diclorometano seco y se colocó en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió trietilamina (0.301 ml, 0.219 g, 2.16 mmol) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo. Después de dos minutos, se añadió el cloruro de metanosulfonilo (0.16 ml, 0.248 g, 2.16 mmol). La mezcla se agitó durante 15 minutos a 0 °C y después a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de gel de sílice para eliminar el cloruro de trietilamonio, y el filtrado se lavó sucesivamente con agua, NaHCO₃ saturado, agua y salmuera. Los orgánicos se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron *al vacío*. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 9/1 acetato de etilo/metanol) para proporcionar compuesto monodisperso 5 en forma de un aceite transparente (0.819 g, 83 %). FAB MS: *m/e* 503 (M+H).

Éster etílico del ácido 6-(2-{2-[2-(2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-hexanoico (6). Se suspendió NaH (88 mg de una dispersión al 60 % en aceite, 2.2 mmol) en tolueno anhidro (3 ml) en N₂ y se enfrió a 0 °C. Se añadió dietilenglicol monometil éter monodisperso (0.26 ml, 0.26 g, 2.2 mmol) que se había secado por medio de destilación azeotrópica con tolueno. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante cuatro horas, tiempo durante el cual la suspensión gris turbia se volvió transparente y amarilla y después se volvió parda. Se añadió mesilato 5 (0.50 g, 1.0 mmol) en 2.5 ml de tolueno seco. Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la reacción se detuvo por la adición de 2 ml de metanol y la solución resultante se filtró a través de gel de sílice. El filtrado se concentró al vacío y el FAB MS: *m/e* 499 (M+H), 521 (M+Na). La purificación adicional por cromatografía preparatoria (gel de sílice, 19/3 cloroformo/metanol) proporcionó el compuesto monodisperso 6 en forma de un aceite amarillo transparente (0.302 g 57 %). FAB MS: *m/e* 527 (M+H), 549 (M+Na).

Ácido 6-(2-{2-[2-(2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-hexanoico (7). El éster monodisperso 6 (0.25 g, 0.46 mmol) se agitó durante 18 horas en 0.71 ml de NaOH 1 N. Después de 18 horas, la mezcla se concentró *al vacío* para eliminar el alcohol y el residuo se disolvió en 10 ml adicionales de agua. La solución acuosa se acidificó a pH 2 con HCl 2 N y el producto se extrajo en diclorometano (30 ml x 2). Después, los orgánicos combinados se lavaron con salmuera (25 ml x 2), se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío para producir el compuesto monodisperso 15 en forma de un aceite amarillo (0.147 g, 62 %). FAB MS: *m/e* 499 (M+H), 521 (M+Na).

2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster del ácido 6-(2-{2-[2-(2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-hexanoico (8). El ácido monodisperso 7 (0.209 g, 0.42 mmol) se disolvió en 4 ml de diclorometano seco y se añadió a un matraz seco que ya contiene NHS (N-hidroxisuccinimida) (57.8 mg, 0.502 mmol) y EDC (hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) (98.0 mg, 0.502 mmol) en una atmósfera de N₂. La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se filtró a través de gel de sílice para eliminar el exceso de reactivos y la urea formada a partir del EDC. El filtrado se *concentró al vacío* para proporcionar el oligómero monodisperso activado 8 en forma de un aceite amarillo oscuro (0.235 g, 94 %). FAB MS: *m/e* 596 (M+H), 618 (M+Na).

Ejemplo 2

Síntesis de MPEG₇-C₈ (14) activado

- 5 Mesilato de trietilenglicol monometil éter (9). A una solución de CH₂Cl₂ (100 ml) enfriada a 0 °C en un baño de hielo se añadió trietilenglicol monometil éter monodisperso (25 g, 0.15 mol). Después, se añadió trietilamina (29.5 ml, 0.22 mol) y la solución se agitó durante 15 min a 0 °C, a lo que siguió la adición gota a gota de cloruro de metanosulfonilo (13.8 ml, 0.18 mol, disuelto en 20 ml de CH₂Cl₂). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min a 0 °C, se dejó calentar a temperatura ambiente, y después se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción cruda se filtró a través de Celita (lavada con CH₂Cl₂ ~200 ml), después se lavó con H₂O (300 ml), 5 % NaHCO₃ (300 ml), H₂O (300 ml), NaCl sat. (300 ml), se secó con MgSO₄, y se evaporó hasta secarse. Después, el aceite se colocó en una línea de vacío durante ~2 h para garantizar la sequedad y brindar el compuesto monodisperso 9 en forma de un aceite amarillo (29.15 g, 80 % de rendimiento).
- 10
- 15 Heptaetilenglicol monometil éter (10). A una solución de tetraetilenglicol monodisperso (51.5 g, 0.27 mol) en THF (1 L) se añadió t-butoxido de potasio (14.8 g, 0.13 mol, en pequeñas porciones durante ~30 min). Después, la mezcla de reacción se agitó durante 1 h y después 9 (29.15 g, 0.12 mol) disuelto en THF (90 ml) se añadió gota a gota y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción cruda se filtró a través de Celita (lavada con CH₂Cl₂, ~200 ml) y se evaporó hasta secarse. Después, el aceite se disolvió en HCl (250 ml, 1 N) y se lavó con acetato de etilo (250 ml) para eliminar el exceso de 9. Pueden requerirse lavados adicionales de acetato de etilo (125 ml) para eliminar 9 restante. La fase acuosa se lavó repetidamente con CH₂Cl₂ (volúmenes de 125 ml) hasta que la mayor parte del compuesto 18 se eliminó de la fase acuosa. La primera extracción contendrá 9, 10, y producto secundario diacoplado y debe volver a extraerse con HCl (125 ml, 1 N). Las capas orgánicas se combinaron y se evaporaron hasta secarse. Después, el aceite resultante se disolvió en CH₂Cl₂ (100 ml) y se lavó repetidamente con H₂O (volúmenes de 50 ml) hasta eliminar 10. Las fracciones acuosas se combinaron, volumen total 500 ml, y se añadió NaCl hasta que la solución se volvió turbia y después se lavó con CH₂Cl₂ (2 x 500 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron con MgSO₄, y se evaporaron hasta secarse para brindar el compuesto monodisperso 10 en forma de un aceite (16.9 g, 41 % de rendimiento). Puede ser conveniente repetir una o más etapas del procedimiento de purificación para garantizar una elevada pureza.
- 20
- 25
- 30 8-Bromooctanoato (11). A una solución de ácido 8-bromooctanoico monodisperso (5.0 g, 22 mmol) en etanol (100 ml) se añadió H₂SO₄ (0.36 ml, 7.5 mmol) y la reacción se calentó a reflujo con agitación durante 3 h. La mezcla de reacción cruda se enfrió a temperatura ambiente y se lavó con H₂O (100 ml), NaHCO₃ sat. (2 x 100 ml), H₂O (100 ml), se secó con MgSO₄, y se evaporó hasta secarse para brindar un aceite transparente 11 (5.5 g, 98 % de rendimiento).
- 35
- Éster de MPEG₇-C₈ (12). A una solución del compuesto monodisperso 10 (3.0 g, 8.8 mmol) en éter (90 ml) se añadió t-butoxido de potasio (1.2 g, 9.6 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h. La adición gota a gota del compuesto monodisperso 11 (2.4 g, 9.6 mmol), disuelto en éter (10 ml), se añadió y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción cruda se filtró a través de Celita (lavada con CH₂Cl₂, ~200 ml) y se evaporó hasta secarse. El aceite resultante se disolvió en acetato de etilo y se lavó con H₂O (2 x 200 ml), se secó con MgSO₄, y se evaporó hasta secarse. Se realizó cromatografía en columna (sílice, acetato de etilo a acetato de etilo/metanol, 10:1) y brindó el compuesto monodisperso 12 en forma de un aceite transparente (0.843 g, 19 % de rendimiento).
- 40
- 45 Ácido de MPEG₇-C₈ (13). Al aceite del compuesto monodisperso 12 (0.70 g, 1.4 mmol) se añadió NaOH 1 N (2.0 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 4 h. La mezcla de reacción cruda se concentró, se acidificó (pH~2), se saturó con NaCl, y se lavó con CH₂Cl₂ (2 x 50 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con NaCl sat., se secaron con MgSO₄, y se evaporaron hasta secarse para brindar el compuesto monodisperso 13 en forma de un aceite transparente (0.35 g, 53 % de rendimiento).
- 50 Activación de ácido de MPEG₇-C₈. El ácido de mPEG₇-C₈ monodisperso 13 (0.31 g, 0.64 mmol) se disolvió en 3 ml de cloruro de metileno anhidro y después se añadió solución de N-hidroxisuccinimida (0.079 g, 0.69 mmol) y EDCI·HCl (135.6 mg, 0.71 mmol) en cloruro de metileno anhidro. La reacción se agitó durante varias horas, después se lavó con HCl 1 N, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El material crudo se purificó por cromatografía en columna, se concentró para brindar MPEG₇-C₈ activado monodisperso 14 en forma de un aceite transparente y se secó por medio de vacío.
- 55

Ejemplo 3

Síntesis de MPEG₇-C₁₀ activado (19)

- 60 10-hidroxidecanoato (15). A una solución de ácido 10-hidroxidecanoico monodisperso (5.0 g, 26.5 mol) en etanol (100 ml) se añadió H₂SO₄ (0.43 ml, 8.8 mmol) y la reacción se calentó a reflujo con agitación durante 3 h. La mezcla de reacción cruda se enfrió a temperatura ambiente y se lavó con H₂O (100 ml), NaHCO₃ sat. (2 x 100 ml), H₂O (100 ml), se secó con MgSO₄, y se evaporó hasta secarse para brindar el compuesto monodisperso 15 en forma de un aceite transparente (6.9 g, 98 % de rendimiento).
- 65

Mesilato de 10-hidroxicanoato (16). A una solución de CH_2Cl_2 (27 ml) se añadió 10-hidroxicanoato monodisperso 15 (5.6 g, 26 mmol) y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Después se añadió trietilamina (5 ml, 37 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 min a 0 °C. Después se añadió cloruro de metanosulfonilo (2.7 ml, 24 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (3 ml) y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min, el baño de hielo se retiró y la reacción se agitó durante 2 h adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción cruda se filtró a través de Celita (lavada con CH_2Cl_2 , 80 ml) y el filtrado se lavó con H_2O (100 ml), 5 % NaHCO_3 (2 x 100 ml), H_2O (100 ml), NaCl sat. (100 ml), se secó con MgSO_4 , y se evaporó hasta secarse para brindar el compuesto monodisperso 16 en forma de un aceite amarillento (7.42 g, 97 % de rendimiento).

Éster de MPEG₇-C₁₀ (17). A una solución de heptaetilenglicol monometil éter sustancialmente monodisperso 10 (2.5 g, 7.3 mmol) en tetrahidrofurano (100 ml) se añadió hidruro sódico (0.194 g, 8.1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h. Después, la adición gota a gota de mesilato de 10-hidroxicanoato monodisperso 16 (2.4 g, 8.1 mmol), disuelto en tetrahidrofurano (10 ml), se añadió y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción cruda se filtró a través de Celita (lavada con CH_2Cl_2 , ~200 ml) y se evaporó hasta secarse. El aceite resultante se disolvió en acetato de etilo y se lavó con H_2O (2 x 200 ml), se secó con MgSO_4 , se evaporó hasta secarse, se sometió a cromatografía (sílice, acetato de etilo/metanol, 10:1), y se sometió a cromatografía (sílice, acetato de etilo) para brindar el compuesto monodisperso 17 en forma de un aceite transparente (0.570 g, 15 % de rendimiento).

Ácido de MPEG₇-C₁₀ (18). Al aceite de éster de mPEG₇-C₁₀ monodisperso 17 (0.570 g, 1.1 mmol) se añadió NaOH 1 N (1.6 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción cruda se concentró, se 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 sat. (2 x 50 ml), se secaron con MgSO_4 , y se evaporaron hasta secarse para brindar el compuesto monodisperso 18 como un aceite transparente (0.340 g, 62 % de rendimiento).

Activación de ácido de MPEG₇-C₁₀. El ácido monodisperso 18 se activó con el uso de procedimientos como se describe en la presente descripción para proporcionar oligómero MPEG₇-C₁₀ activado 19.

Ejemplo 4

Síntesis de oligómero C₁₈(PEG₆) activado (22)

Síntesis de oligómero C₁₈(PEG₆) (20). El cloruro de estearoilo monodisperso (0.7 g, 2.31 mmol) se añadió lentamente a una mezcla de PEG₆ monodisperso (5 g, 17.7 mmol) y piridina (0.97 g, 12.4 mmol) en benceno. La mezcla de reacción se agitó durante varias horas (~5). A la reacción le siguió TLC con el uso de acetato de etilo/metanol como solvente revelador. Después la mezcla de reacción se lavó con agua, se secó con MgSO_4 , se concentró y se secó por medio de vacío. El compuesto monodisperso 20 purificado se analizó por FABMS: m/e 549/ M⁺H.

Activación de oligómero C₁₈(PEG₆). La activación de oligómero C₁₈(PEG₆) monodisperso se realizó en dos etapas:
1) Estearoil-PEG₆ monodisperso 20 (0.8 g, 1.46 mmol) se disolvió en tolueno y se añadió a una solución de fosgeno (10 ml, 20 % en tolueno) que se enfrió con un baño de hielo. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 0 °C y después durante 3 h a temperatura ambiente. Después, el fosgeno y el tolueno se destilaron y el cloroformiato de estearoil-PEG₆ sustancialmente monodisperso 21 se secó con P_2O_5 durante la noche.

2) A una solución de cloroformiato de estearoil-PEG₆ monodisperso 21 (0.78 g, 1.27 mmol) y TEA (128 mg, 1.27 mmol) en cloruro de metileno anhidro, se añadió solución de N-hidroxisuccinimida (NHS) en cloruro de metileno. La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas, después se lavó con agua, se secó con MgSO_4 , se filtró, se concentró y se secó *via* vacío para proporcionar el oligómero C₁₈(PEG₆) activado monodisperso 22.

Ejemplo 5

Síntesis del oligómero C₁₈(PEG₈) activado (28)

Tetraetilenglicol monobencil éter (23). Al aceite de tetraetilenglicol monodisperso (19.4 g, 0.10 mol) se añadió una solución de NaOH (4.0 g en 4.0 ml) y la reacción se agitó durante 15 min. Después se añadió cloruro de bencilo (3.54 ml, 30.8 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 100 °C y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con NaCl (250 ml) sat., y se lavó con CH_2Cl_2 (2 x 200 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con NaCl sat., se secaron con MgSO_4 , y se sometieron a cromatografía (sílice, acetato de etilo) para brindar el compuesto monodisperso 23 en forma de un aceite amarillo (6.21 g, 71 % de rendimiento).

Mesilato de tetraetilenglicol monobencil éter (24). A una solución de CH_2Cl_2 (20 ml) se añadió tetraetilenglicol monobencil éter monodisperso 23 (6.21 g, 22 mmol) y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Después se añadió trietilamina (3.2 ml, 24 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 min a 0 °C. Después se añadió cloruro de metanosulfonilo (1.7 ml, 24 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min, el baño de hielo se retiró y la reacción se agitó durante 2 h adicionales a temperatura ambiente. La mezcla de reacción

cruda se filtró a través de Celita (lavada con CH_2Cl_2 , 80 ml) y el filtrado se lavó con H_2O (100 ml), 5 % NaHCO_3 (2 x 100 ml), H_2O (100 ml), NaCl sat. (100 ml), y se secó con MgSO_4 . El aceite amarillo resultante se sometió a cromatografía en un lecho de sílice que contiene carbón activado (10 g) para brindar el compuesto monodisperso 24 en forma de un aceite transparente (7.10 g, 89 % de rendimiento).

5

Octaetilenglicol monobencil éter (25). A una solución de tetrahidrofurano (140 ml) que contiene hidruro sódico (0.43 g, 18 mmol) se añadió gota a gota una solución de tetraetilenglicol monodisperso (3.5 g, 18 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h. Después se añadió mesilato de tetraetilenglicol monobencil éter monodisperso 24 (6.0 g, 16.5 mmol) disuelto en tetrahidrofurano (10 ml) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción cruda se filtró a través de Celita (lavada, CH_2Cl_2 , 250 ml) y el filtrado se lavó con H_2O , se secó con MgSO_4 , y se evaporó hasta secarse. El aceite resultante se sometió a cromatografía (sílice, acetato de etilo/metanol, 10:1) y se sometió a cromatografía (sílice, cloroformo/metanol, 25:1) para brindar el compuesto monodisperso 25 en forma de un aceite transparente (2.62 g, 34 % de rendimiento).

10

Síntesis de estearato PEG_8 -bencilo (26). A una solución fría agitada de octaetilenglicol monobencil éter monodisperso 25 (0.998 g, 2.07 mmol) y piridina (163.9 mg, 2.07 mmol) se añadió cloruro de estearoilo monodisperso (627.7 mg, 2.07 mmol) en benceno. La mezcla de reacción se agitó durante la noche (18 horas). Al día siguiente la mezcla de reacción se lavó con agua, se secó con MgSO_4 , se concentró y se secó por medio de vacío. Después, el producto crudo se sometió a cromatografía en columna instantánea de gel de sílice, con el uso de 10 % de metanol/90 % de cloroformo. Las fracciones que contienen el producto se combinaron, se concentraron y se secaron por medio de vacío para brindar el compuesto monodisperso 26.

15

20

Hidrogenólisis de estearato- PEG_8 -bencilo. A una solución metanólica de estearato- PEG_8 -bencilo monodisperso 26 (0.854 g 1.138 mmol) se añadió Pd/C (10 %) (paladio, 10 % en peso en carbón activado). La mezcla de reacción se agitó durante la noche (18 horas) en hidrógeno. Después, la solución se filtró, se concentró y se purificó por cromatografía instantánea en columna con el uso de 10 % de metanol/90 % de cloroformo, las fracciones con $R_f=0.6$ se recogieron, se concentraron y se secaron para proporcionar el ácido monodisperso 27.

25

Activación de oligómero C_{18} (PEG_8). La activación en dos etapas de oligómero de estearato- PEG_8 monodisperso 27 se realizó como se describió para estearato- PEG_6 en el Ejemplo 4 anterior para proporcionar el oligómero C_{18} (PEG_8) monodisperso activado 28.

30

Ejemplo 6

35 Síntesis de oligómeros de monometil trietilenglicol activados

Una solución de tolueno que contiene 20 % de fosgeno (100 ml, aproximadamente 18.7 g, 189 mmol de fosgeno) se enfrió a 0 °C en una atmósfera de N_2 . El mTEG monodisperso (trietilenglicol, monometil éter, 7.8 g, 47.5 mmol) se disolvió en 25 ml de acetato de etilo anhidro y se añadió a la solución de fosgeno fría. La mezcla se agitó durante una hora a 0 °C, después se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante otras dos horas y media. El fosgeno, acetato de etilo y tolueno restantes se eliminaron por medio de destilación al vacío para dejar el cloroformiato de mTEG monodisperso en forma de un residuo aceitoso transparente.

40

El cloroformiato de nTEG monodisperso se disolvió en 50 ml de diclorometano seco al cual se añadió TEA (trietilamina, 6.62 ml, 47.5 mmol) y NHS (N-hidroxisuccinimida, 5.8 g, 50.4 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera seca durante veinte horas, tiempo durante el cual apareció una gran cantidad de precipitado blanco. La mezcla se filtró para eliminar este precipitado y se *concentró al vacío*. El aceite resultante se incorporó a diclorometano y se lavó dos veces con agua desionizada fría, dos veces con HCl 1 N y una vez con salmuera. Los orgánicos se secaron con MgSO_4 , se filtraron y se concentraron para proporcionar el compuesto del título monodisperso en forma de un aceite amarillo claro, transparente. De ser necesario, el éster de NHS puede purificarse adicionalmente por cromatografía instantánea en gel de sílice con el uso de EtOAc como el eluyente.

50

Ejemplo 7

55 Síntesis de oligómeros de palmitato-TEG activados

Se disolvió anhídrido palmítico monodisperso (5 g; 10 mmol) en THF seco (20 ml) y se agitó a temperatura ambiente. A la solución agitada, se añadió un exceso de 3 mol de piridina seguido de trietilenglicol monodisperso (1.4 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora (el progreso de la reacción se controló por TLC; acetato de etilo-cloroformo; 3:7). Al finalizar la reacción, el THF se eliminó y el producto se mezcló con 10 % de ácido H_2SO_4 y se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml). El extracto combinado se lavó secuencialmente con agua, salmuera, se secó con MgSO_4 , y se evaporó para proporcionar oligómeros de palmitato-TEG monodispersos.

60

Una solución de carbonato de N,N'-disuccinimidilo (3 mmol) en DMF (~10 ml) se añade a una solución de los oligómeros de palmitato-TEG monodispersos (1 mmol) en 10 ml de DMF anhidro mientras se agita. Hidruro sódico (3 mmol) se

65

añade lentamente a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agita durante varias horas (por ejemplo, 5 horas). Se añade éter dietílico para precipitar el oligómero monodisperso activado del título. Este proceso se repite 3 veces y por último el producto se seca.

5 Ejemplo 8

Síntesis de oligómeros de monometil hexaetilenglicol activados

10 El hexaetilenglicol monometil éter activado monodisperso se preparó de manera análoga al trietilenglicol monodisperso como se describió en la presente descripción. Una solución de fosgeno al 20 % en tolueno (35 ml, 6.66 g, 67.4 mmol de fosgeno) se enfrió en una atmósfera de N₂ en un baño de hielo/agua salada. Se disolvió hexaetilenglicol monodisperso (1.85 ml, 2.0 g, 6.74 mmol) en 5 ml de EtOAc anhidro y se añadió a la solución de fosgeno *via* jeringa. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación en el baño de hielo durante una hora, se retiró y se agitó durante 2.5 horas adicionales a temperatura ambiente. El fosgeno, EtOAc, y tolueno se eliminaron por destilación al vacío, lo que dejó al cloroformiato de metil hexaetilenglicol monodisperso en forma de un residuo transparente, aceitoso.

15 El cloroformiato monodisperso se disolvió en 20 ml de diclorometano seco y se colocó en una atmósfera inerte, seca. Se añadió trietilamina (0.94 ml, 0.68 g, 6.7 mmol) y después NHS (N-hidroxisuccinimida, 0.82 g, 7.1 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se filtró a través de gel de sílice para eliminar el precipitado blanco y se concentró *al vacío*. El residuo se incorporó en diclorometano y se lavó dos veces con agua fría, dos veces con HCl 1 N y una vez con salmuera. Los orgánicos se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. La purificación final se hizo por medio de cromatografía instantánea (gel de sílice, EtOAc) para obtener el hexaetilen monometil éter monodisperso activado.

25 Ejemplo 9

Síntesis de heptaetilenglicol monometil éter activado

30 8-Metoxi-1-(metilsulfonyl)oxi-3,6-dioxaoctano (29). Una solución de moléculas de trietilenglicol monometil éter monodisperso (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) se enfrió en un baño de hielo y se colocó en una atmósfera de nitrógeno. Una solución de cloruro de metanosulfonyl (2.37 ml, 3.51 g, 30.6 mmol) en diclorometano seco (20 ml) se añadió gota a gota desde un embudo de adición. Diez minutos después de concluir la adición de cloruro, la mezcla de reacción se retiró del baño de hielo y se dejó llegar a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante una hora adicional, tiempo en el cual la TLC (CHCl₃ con 15 % de MeOH como el eluyente) no mostró restos de trietilenglicol monometil éter.

35 La mezcla de reacción se diluyó con otros 75 ml de diclorometano y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ saturado, agua y salmuera. Los orgánicos se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron *al vacío* para proporcionar una mezcla de compuestos monodispersos 29 en forma de un aceite transparente (5.31 g, 86 %).

40 Heptaetilenglicol monometil éter (30). A una solución agitada de tetraetilenglicol monodisperso (35.7 mmol) en DMF seco (25.7 ml), en N₂ se añadió en porción una dispersión de NaH al 60 % en aceite mineral, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A la sal sódica resultante del tetraetilenglicol se añadió una solución de mesilato monodisperso 29 (23.36) en DMF seco (4 ml) en una sola porción, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 45 3.5 horas. El progreso de la reacción se controló por TLC (12 % de CH₃OH-CHCl₃). La mezcla de reacción se diluyó con una cantidad igual de HCl 1 N, y se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 ml) y se desechó. La extracción de solución acuosa y el tratamiento proporcionaron heptaetilenglicol monometil éter monodisperso 30 (82 -84 % de rendimiento). Aceite; Rf 0.46 (metanol: cloroformo = 3:22); MS m/z calculada para C₁₅H₃₂O₈ 340.21 (M⁺+1), encontrada 341.2.

50 Activación de heptaetilenglicol monometil éter. El heptaetilenglicol monometil éter monodisperso 30 se activa por un procedimiento como se describe en la presente descripción para activar trietilenglicol monometil éter para proporcionar el heptaetilenglicol monometil éter activado.

55 Ejemplo 10

Síntesis de decaetilenglicol monometil éter activado (33)

60 20-metoxi-1-(metilsulfonyl)oxi-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosano (31). El compuesto monodisperso 31 se obtuvo en rendimiento cuantitativo a partir del compuesto 30 y cloruro de metanosulfonyl como se describió para 29 en la presente descripción, en forma de un aceite; Rf 0.4 (acetato de etilo : acetonitrilo = 1:5); MS m/z calculada para C₁₇H₃₇O₁₀ 433.21 (M⁺+1), encontrada 433.469.

65 Decaetilenglicol monometil éter (32). El compuesto monodisperso 32 se preparó a partir del compuesto 31 y trietilenglicol monodisperso con el uso del procedimiento descrito en la presente descripción. Aceite; Rf 0.41 (metanol: cloroformo = 6:10); MS m/z calculada para C₂₁H₄₄O₁₁ 472.29 (M⁺+1), encontrada 472.29.

Activación de decaetilenglicol monometil éter. El decaetilenglicol monometil éter monodisperso 32 se activa por un procedimiento como se describió en la presente descripción para activar trietilenglicol monometil éter para proporcionar el decaetilenglicol monometil éter activado 33.

5

Ejemplo 11

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

10 Conjugación de proinsulina I recombinante. La proinsulina I recombinante (PM 10,642 Dalton) se obtuvo de Biobras, de Belo Horizonte, Brasil. Una porción de 2.32×10^{-3} mmol de proinsulina I se disolvió en 10 ml de DMSO. A la solución se añadió 324 μ l de trietilamina. La solución resultante se dejó en agitación durante 5 minutos, y después se añadió una solución de metilheptaetilenglicol activado ((PEG7)-hexiloligómero) (9.30×10^{-3} mmol) en acetonitrilo. El curso de la reacción de conjugación (acilación) se controló por HPLC. Cuando la reacción pareció concluir, se detuvo por adición de 15 3.54 ml de solución acuosa de ácido trifluoroacético al 5 %. Después, la mezcla de reacción se procesó y se cambió a amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. El perfil de HPLC de la mezcla de productos, proinsulina I recombinante conjugada con oligómero, se muestra en la Figura 11.

20 (b) Escisión con cóctel de enzimas de proinsulina I recombinante conjugada con oligómero. Una alícuota de la solución en Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 1(a) se analizó por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, la mezcla de productos del Ejemplo 11 (a) ($0.424 \mu\text{mol/ml}$) se dejó reaccionar con tripsina ($5.97 \times 10^{-4} \mu\text{mol/ml}$) y carboxipeptidasa B ($1.93 \times 10^{-4} \mu\text{mol/ml}$). Después de 30 minutos, la reacción se detuvo por la adición de 25 1.58 ml de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Los productos principales se identificaron por el tiempo de retención en HPLC (con relación a los tiempos de retención de estándares de referencia conocidos) y análisis espectral de masa. Así, se obtuvo insulina (10 %) e insulina conjugada en Lis^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 (84 %) (Figuras 11 - 13).

30 Ejemplo 12

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

35 Se usó HPLC de fase reversa para aislar los productos principales de la mezcla de productos obtenidos a partir de la reacción de conjugación descrita en el Ejemplo 11 (a). Una columna de HPLC (1.0 cm. d.i. x 25 cm de longitud) se empaquetó con una fase estacionaria de C18 disponible comercialmente de utilidad conocida para la separación de péptidos y proteínas, y después se incorporó a un sistema de HPLC. El sistema se equilibró con amortiguador de elución, una mezcla que comprende 72 % de fase móvil A (H₂O con ácido trifluoroacético al 0.1 %) y 28 % de fase móvil B (acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0.1 %) que se suministró a un régimen de flujo de 5 ml/min. Una solución de 40 la mezcla de productos en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6, se aplicó a la columna de fase reversa, y los productos se separaron y se eluyeron con el uso de un gradiente en el cual el componente acetonitrilo del amortiguador de elución (fase móvil B) se aumentó de la siguiente manera:

28 %-30 % de fase móvil B durante 60 minutos, después

30 %-32 % de fase móvil B durante 30 minutos, después

45 32 %-36 % de fase móvil B durante 40 minutos.

Las fracciones se recogieron y se analizaron individualmente por HPLC para determinar la identidad y pureza del producto contenido en estas. Después, las fracciones comunes que contienen uno de los cuatro productos (monoconjugado-A ("monoconjugado de proinsulina I A"), monoconjugado-B ("monoconjugado de proinsulina I B"), 50 diconjugado ("diconjugado de proinsulina I") y triconjugado ("triconjugado de proinsulina I") se agruparon, y el solvente se eliminó por evaporación rotatoria. Los análisis por HPLC (Figura 14) y espectro de masa se usaron para determinar la identidad y pureza de cada aislado.

55 Ejemplo 13

Escisión con cóctel de enzimas de conjugados de proinsulina (I) recombinante aislados

60 Cada conjugado (Proinsulina I Mono A, Mono B, Di, o Tri) que se aisló con el uso del procedimiento descrito en el Ejemplo 12 se disolvió en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6, y se usó HPLC analítica para determinar la concentración de polipéptidos de la solución resultante. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, la mezcla cruda (1 mmol) se dejó reaccionar con tripsina (1.39×10^{-3} mmol) y carboxipeptidasa B (4.56×10^{-4} mmol). Después de 30 minutos, la reacción se detuvo por adición de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. La mezcla de productos de cada reacción se procesó y

analizó por HPLC. El tiempo de retención en HPLC con relación al de los estándares de referencia y el análisis espectral de masa se usaron para determinar la identidad y pureza de cada producto (Tabla 1).

Tabla 1

Conjugados de proinsulina I y oligómero y productos (o productos esperados) de la escisión con cóctel de enzimas de cada uno		
Conjugado	Producto (productos esperados)	Figura
Proinsulina I Mono A (proinsulina I conjugada en Lis 64)	Insulina, (péptido C conjugado en Lis64 con oligómero de hexil-PEG7), (diarginal insulina), (monoarginal insulina), (péptido C Arg65Lis ⁶⁴ conjugado con oligómero de hexil-PEG7) y péptido líder	16
Proinsulina I Mono B (proinsulina I conjugada en B29)	(insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7), (proinsulina I o proinsulina Des Arg 31, 32 conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7), proinsulina I o proinsulina Des 65, 64 conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7), péptido líder)	-
Proinsulina I Di (proinsulina I conjugada en B29 y Lis 64)	insulina conjugada en LisB29 con oligómero de hexil-PEG7 (péptido C conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7), (proinsulina I o proinsulina Des 65 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} con di(oligómero de hexil-PEG7), proinsulina I o proinsulina Des Arg 31, 32 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} con di(oligómero de hexil-PEG7)), (péptido líder), (péptido C Arg31,32 conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7), (péptido C Arg32 conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7)	15
Proinsulina I Tri (proinsulina I conjugada en B29, Lis 64 y N-amino terminal de péptido líder)	(insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7) (péptido C conjugado en Lis con oligómero de hexil-PEG7) (Arg ³¹ -Arg ³² -insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7, proinsulina I o proinsulina Des 65 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} con di(oligómero de hexil-PEG7), proinsulina I o proinsulina Des Arg 31, 32 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} con di(oligómero de hexil-PEG7), , péptido líder-Arg con oligómero de hexil-PEG7 y péptido líder con oligómero de hexil-PEG7	-

Ejemplo 14

Escisión con tripsina de conjugados de proinsulina I aislados

Cada conjugado (Proinsulina I Mono A, Mono B, Di, o Tri) que se aisló con el uso del procedimiento descrito en el Ejemplo 12 se disuelve en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6, y la solución resultante se analiza por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, cada conjugado (300 mmol) se deja reaccionar con tripsina (1 mmol). Después de 20 minutos, la reacción se detiene por adición de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Los productos de la reacción se aíslan y analizan por tiempo de retención en HPLC y análisis espectral de masa para determinar la identidad. Los productos esperados son insulina(Arg₃₁) o insulina (Arg₃₁) conjugada en Lis_{B29} con oligómero de hexil-PEG7 que se ilustran en la Tabla 2.

Tabla 2

	Conjugado	Productos esperados
5	Proinsulina I Mono A (proinsulina I conjugada en Lis 64)	Insulina-Arg ⁿ , insulina-Arg ³¹ -Arg ³² , Des 65, 64 proinsulina I o proinsulina, Des Arg 31,32 proinsulina I o proinsulina, péptido C conjugado en Lis64 con oligómero de hexil-PEG7 y Arg65-Lis64-péptido C
10	Proinsulina I Mono B (proinsulina I conjugada en B29)	insulina (Arg ₃₁) conjugada en Lis _{B29} con oligómero de hexil-PEG7, insulina-Arg ³¹ -Arg ³² , proinsulina I o proinsulina Des 65, 64 conjugada en Lis 29 con oligómero de hexil-PEG7, proinsulina I o proinsulina Des Arg 31, 32 conjugada en Lis con oligómero de hexil-PEG7, y péptido C
15	Proinsulina I Di (proinsulina I conjugada en B29 y Lis 64)	insulina (Arg31) conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7, péptido C Arg65-Lis64 conjugado con oligómero de hexil-PEG7, insulina-Arg ³¹ - Arg ³² conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7, proinsulina I o proinsulina Des 65 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} con di(oligómero de hexil-PEG7, proinsulina I o proinsulina Des Arg 31, 32 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} con di(oligómero de hexil-PEG7) y péptido C conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7
20	Proinsulina I Tri (proinsulina I conjugada en B29, Lis 64 y N-amino terminal de péptido líder)	insulina (Arg31) conjugada en Lis _{B29} con oligómero de hexil-PEG7, péptido C Arg65-Lis64 conjugado con oligómero de hexil-PEG7, insulina-Arg ³¹ - Arg ³² conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7, proinsulina I o proinsulina Des 65 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} con di(oligómero de hexil-PEG7, proinsulina I o proinsulina Des Arg 31, 32 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} con di(oligómero de hexil-PEG7), péptido C conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7 y péptido líder-Arg con oligómero de hexil-PEG7
25		

Ejemplo 15

30 Escisión con carboxipeptidasa B de la mezcla de productos de la escisión con tripsina

Se retira una alícuota de la mezcla de reacción que contiene insulina (Arg³¹) conjugada en Lis^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 (300 mmol) (del Ejemplo 14) en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Se añade carboxipeptidasa B (1 mmol) a la mezcla de reacción. La reacción se deja continuar durante 15 horas, y después se detiene con adición de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Los productos esperados de cada reacción se ilustran en la Tabla 3.

Tabla 3

	Conjugado	Productos esperados
40	Proinsulina I Mono A	Insulina y péptido C conjugado en Lis con oligómero de hexil-PEG7
45	Proinsulina I Mono B	Insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 y péptido C
	Proinsulina I Di	Insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 y
		péptido C conjugado en Lis con oligómero de hexil-PEG7
50	Proinsulina I Tri	Insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 y
		péptido C conjugado en Lis con oligómero de hexil-PEG7 y
		péptido líder conjugado en Lis con oligómero de hexil-PEG7

Ejemplo 16

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

60 (a) Conjugación de proinsulina II recombinante. La proinsulina II recombinante (PM 11,133 Dalton) se obtuvo de Itoham Foods, Inc. de Ibaraki Pref, Japón. La proinsulina II recombinante tenía un péptido líder y un péptido C, ambos carentes de residuos de lisina. Una porción de 2.55×10^{-3} mmol de proinsulina II recombinante se disolvió en 10 ml de DMSO. A la solución se añadió 355 μ l de trietilamina. La solución resultante se dejó en agitación durante 5 minutos, y después se añadió una solución de metilpolietilenglicol activado ((PEGn)-hexiloligómero) ($n = 7 \pm 3$ o $n = 7$) (5.10×10^{-3} mmol) en acetonitrilo. El progreso de la reacción se controló por HPLC. Después que la reacción pareció concluir, se detuvo por

adición de 3.7 ml de solución acuosa de ácido trifluoroacético al 5 %. Después, la mezcla de reacción se procesó y se cambió a amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. El perfil de HPLC de la mezcla de productos de proinsulina II recombinante conjugada con oligómero se muestra en la Figura 2.

5 (b) Escisión con cóctel de enzimas de proinsulina II recombinante conjugada con oligómero. La solución en Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 16(a) se analizó por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos en esta. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. La mezcla de productos (0.399 $\mu\text{mol/ml}$) se dejó reaccionar con tripsina (5.57×10^{-4} $\mu\text{mol/ml}$) y carboxipeptidasa B (1.82 $\times 10^{-4}$ $\mu\text{mol/ml}$). Después de 30 minutos, la reacción se detuvo por adición de 550 μl de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Los productos principales se identificaron por el tiempo de retención en HPLC (con relación al de los estándares de referencia conocidos) y análisis espectral de masa. Así, se obtuvo insulina (23 %) e insulina conjugada en Lis^{B29} con oligómero de hexil-PEGn (60 %) y otros (17 %) (Figuras 9 - 10).

15 Ejemplo 17

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

20 Cada producto principal de la reacción de conjugación descrita en el Ejemplo 16(a) se aisló con el uso de HPLC de fase reversa. Una columna (1.0 cm. d.i. x 25 cm. de longitud) se empaquetó con una fase estacionaria de C18 disponible comercialmente de utilidad conocida para la resolución de polipéptidos y proteínas, y después se incorporó a un sistema de HPLC. El sistema se equilibró con amortiguador de elución que era una mezcla de 75 % de fase móvil A (H₂O con ácido trifluoroacético al 0.1 %) y 25 % de fase móvil B (acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0.1 %) que se suministró a un régimen de flujo de 5 ml/min. La solución en Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 16(a) se aplicó a la columna, y los productos principales se separaron y se eluyeron con el uso de un gradiente de elución en el que la composición del amortiguador de elución cambió de 25 % de fase móvil B a 35 % de fase móvil B durante 120 minutos. Cada una de las fracciones que se recogieron se analizó por HPLC para determinar la identidad y pureza del producto contenido en estas. Después, las fracciones comunes de cada producto (monoconjugado de proinsulina II ("Proinsulina II Mono") y diconjugado ("Proinsulina II Di") se agruparon, y el solvente se eliminó por evaporación rotatoria. La identidad y pureza de cada producto se determinó por HPLC y análisis de espectrometría de masa (Figuras 2 - 4).

Ejemplo 18

Escisión con cóctel de enzimas de conjugados de proinsulina II recombinante aislados

35 Cada conjugado de proinsulina II (proinsulina II Mono, Di o Tri) que se aisló con el uso del procedimiento descrito en el Ejemplo 17 se disolvió en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6, y una alícuota de la solución se analizó por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos en esta. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. El conjugado (0.127 $\mu\text{mol/ml}$) se dejó reaccionar con tripsina (1.77×10^{-4} $\mu\text{mol/ml}$) y carboxipeptidasa B (5.77×10^{-5} $\mu\text{mol/ml}$). Después de 30 minutos, la reacción se detuvo por adición de 250 μl de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. El aislamiento de los productos principales seguido de la identificación por el tiempo de retención en HPLC contra estándares de referencia y análisis espectral de masa mostró que en la reacción se produjo insulina o insulina acilada en B-29 con hexil-PEG7. Los productos y rendimientos de cada reacción se ilustran en la Tabla 4.

Tabla 4

Conjugado	Productos esperados	Rendimiento
Proinsulina II Mono	Insulina	15 %
	Insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEGn	85 %
Proinsulina II Di	Insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEGn	92 %

60 Ejemplo 19

Escisión con tripsina de conjugados de proinsulina II aislados

65 Cada conjugado (proinsulina II Mono, Di o Tri) del Ejemplo 17 se disolvió en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6, y la solución resultante se analizó por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos en esta. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, cada

conjugado (0.127 $\mu\text{mol/ml}$) se dejó reaccionar con tripsina (4.23×10^{-4} $\mu\text{mol/ml}$). Después de 20 minutos, la reacción se detuvo por adición de 250 μl de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. El aislamiento de los productos principales seguido de la identificación por el tiempo de retención en HPLC y análisis espectral de masa mostró que en la reacción se produjo insulina (Arg^{31}) o insulina (Arg^{31} conjugada en $\text{Lis}^{\text{B}29}$ con oligómero de hexil-PEGn). Los productos y rendimientos de cada reacción se ilustran en la Tabla 5.

Tabla 5

Conjugado	Productos y (productos esperados)	Rendimiento
Proinsulina Mono II	Insulina -Arg31, (péptido C-Arg), (péptido líder-Arg)	-
	Insulina-Arg31 conjugada en $\text{Lis}^{\text{B}29}$ con oligómero de hexil-PEGn	-
Proinsulina II Di	Insulina-Arg31 conjugada en $\text{Lis}^{\text{B}29}$ con oligómero de hexil-PEGn, (péptido C-Arg), (péptido líder-Arg conjugado con oligómero de hexil-PEGn)	-

Ejemplo 20

Escisión con carboxipeptidasa B de la mezcla de escisión con tripsina

Se retiró una alícuota de la mezcla de reacción con insulina (Arg^{31}) conjugada en $\text{Lis}^{\text{B}29}$ con oligómero de hexil-PEG7 (3.10×10^{-5} mmol) del Ejemplo 19. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7.6. Se añadió carboxipeptidasa B (1.03×10^{-7}) a la mezcla de reacción. La reacción se dejó continuar durante 15 horas, y después se detuvo con adición de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Después del procesamiento, los productos de la reacción se analizaron por HPLC. El tiempo de retención y el análisis espectral de masa se usaron para determinar la identidad. Insulina (23 %) e insulina conjugada en $\text{Lis}^{\text{B}29}$ con oligómero de hexil-PEGn (60 %) (Figuras 5, 7 - 8) se produjeron a partir de la reacción de monoconjugado de proinsulina II. Los productos esperados de la reacción de diconjugado de proinsulina II se ilustran en la Tabla 6.

Tabla 6

Conjugado	Productos (productos esperados)	Rendimiento
Proinsulina Mono II	Insulina y	23 %
	Insulina conjugada en $\text{Lis}^{\text{B}29}$ con oligómero de hexil-PEGn	60 %
Proinsulina II Di	(insulina conjugada en $\text{Lis}^{\text{B}29}$ con oligómero de hexil-PEGn)	

Ejemplo 21

Preparación de insulina conjugada en $\text{Lis}^{\text{B}29}$ con oligómero

(a) Conjugación de proinsulina humana natural. Se disuelve proinsulina humana natural (Sigma Chemical Co.) (3.20×10^{-4} mmol) en 5 ml de DMSO. A la solución se añade 45 μl de trietilamina. La solución se deja en agitación durante 5 minutos antes de añadir una solución de PEG7-hexiloligómero activado (6.4×10^{-4} mmol) en acetonitrilo. Después que la reacción ha progresado de manera que el análisis por HPLC indica que la proinsulina se ha consumido (o la concentración de proinsulina ya no disminuye), la reacción se detiene por adición de 0.5 ml de solución acuosa de ácido trifluoroacético al 5 %. Después, la mezcla de reacción se procesa y se cambia a amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6.

(b) Escisión con cóctel de enzimas de proinsulina natural conjugada con oligómero. Una alícuota de la solución en Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 21(a) se analiza por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos en esta. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, la mezcla cruda (1 mol eq.) se deja reaccionar con tripsina (1.39×10^{-3} mol eq.) y carboxipeptidasa B (4.56×10^{-4} mol eq.). Después de 30 minutos, la reacción se detiene por adición de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. La mezcla de productos de la reacción se procesa y analiza por HPLC. El tiempo de retención (respecto al

de los estándares de referencia) y el análisis espectral de masa se usan para determinar la identidad. Los productos esperados de la reacción son insulina e insulina conjugada en Lis^{B29} con oligómero de hexil-PEG7.

Ejemplo 22

5

Aislamiento de los productos de conjugación de proinsulina humana natural

Cada producto principal obtenido de la reacción de conjugación descrita en el Ejemplo 21(a) se aísla con el uso de HPLC de fase reversa. Una columna (1.0 cm. d.i. x 25 cm. de longitud) se empaqueta con una fase estacionaria de C18 disponible comercialmente de utilidad conocida para la resolución de polipéptidos y proteínas, y después se incorpora a un sistema de HPLC. El sistema se equilibra con amortiguador de elución que comprende una mezcla de 75 % de fase móvil A (H₂O con ácido trifluoroacético al 0.1 %) y 25 % de fase móvil B (acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0.1 %). La solución en Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 21(a) se aplica a la columna, y los productos principales se separan y eluyen con el uso de un gradiente de elución en el cual el porcentaje del componente acetonitrilo aumenta de 25 %-35 % durante 120 minutos. Las fracciones se recogen y analizan por HPLC para determinar la identidad y pureza del producto en estas. Las fracciones comunes de cada producto se agrupan, y el solvente se elimina por evaporación rotatoria. La identidad y pureza de cada pico de producto se determinan por HPLC y espectrometría de masa. Los productos esperados consisten en 2 monoconjugados de proinsulina humana (Lis B29 o Lis 64), 1 diconjugado de proinsulina humana (Lis B29, Lis 64) y 1 triconjugado de proinsulina humana (Fen B1, Lis B29, Lis 64). El uso de las condiciones de conjugación modificadas del Ejemplo 21 resulta en tres monoconjugados de proinsulina humana (Fen B1 o Lis B29 o Lis 64).

Ejemplo 23

25 Escisión con cóctel de enzimas de conjugados de proinsulina humana natural aislados

Cada conjugado que se obtiene con el uso del procedimiento descrito en el Ejemplo 22 se disuelve en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6, y la solución resultante se analiza por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos en esta. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, la mezcla cruda (1 mol eq.) se deja reaccionar con tripsina (1.39×10^{-3} mol eq.) y carboxipeptidasa B (4.56×10^{-4} mol eq.). Después de 30 minutos, la reacción se detiene por adición de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Los productos se procesan y analizan por HPLC. El tiempo de retención (en comparación con el de los estándares de referencia) y el análisis espectral de masa se usan para determinar identidad. Los productos esperados de la reacción son insulina o insulina conjugada en LisB29 con oligómero de hexil-PEG7 o insulina conjugada en LisB29 o FenB1 con di[oligómero de hexil-PEG7] o péptido C conjugado en Lis64 con oligómero de hexil-PEG7 o insulina conjugada en FenB1 con oligómero de hexil-PEG7 o péptido C.

Ejemplo 24

40

Escisión con tripsina de conjugados de proinsulina humana natural aislados

Cada conjugado que se obtiene como se describió en el Ejemplo 22 se disuelve en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6, y la solución resultante se analiza por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos en esta. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, el conjugado (300 mol eq.) se deja reaccionar con tripsina (1 mol eq.). Después de 20 minutos, la reacción se detiene por adición de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Los productos se procesan y analizan por HPLC. El tiempo de retención y la espectrometría de masa se usan para determinar la identidad. Los productos esperados de la reacción son insulina (Arg³¹) o desTre-insulina o insulina (Arg₃₁) conjugada en LisB29 con oligómero de hexil-PEG7 o insulina-Arg31 conjugada en LisB29, FenB1 con di[oligómero de hexil-PEG7] o insulina-Arg31 conjugada en FenB1 con oligómero de hexil-PEG7 o péptido C conjugado en Lis64 con oligómero de hexil-PEG7 o péptido C-Arg.

Ejemplo 25

55 Escisión con carboxipeptidasa B de la mezcla de escisión con tripsina

Se retira una alícuota de la mezcla de reacción con tripsina de cada conjugado (300 mmol) del Ejemplo 24. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Se añade carboxipeptidasa B (1 mmol) a la mezcla de reacción. La reacción se deja continuar durante 15 horas, y después se detiene con adición de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Los productos se procesan y analizan por HPLC. El tiempo de retención y el análisis espectral de masa se usan para determinar la identidad. Los productos esperados son insulina o des Tre-insulina o insulina conjugada en LisB29 con oligómero de hexil-PEG7 o insulina conjugada en FenB1 con oligómero de hexil-PEG7 o insulina conjugada en LisB29, FenB1 con di[oligómero de hexil-PEG7] o péptido C conjugado en Lis64 con oligómero de hexil-PEG7 o péptido C.

65

Ejemplo 26

Preparación optimizada de insulina conjugada en Lis^{B29} con oligómero

5 El análisis de los datos experimentales del Ejemplo 11 indicaron que la insulina conjugada en Lis^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 y péptido C conjugado en Lis con oligómero de hexil-PEG7 podían obtenerse con alto rendimiento y pureza al (a) acilar el grupo ϵ -amino de todos los residuos de lisina que están presentes en un material crudo de proinsulina, y (b) escindir la proinsulina resultante, completamente conjugada con oligómero con un cóctel de enzimas compuesto de tripsina y carboxipeptidasa B. La confirmación experimental de esta hipótesis se obtuvo de la siguiente manera.

10 (a) Conjugación de proinsulina I recombinante. La proinsulina I recombinante (PM 10,642 Dalton) se obtiene de Biobras, Belo Horizonte, Brasil. Una porción de 2.32×10^{-3} mmol de proinsulina I se disuelve en 10 ml de DMSO. A la solución se añade 324 μ l de trietilamina. La solución resultante se deja en agitación durante 5 minutos, y después se añade una solución de metilheptaetilenglicol(PEG7)-hexiloligómero activado (4-6 mol eq.; suficientes para convertir toda la proinsulina I en triconjugado) en acetonitrilo. El curso de la reacción de conjugación (acilación) se controla por HPLC. Cuando la reacción parece concluir (es decir, no se observa proinsulina I no conjugada por HPLC), se detiene por adición de 3.54 ml de solución acuosa de ácido trifluoroacético al 5 %. Después, la mezcla de reacción se procesa y se cambia a amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Se espera que el perfil de HPLC de la mezcla de productos, proinsulina I recombinante conjugada con oligómero, sólo muestre picos correspondientes a triconjugado (todas las Lis y extremos N terminales conjugados) y diconjugado.

15 (b) Escisión con cóctel de enzimas de proinsulina I recombinante conjugada con oligómero. Una alícuota de la solución en Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 16(a) se analiza por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, la mezcla de productos del Ejemplo 16(a) ($0.424 \mu\text{mol/ml}$) se deja reaccionar con tripsina ($5.97 \times 10^{-4} \mu\text{mol/ml}$) y carboxipeptidasa B ($1.93 \times 10^{-4} \mu\text{mol/ml}$). Después de 30 minutos, la reacción se detiene por la adición de 1.58 ml de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Los productos principales se identifican por el tiempo de retención en HPLC (con relación a los tiempos de retención de estándares de referencia conocidos) y análisis espectral de masa. Se espera que la insulina conjugada en Lis^{B29} con oligómero de hexil-PEG7, el único conjugado de insulina que está presente, se obtenga con un rendimiento cercano a 95 %. El péptido C conjugado en Lis¹ con oligómero de hexil-PEG7 también se obtiene con un rendimiento casi cuantitativo.

Ejemplo 27

35 Preparación de insulina conjugada en Lis^{B29} con oligómero- escalado a 20 g

40 (a) Conjugación de proinsulina I recombinante. La proinsulina I recombinante (PM 10,642 Dalton) se obtuvo de Biobras, de Belo Horizonte, Brasil. Una porción de 20 g (1.85 mmol) de proinsulina I se disolvió en 540 ml de ácido bórico 50 mM. La solución se llevó a pH 9.3 con solución de hidróxido de sodio 4 N y se añadió a 120 ml de etanol y se ajustó a pH 10.2 con hidróxido de sodio. A la solución agitada anterior se añadió una solución de metilheptaetilenglicol ((PEG7)-hexiloligómero) activado (4x 1.85 mmol) en 14 ml de etanol. El curso de la reacción de conjugación (acilación) se controló por HPLC y el pH se mantuvo a pH 10.2 con el uso de hidróxido de sodio 4 N. Cuando la reacción pareció concluir después de 20 minutos, se detuvo por adición de ácido clorhídrico 4 N a pH 6.8. Después, la mezcla de reacción se procesó y se cambió a amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6 por medio de diafiltración con el uso del sistema Pellicon II de Millipore. El perfil de HPLC de la mezcla de productos mostró >80 % de di y triconjugados de proinsulina I recombinante con oligómero.

45 (b) Escisión con cóctel de enzimas de proinsulina I recombinante conjugada con oligómero. Una alícuota de la solución en Tris-HCl de la mezcla de productos se analizó por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos y se diluyó a 15 mg/ml equivalente de insulina. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, la mezcla de productos (2.64 mmol) se dejó reaccionar con tripsina (3.68×10^{-3} mmol) y carboxipeptidasa B (1.20×10^{-3} mmol) a 15 °C. Después de 55 minutos, la reacción se detuvo por la adición de 4 N de ácido clorhídrico a pH ~3. Los productos principales se identificaron por el tiempo de retención en HPLC (con relación a los tiempos de retención de estándares de referencia conocidos) y análisis espectral de masa. Así, se obtuvo insulina conjugada en Lis^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 (80 %) e insulina (7 %). Se obtuvo péptido C conjugado en Lis⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7 como el producto secundario principal de la porción de péptido C de los conjugados de proinsulina I.

60 (c) Aislamiento de los productos de escisión con cóctel de enzimas de conjugación de proinsulina I recombinante con oligómero

65 Se usó HPLC de fase reversa para aislar los productos principales de la mezcla de productos obtenidos de la reacción de conjugación. Una columna de HPLC (10 cm. d.i. x 25 cm. de longitud) se empaquetó con una fase estacionaria de

C18 disponible comercialmente de utilidad conocida para la separación de péptidos y proteínas, y después se incorporó a un sistema de HPLC. El sistema se equilibró con amortiguador de elución, una mezcla que comprende 80 % de fase móvil A (amortiguador acetato de amonio 10 mM) y 20 % de fase móvil B (acetonitrilo) que se suministró a un régimen de flujo de 120 ml/min. Una solución de la mezcla de productos en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6, se aplicó a la columna de fase reversa, y los productos se separaron y se eluyeron con el uso de un gradiente en el cual el componente acetonitrilo del amortiguador de elución (fase móvil B) se aumentó de la siguiente manera:

5 20 %-27 % de fase móvil B durante 30 minutos, después
 27 %-29 % de fase móvil B durante 30 minutos, después
 29 %-32 % de fase móvil B durante 12 minutos, después
 10 32 %-35 % de fase móvil B durante 6 minutos, después
 35 %-45 % de fase móvil B durante 13 minutos.

Las fracciones se recogieron y se analizaron individualmente por HPLC para determinar la identidad y pureza del producto contenido en estas. Después, las fracciones comunes que contienen uno de los tres productos (insulina conjugada en Lis_{B29} con oligómero de hexil-PEG7 ("PEG7 HIM2")), insulina ("insulina") y péptido C conjugado en Lis64 con oligómero de hexil-PEG7 ("PEG7 Lis-péptido C") se agruparon, y cada grupo se diluyó a 10 % de acetonitrilo con agua y después se procesó, se cambió a amortiguador acetato de amonio 10 mM, pH 7.4 y se concentró por medio de diafiltración con el uso del sistema Pellicon II de Millipore. Las soluciones concentradas de PEG7 HIM2 y PEG7-Lis-péptido C se liofilizaron en un liofilizador de bandejas a polvos blancos de PEG7 HIM2 (4.86 g equivalente de insulina) y PEG7-Lis-péptido C (3.7 g). El HPLC y el análisis espectral de masa se usaron para determinar la identidad y pureza de cada aislado. Una muestra de material liofilizado de PEG7 HIM2 se caracterizó posteriormente por pruebas adicionales, mapeo peptídico y biopotencia (por medio del ensayo de glucosa en sangre de ratón (MBGA)) y se comparó con insulina USP y PEG7 HIM2 obtenidos por medio de conjugación con el uso de insulina USP.

25 Ejemplo 28

Comparabilidad del mapeo peptídico, la química y la potencia del conjugado de insulina en LisB29 con oligómero de hexil-PEG7, PEG7 HIM2, producido a partir de proinsulina contra el PEG7 HIM2 producido a partir de insulina

30 A. Método de mapeo peptídico:

Mapeo peptídico por digestión con endoproteinasa Glu-C (proteasa de *Staphylococcus aureus* V8):

35 El procedimiento usado se basa en el método descrito en la monografía de USP para insulina humana.

Preparación de muestras:

40 Se prepararon soluciones de insulina y conjugado de insulina que tienen una concentración de ~ 0.5 mg/ml con el uso de amortiguador HEPES 100 mM, pH 7.5, como diluyente. Las soluciones por HPLC con el uso del método de HPLC para el análisis de insulina y PEG7 HIM2 para determinar la concentración con relación a un estándar de insulina. Las soluciones se almacenaron a +5 °C. La solución de endoproteinasa Glu-C (de *Staphylococcus aureus* V8) que tiene una concentración de 2 mg/ml se preparó en agua.

45 Ensayo de prueba:

Se colocó 0.375 ml de solución de proteína en un frasco, se añadió 30 µl de solución de endoproteinasa Glu-C, el frasco se cerró y se selló, después se incubó a 25 °C (baño de agua en agitación) durante aproximadamente 4 horas. Se añadió 405 µl de una solución 50:50 (v/v) de sulfato de amonio 2.0 M/ácido sulfúrico 0.5 M al frasco para detener la reacción. La muestra se congeló.

50 Análisis:

Las muestras de reserva se analizaron por el método de HPLC para el análisis de PEG7 HIM2 e insulina. Todas las muestras digeridas se analizaron por el método de HPLC V8MAP1 (más abajo).

55 Columna: Columna C18 Waters DeltaPak, 150 mm de longitud x 3.9 mm D.I.; 5 µm de tamaño de partícula, 300 Å tamaño de poro de la fase estacionaria

Temperatura de la columna: +40 °C

Longitud de onda de detección: 220 nm

60 Fase móvil A: 10 % (v/v) de metanol en agua que contiene 0.1 % TFA

Fase móvil B: 10 % (v/v) de metanol en acetonitrilo que contiene 0.1 % TFA

Régimen de flujo: 1 ml/min.

Gradiente:

65

Tiempo (minutos)	% de Fase móvil A	% de Fase móvil B
0	89	11
70	67	37
73	89	11
75	89	11

TABLA 7

Principales fragmentos obtenidos por digestión con endoproteinasa Glu-C de muestras de insulina humana, USP y PEG7 HIM2 producidas a partir de insulina y proinsulina I

No.	Fragmento	Insulina humana	PEG7 HIM2, producido a partir de insulina	PEG7 HIM2, producido a partir de proinsulina I
1	[A5-A17 + B1-B13]	2970	2970	2970
2	[A18-A21 + B14-B21]	1379	1379	1378
3	[B22-B30]	1116	No presente	No presente
3' (Nota 1)		No presente	1554 (Nota 2 y 3)	1553 (Nota 2 y 3)
4	[A1-A4]	416	416	416

Notas de la Tabla 7

Nota 1: Fragmento 3' se refiere al pico observado en el mapa peptídico de PEG7 HIM2 que es diferente del fragmento 3 de la insulina humana.

Nota 2: El cromatograma de HPLC muestra un tiempo de retención diferente para este fragmento, lo que sugiere que el fragmento se ha modificado con hexiloligómero. El espectro de masa, que muestra un ion pseudomolecular que tiene una m/z ("masa") de 1554 unidades de masa atómica (amu) confirma la estructura de este fragmento como [B22-B30 + el peso molecular de un solo hexiloligómero].

Nota 3: El cromatograma de HPLC muestra diferentes tiempos de retención para este fragmento, lo que sugiere que el fragmento se ha modificado con hexiloligómero. El espectro de masa, que muestra un ion que tiene una m/z de 1554, confirma la estructura de este fragmento como [B22-B30 + el peso molecular de un solo hexiloligómero].

Las Figuras 17a y 17b muestran el perfil de HPLC de la digestión con Glu-C peptidasa (VX proteasa) del conjugado de insulina en LisB29 con hexiloligómero de PEG7 (PEG7 HIM2). El pico identificado como "unk" es un fragmento desconocido que es aparentemente un subproducto minoritario formado en las condiciones de digestión enzimática. El fragmento no identificado también está presente en los cromatogramas de HIM2 pero no se identifica por el nombre.

B. Comparabilidad química:

Pruebas de control	PEG7 HIM2 a partir de insulina USP	PEG7 HIM2 a partir de preproinsulina I
Apariencia (Visual)	Polvo blanco	Polvo blanco
Identidad:		
PM (por MALDI/MS)	6245.2 (M+1)	6244 (M+1)
HPLC	Se ajusta	Se ajusta
Mapeo peptídico	Se ajusta	Se ajusta
Pureza (HPLC)	96.1 %	99.3 %
Sustancias relacionadas (HPLC)	3.9 %	0.7 %
Contenido de proteína (HPLC)	95.9 % p/p (RH=23 %)	78.6 % p/p (RH=nd)
Humedad (Karl Fisher)	5.7 % p/p	8.7 % p/p
Acetato (cromatografía iónica)	0.13 % p/p	2.6 % p/p
Solventes residuales (GC-MS)	ACN 257 ppm	ACN 6.2 ppm Etanol 4.3 ppm
Ion amonio (cromatografía iónica)	0.4 % p/p	0.52 % p/p
nd: no determinado		

C. Método de biopotencia: MBGA

Ensayo prolongado de glucosa en sangre en ratón (MBGA) Seis grupos de dosis pareadas de 5 ratones CF-1 macho (Charles River Laboratories; 25-30 g) recibieron inyecciones subcutáneas del conjugado de insulina (artículo de prueba) o insulina humana recombinante. El artículo de prueba se reconstituyó con agua desionizada y se dosificó a 100, 66.6, 43.3, 30, 20, y 13.3 µg/kg. La insulina se reconstituyó con agua desionizada y se dosificó a 50, 33.3, 21.7, 15, 10, y 6.7 µg/kg. Después de recibir una dosis subcutánea en el cavidad formada por el muslo y la ingle, los animales fueron devueltos a sus jaulas por 30 minutos a temperatura ambiente y después fueron anestesiados rápidamente y sangrados terminalmente. Las muestras de sangre se recogieron en tubos de heparina para ensayo de glucosa. Si el ensayo de glucosa se retrasaba, los tubos se almacenaron en agua con hielo y se recalentaron a temperatura ambiente antes del ensayo.

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

Las Figuras 18a & b y 19a & b muestran los perfiles de biopotencia de MBGA de insulina e insulina PEG7 HIM2.

Pruebas de control	PEG7 HIM2 a partir de insulina USP	PEG7 HIM2 a partir de preproinsulina I
Biopotencia por MBGA	76-94 %	84 %

Ejemplo 29

Preparación de insulina conjugada en Lis_{B29} con oligómero e insulina conjugada en LisB29, FenB1-di(oligómero) como se describe en el Ejemplo 21

(a) Conjugación de proinsulina humana natural. Se disolvió proinsulina humana natural (Sigma Chemical Co) (3.20×10^4 mmol) en 5 ml de DMSO. A la solución se añadió 45 µl de trietilamina. La solución se dejó en agitación durante 5 minutos antes de añadir una solución de PEG7-hexiloligómero activado (6.4×10^4 mmol) en acetonitrilo. Después que la reacción había progresado de manera que el análisis por HPLC indica que la proinsulina se ha consumido (o la concentración de proinsulina ya no disminuye), la reacción se detuvo por adición de 0.5 ml de solución acuosa de ácido trifluoroacético al 5 %. Después, la mezcla de reacción se procesó y se cambió a amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6.

(b) Escisión con cóctel de enzimas de proinsulina natural conjugada con oligómero. Una alícuota de la solución en Tris-HCl de la mezcla de productos se analizó por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos en esta. Una

solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6.

Después, la mezcla cruda (1 mol. eq.) se dejó reaccionar con tripsina (1.39×10^{-3} mol. eq.) y carboxipeptidasa B (4.56×10^{-4} mol. eq.). Después de 30 minutos, la reacción se detuvo por adición de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. La mezcla de productos de la reacción se procesó y analizó por HPLC. El tiempo de retención (respecto al de los estándares de referencia) y el análisis espectral de masa se usaron para determinar la identidad. Los productos y productos esperados de la reacción fueron insulina, insulina conjugada en LisB29 con oligómero de hexil-PEG7, insulina conjugada en FenB1, LisB29 con di(oligómero de hexil-PEG7) y péptido C conjugado en Lis con oligómero de hexil-PEG7 (Tabla 8)

Tabla 8

Conjugados en mezcla cruda	Productos y (productos esperados)	PM por espec de masa
Proinsulina Natural Mono A (proinsulina conjugada en Lis64)	Insulina	5009 (M+1)
	Des Tre insulina	
	(péptido C conjugado en Lis64 con oligómero de hexil-PEG7),	
Proinsulina III Natural Mono B (proinsulina conjugada en Lis29)	(diarginal insulina, monoarginal insulina), (péptido C Arg65Lis ⁶⁴ conjugado con oligómero de hexil-PEG7), (Des Arg 31, 32 proinsulina) y (Des 65, 64 proinsulina)	
Proinsulina natural Di (proinsulina conjugada en LisB29 y Lis64)	Insulina conjugada en Lis con oligómero de hexil-PEG7,	6244 (M+1) (Figura 28)
	Péptido C	
Proinsulina III Tri (proinsulina conjugada en LisB29, Lis64 y FenB1)	(proinsulina Des Arg 31, 32 conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7), (proinsulina Des 65, 64 conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 ⁶⁴), (péptido C Arg31,32 conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7) y (péptido C Arg32 conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7)	
	Insulina conjugada en FenB1, LisB29 con di[oligómero de hexil-PEG7], péptido C conjugado en Lis64 con oligómero de hexil-PEG7	6682 (M+1)(Figura 29)
	(insulina Arg ³¹ -Arg ³² conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7), (proinsulina Des 65 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} FenB1 con tri(oligómero de hexil-PEG7)), (proinsulina Des Arg 31, 32 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} FenB1 con tri(oligómero de hexil-PEG7)),	
	(péptido C Arg31,32 conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7 ⁶⁴) y (péptido C Arg32 conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7)	

Ejemplo 30

Preparación de insulina conjugada en Lis^{B29} con oligómero monodispersa

(a) Conjugación de proinsulina II recombinante. La proinsulina II recombinante (PM 11,133 Dalton) se obtuvo de Itoham Foods, Inc. de Ibaraki Pref, Japón. La proinsulina II recombinante tenía un péptido líder y un péptido C, ambos carentes de residuos de lisina. Una porción de 2.55×10^{-1} mmol de proinsulina II recombinante se disolvió en 10 ml de DMSO. A la solución se añadió 355 µl de trietilamina. La solución resultante se dejó en agitación durante 5 minutos, y después se añadió una solución de metilheptaetilenglicol activado ((PEG7)-hexiloligómero) (5.10×10^{-3} mmol) en 0.6 ml de acetonitrilo. El progreso de la reacción se controló por HPLC. Después que la reacción pareció concluir, se detuvo por adición de 3.7 ml de solución acuosa de ácido trifluoroacético al 5 %. Después, la mezcla de reacción se procesó y se cambió a amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6.

(b) Escisión con cóctel de enzimas de proinsulina II recombinante conjugada con oligómero. La solución en Tris-HCl de la mezcla de productos se analizó por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos en esta. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. La mezcla de productos (0.399 $\mu\text{mol/ml}$) se dejó reaccionar con tripsina ($5.57 \times 10^{-4} \mu\text{mol/ml}$) y carboxipeptidasa B ($1.82 \times 10^{-4} \mu\text{mol/ml}$). Después de 30 minutos, la reacción se detuvo por adición de 550 μl de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Los productos principales se identificaron por el tiempo de retención en HPLC (con relación al de los estándares de referencia conocidos) y análisis espectral de masa. Así, se obtuvo insulina (8 %) e insulina conjugada en Lis^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 (60 %) y otros (30 %).

Ejemplo 31

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

Cada producto principal de la reacción de conjugación descrita en el Ejemplo 30(a) se aisló con el uso de HPLC de fase reversa. Una columna (1.0 cm. d.i. x 25 cm. de longitud) se empaquetó con una fase estacionaria de C18 disponible comercialmente de utilidad conocida para la resolución de polipéptidos y proteínas, y después se incorporó a un sistema de HPLC. El sistema se equilibró con amortiguador de elución que era una mezcla de 75 % de fase móvil A (H₂O con ácido trifluoroacético al 0.1 %) y 25 % de fase móvil B (acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0.1 %) que se suministró a un régimen de flujo de 5 ml/min. La solución en Tris-HCl de la mezcla de productos del Ejemplo 30(a) se aplicó a la columna, y los productos principales se separaron y se eluyeron con el uso de un gradiente de elución en el cual la composición del amortiguador de elución cambió de 25 % de fase móvil B a 35 % de fase móvil B durante 120 minutos. Cada una de las fracciones recogidas se analizó por HPLC para determinar la identidad y pureza del producto contenido en estas. Después, las fracciones comunes de cada producto (monoconjugado de proinsulina II ("Proinsulina II Mono") y diconjugado ("Proinsulina II Di") se agruparon, y el solvente se eliminó por evaporación rotatoria. La identidad y pureza de cada producto se determinaron por HPLC y análisis de espectrometría de masa.

Ejemplo 32

Escisión con cóctel de enzimas de conjugados de proinsulina II recombinante aislados

Cada conjugado de proinsulina II (Proinsulina II Mono, Di o Tri) que se aisló con el uso del procedimiento descrito en el Ejemplo 30 se disolvió en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6, y una alícuota de la solución se analizó por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos en esta. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. El conjugado (0.127 $\mu\text{mol/ml}$) se dejó reaccionar con tripsina ($1.77 \times 10^{-1} \mu\text{mol/ml}$) y carboxipeptidasa B ($5.77 \times 10^{-5} \mu\text{mol/ml}$). Después de 30 minutos, la reacción se detuvo por adición de 250 μl de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. El aislamiento de los productos principales seguido de la identificación por tiempo de retención en HPLC contra estándares de referencia y análisis espectral de masa mostró que en la reacción se produjo insulina, insulina acilada en B-29 con hexil-PEG7 y péptido C artificial acilado en N-amino. Los productos y rendimientos de cada reacción se ilustran en la Tabla 9 monodispersos.

Tabla 9 monodispersos

Conjugado	Productos	Rendimiento
Proinsulina II Mono	Insulina (PM 5808)	8 % (Figura 30)
	Insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 (PM 6244)	90 % (Figura 31)
	Péptido C artificial N conjugado con oligómero de hexil-PEG7	
Proinsulina II Di	Insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 (PM 6244)	92 % (Figura 32)

Ejemplo 33

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

(a) Conjugación de proinsulina III recombinante. La proinsulina III recombinante (9990 Dalton) se obtuvo de otro proveedor (Chung Kun Dang Corporation (CKD)). Ver la patente de los Estados Unidos núm. 5,952,461, cuyos contenidos se incorporan en la presente descripción en su totalidad como referencia por sus enseñanzas de la preparación de proinsulina. Ver, además, las siguientes patentes de los Estados Unidos, cuyos contenidos se incorporan en la presente descripción en su totalidad por sus enseñanzas de la fabricación de proinsulina y varios

análogos de proinsulina y péptido C: patente de los Estados Unidos núm. 6,348,327, patente de los Estados Unidos núm. 5,962,267, patente de los Estados Unidos núm. 5,952,461, patente de los Estados Unidos núm. 5,840,542, patente de los Estados Unidos núm. 5,473,049, patente de los Estados Unidos núm. 5,460,954, patente de los Estados Unidos núm. 5,304,473, patente de los Estados Unidos núm. 5,130,236, patente de los Estados Unidos núm. 4,792,602, patente de los Estados Unidos núm. 4,764,592, patente de los Estados Unidos núm. 4,654,324, patente de los Estados Unidos núm. 4,652,548, patente de los Estados Unidos núm. 4,652,547, patente de los Estados Unidos núm. 4,616,078, patente de los Estados Unidos núm. 4,431,740, patente de los Estados Unidos núm.4,327,072, y patente de los Estados Unidos núm. 3,953,418.

Una porción de 2.32×10^{-3} mmol de proinsulina III se disuelve en 10 ml de amortiguador borato (100 mM, pH 9.5). A la solución resultante se añade una solución de metilheptaetilenglicol activado ((PEG7)-hexiloligómero) (9.30×10^{-3} mmol) en 3-6 ml de acetonitrilo. El curso de la reacción de conjugación (acilación) se controla por HPLC. Cuando la reacción parece concluir, se detiene por ajuste del pH de la solución a pH <6 con ácido clorhídrico diluido. Después, la mezcla de reacción se procesa y se cambia a amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6.

(b) Escisión con cóctel de enzimas de proinsulina III recombinante conjugada con oligómero

Una alícuota de la solución en Tris-HCl de la mezcla de productos se analiza por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, la mezcla de productos ($0.424 \mu\text{mol/ml}$) se deja reaccionar con tripsina ($5.97 \times 10^{-4} \mu\text{mol/ml}$) y carboxipeptidasa B ($1.93 \times 10^{-4} \mu\text{mol/ml}$). Después de 30 minutos, la reacción se detiene por la adición de 1.58 ml de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Los productos principales se identifican por el tiempo de retención en HPLC (con relación a los tiempos de retención de estándares de referencia conocidos) y análisis espectral de masa. Así, se obtiene insulina e insulina conjugada en Lis^{B29} con oligómero de hexil-PEG7. La mezcla de productos de la reacción se procesa y analiza por HPLC. El tiempo de retención en HPLC con relación al de los estándares de referencia y el análisis espectral de masa se usan para determinar la identidad y pureza de cada producto (Tabla 10).

Tabla 10

Conjugados de proinsulina III y oligómero y productos (o productos esperados) de la escisión con cóctel de enzimas de cada uno	
Conjugado	Productos esperados
Proinsulina III Mono A (proinsulina III conjugada en Lis 64)	Insulina, péptido C conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7, diarginal insulina, monoarginal insulina, péptido C Arg ⁶⁵ Lis ⁶⁴ conjugado con oligómero de hexil-PEG7, Des Arg 31, 32 proinsulina, Des 65, 64 proinsulina, Arg-péptido líder y péptido líder
Proinsulina III Mono B (proinsulina III conjugada en B29)	Insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7, péptido C Proinsulina o proinsulina III Des Arg 31, 32 conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7, proinsulina o proinsulina III Des 65, 64 conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7, péptido C Arg ^{31,32} conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7, péptido C Arg ³² conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7, Arg-péptido líder y péptido líder
Proinsulina III Di (proinsulina III conjugada en B29 y Lis 64)	Insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 péptido C conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7, proinsulina o proinsulina III Des 65 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} con di(oligómero de hexil-PEG7), proinsulina o proinsulina III Des Arg 31, 32 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} con di(oligómero de hexil-PEG7)), péptido C Arg ^{31,32} conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7, péptido C Arg ³² conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7, Arg-péptido líder y péptido líder
Proinsulina III Tri (proinsulina III conjugada en B29, Lis 64 y N-amino terminal de péptido líder)	Insulina conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7 péptido C conjugado en Lis con oligómero de hexil-PEG7) insulina-Arg ³¹ -Arg ³² conjugada en Lis ^{B29} con oligómero de hexil-PEG7, proinsulina o proinsulina III Des 65 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B2} con di(oligómero de hexil-PEG7), proinsulina o proinsulina III Des Arg 31, 32 conjugada en Lis ⁶⁴ Lis ^{B29} con di(oligómero de hexil-PEG7), péptido C Arg ^{31,32} conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7, péptido C Arg ³² conjugado en Lis ⁶⁴ con oligómero de hexil-PEG7, , péptido líder-Arg conjugado con oligómero de hexil-PEG7 y péptido líder conjugado con oligómero de hexil-PEG7

Ejemplo 34

Preparación de desTre insulina conjugada en Lis_{B29} con oligómero a partir de precursor de desTre insulina de una sola cadena

5 (a) Conjugación de desTre miniproinsulina. Se obtiene el precursor de desTre insulina de una sola cadena recombinante (desTre miniproinsulina) (PM 5688 Dalton) (Wockhardt). Una cantidad (0.0195 mmol) se disuelve en 5 ml de amortiguador borato (100 mM, pH 9.5) y el pH se reajusta a pH 9.97. La solución resultante se añade a una solución de metilheptaetilenglicol activado ((PEG7)-hexiloligómero) (0.024mmol) en 1 ml de etanol. El curso de la reacción de conjugación (acilación) se controla por HPLC. Cuando la reacción parece concluir, se detiene por ajuste del pH de la solución a pH <6 con ácido clorhídrico diluido. Después, la mezcla de reacción se procesa y se cambia a amortiguador
10 Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. El cromatograma de HPLC de la mezcla de reacción final muestra la siguiente composición: miniproinsulina sin reaccionar (20.7 %), miniproinsulina conjugada en LisB29 (71.1 %) y miniproinsulina diconjugada en FenB1, LisB29 (6.2 %).

15 A partir de una porción de la mezcla de reacción anterior, cada producto principal de la reacción de conjugación descrita anteriormente se aísla con el uso de HPLC de fase reversa. Una columna (1.0 cm. d.i. x 25 cm. de longitud) se empaqueta con una fase estacionaria de C18 disponible comercialmente de utilidad conocida para la resolución de polipéptidos y proteínas, y después se incorpora a un sistema de HPLC. El sistema se equilibra con amortiguador de elución que es una mezcla de 75 % de fase móvil A (H₂O con 0.1 % 15 20 25 30 ácido trifluoroacético) y 25 % de fase móvil B (acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0.1 %) que se suministra a un régimen de flujo de 5 ml/min. La solución en Tris-HCl de la mezcla de productos se aplica a la columna, y los productos principales se separan y eluyen con el uso de un gradiente de elución en el cual la composición del amortiguador de elución cambia de 25 % de fase móvil B a 35 % de fase móvil B durante 120 minutos. Cada una de las fracciones que se recoge se analizan por HPLC para determinar la identidad y pureza del producto contenido en estas. Después, las fracciones comunes de cada producto (miniproinsulina sin reaccionar, monoconjugado de miniproinsulina y diconjugado de miniproinsulina) se agrupan, y el
20 solvente se elimina por evaporación rotatoria. La identidad y pureza de cada producto se determina por HPLC y análisis de espectrometría de masa.

(b) Escisión con cóctel de enzimas de desTre miniproinsulina recombinante conjugada con oligómero. Una alícuota de la solución en Tris-HCl de la mezcla de productos se analiza por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos.
30 Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, la mezcla de productos (0.424 μmol/ml) se deja reaccionar con tripsina (5.97 x 10⁻⁴ μmol/ml) y carboxipeptidasa B (1.93 x 10⁻⁴ μmol/ml). Después de 60 minutos, la reacción se detiene por la adición de 1.58 ml de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Los productos principales se identifican por el tiempo de retención en HPLC (con relación a los tiempos de retención de estándares de referencia conocidos) y análisis espectral de masa. Así, se obtiene desTre insulina conjugada en Lis_{B29} con oligómero de hexil-PEG7, desTre insulina conjugada en LisB29, FenB1 con di(oligómero de hexil-PEG7) y desTre insulina. La mezcla de productos de la reacción se procesa y analiza por HPLC. El tiempo de retención en HPLC con relación al de los estándares de referencia y el análisis espectral de masa se usan para determinar la identidad y pureza de cada producto (Tabla 11).

40

Tabla 11

Conjugados de (desTre miniproinsulina con oligómero y productos (o productos esperados) de la escisión con cóctel de enzimas de cada uno	
Conjugado	Productos esperados
Monoconjugado de miniproinsulina en LisB29	DesTre insulina conjugada en Lis29 con oligómero de hexil-PEG7
Diconjugado de miniproinsulina en FenB1, LisB29	DesTre insulina conjugada en FenB1, Lis29 con di(oligómero de hexil-PEG7)

Ejemplo 35

55 Preparación de péptido C conjugado en Lis₆₄ con oligómero a partir de propéptido C

(a) Conjugación de propéptido C sintético. El propéptido C sintético (31-65) (Arg-Arg-péptido C humano-Lis-Arg) (PM 3617 Dalton) se adquiere de American Peptide Company, Estados Unidos. Una porción de 2.32 x 10⁻³mmol de péptido C se disuelve en 10 ml de amortiguador borato (100 mM, pH 9.5). A la solución resultante se añade una solución de metilheptaetilenglicol activado con N-hidroxisuccinimida ((PEG7)-hexiloligómero) (9.30 x 10⁻¹ mmol) en 3-6 ml de acetonitrilo. El curso de la reacción de conjugación (acilación) se controla por HPLC. Cuando la reacción parece concluir, se detiene por ajuste del pH de la solución a pH <6 con ácido clorhídrico diluido. Después, la mezcla de reacción se procesa y se cambia a amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6.

65 (b) Escisión con cóctel de enzimas de propéptido C conjugado con oligómero 31-65).

Una alícuota de la solución en Tris-HCl de la mezcla de productos se analiza por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, la mezcla de productos (0.424 $\mu\text{mol/ml}$) se deja reaccionar con tripsina ($5.97 \times 10^4 \mu\text{mol/ml}$) y carboxipeptidasa B ($1.93 \times 10^{-1} \mu\text{mol/ml}$). Después de 30 minutos, la reacción se detiene por la adición de 1.58 ml de ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo. Los productos principales se identifican por el tiempo de retención en HPLC (con relación a los tiempos de retención de estándares de referencia conocidos) y análisis espectral de masa. Así, se obtiene péptido C humano (33-63) y péptido C conjugado en Lis₆₄ con oligómero de hexil-PEG7. La mezcla de productos de la reacción se procesa y analiza por HPLC. El tiempo de retención en HPLC con relación al de los estándares de referencia y el análisis espectral de masa se usan para determinar la identidad y pureza de cada producto (Tabla 12).

Tabla 12

Conjugados de propéptido C y oligómero y productos (o productos esperados) de la escisión con cóctel de enzimas	
Conjugado	Productos esperados
Monoconjugado (Lis 64) de propéptido C (conjugado en Lis64)	Péptido C conjugado en Lis64 con oligómero de hexil-PEG7, péptido C Arg65Lis ⁶⁴ conjugado con oligómero de hexil-PEG7, péptido C Arg32, conjugado en Lis64 con oligómero de hexil-PEG7
Conjugado de propéptido C (Arg31) (conjugado en Arg31)	Péptido C, Arg31-péptido C
Diconjugado de propéptido C (conjugado en Arg31 y Lis64)	Péptido C conjugado en Lis64 con oligómero de hexil-PEG7, péptido C Arg65Lis ⁶⁴ conjugado con oligómero de hexil-PEG7, péptido C Arg32, conjugado en Lis64 con oligómero de hexil-PEG7

Ejemplo 36

Métodos para sintetizar polipéptidos de insulina acilados con el uso de preparación de proinsulina de otra insulina conjugada en Lis_{B29} con oligómero

(a) Conjugación de proinsulina II recombinante. Se obtuvo proinsulina II recombinante (PM 11134 Dalton). Una porción ($1.79 \times 10^{-3} \text{ mmol}$) de proinsulina II se disolvió en 1 ml de DMSO y se añadió a trietilamina 0.25 ml, y la solución se agitó durante 20 minutos. A la solución resultante se añadió una solución de hexaetilenglicol monoheptadecil éter activado (oligómero de heptadecil-PEG6, Figura 20) ($4.49 \times 10^{-3} \text{ mmol}$) en 1 ml de THF. El curso de la reacción de conjugación (acilación) se controló por HPLC. Cuando la reacción pareció concluir, se detuvo con solución de TFA al 1 %. Después, la mezcla de reacción se procesó y se cambió a amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6.

Una pequeña porción de la mezcla de reacción antes del cambio con amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6 se procesó y analizó por HPLC. Los productos principales se purificaron por HPLC y se analizaron por espectroscopía de masa. Así, se obtuvieron dos monoconjugados y un diconjugado de proinsulina II. El tiempo de retención en HPLC con relación al de los estándares de referencia y el análisis espectral de masa se usaron para determinar la identidad y pureza de cada producto (Tabla 13).

Tabla 13

Conjugados de proinsulina II y oligómero			
Conjugado	Producto	PM	Figura
Proinsulina II Mono B	Proinsulina II conjugada en Lis _{B29} con oligómero de hexadecil-PEG6	11666	21
Proinsulina II Mono A	Proinsulina II conjugada en péptido líder con oligómero de hexadecil-PEG6	11666	22
Proinsulina II Di	Proinsulina II conjugada en Lis _{B29} con hexadeciloligómero y proinsulina II conjugada en péptido líder con oligómero de hexadecil-PEG6	12198	23

(b) Escisión con cóctel de enzimas de proinsulina I recombinante conjugada con oligómero de hexadecil-PEG6. Una alícuota de la solución en Tris-HCl de la mezcla de productos se analizó por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se preparó en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, la mezcla de productos (0.05 $\mu\text{mol/ml}$) se dejó reaccionar con tripsina (1.56×10^{-4} $\mu\text{mol/ml}$) y carboxipeptidasa B (0.78×10^{-1} $\mu\text{mol/ml}$). Después de 30 minutos, la reacción se detuvo por la adición de 9 ml de ácido trifluoroacético al 0.1 % en acetonitrilo. Los productos principales se identificaron por tiempo de retención en HPLC y análisis espectral de masa (Figuras 25 y 26). Se obtuvo insulina e insulina conjugada en Lis_{B29} con oligómero de hexadecil-PEG6. La mezcla de productos de la reacción se procesó y analizó por HPLC. El tiempo de retención en HPLC con relación al de los estándares de referencia y el análisis espectral de masa se usaron para determinar la identidad y pureza de cada producto (Tabla 14).

Tabla 14

Conjugados de proinsulina II y oligómero y productos o (productos esperados) de la escisión con cóctel de enzimas			
Conjugado	Productos	PM	Figura
Proinsulina II Mono A	Insulina	5809 (M+1)	--
	Péptido líder conjugado con oligómero de hexadecil-PEG6, (desT _{re} insulina) y (péptido C artificial)	2035 (M+1)	--
Proinsulina II Mono B	Insulina conjugada en Lis _{B29} con oligómero de hexadecil-PEG6 y (péptido líder)	6341 (M+1)	23
Proinsulina II Di	Insulina conjugada en Lis _{B29} con oligómero de hexadecil-PEG6, (péptido líder conjugado con oligómero de hexadecil-PEG6) y (péptido C artificial)	6341 (M+1)	23

El tetraetilenglicol monohexadecil éter activado (C16-PEG4) (Figura 27) y el octaetilenglicol monohexadecil éter activado (C16-PEG8) (Figura 27) se conjugaron con proinsulina II con el uso de este procedimiento y se sometieron al cóctel de enzimas descrito en la presente descripción para obtener los productos finales insulina conjugada en Lis_{B29} con oligómero de hexadecil-PEG4 e insulina conjugada en Lis_{B29} con oligómero de hexadecil-PEG8, respectivamente.

Ejemplo 37

Preparación de insulina acilada en Lis_{B29}

(a) Acilación de proinsulina I recombinante. Se obtiene proinsulina I recombinante (PM 10,642 Dalton). Una porción (1.79×10^{-3} mmol) de proinsulina I se disuelve en 1 ml de DMSO y se añade a trietilamina 0.25 ml, y la solución se agita durante 20 minutos. A la solución resultante se añade una solución de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido palmítico ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$) (9.30×10^{-3} mmol) en 1 ml de THF. El curso de la reacción de conjugación (acilación) se controla por HPLC. Cuando la reacción parece concluir, se detiene con solución de TFA al 1 %. Después, la mezcla de reacción se procesa y se cambia a amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6.

Una pequeña porción de la mezcla de reacción antes del cambio con amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6 se procesa y analiza por HPLC. Los productos principales se purifican por HPLC y se analizan por espectroscopía de masa. Así, se obtienen dos productos de proinsulina I monoacilados, uno diacilado y uno triacilado. El tiempo de retención en HPLC con relación al de los estándares de referencia y el análisis espectral de masa se usan para determinar la identidad y pureza de cada producto (Tabla 15).

Tabla 15

Conjugados de proinsulina I y oligómero con palmitoilo activado		
Conjugado	(Producto)	PM esperado
Proinsulina I Mono B	(proinsulina I palmitoilada en Lis _{B29})	10880
Proinsulina I Mono A	(proinsulina I palmitoilada en Lis ₆₄)	10880
Proinsulina I Di	(Lis _{B29} , Lis 64 di(palmitoil) proinsulina I)	1118
Proinsulina I, Tri	(Lis _{B29} , Lis 64 y N-amino péptido líder tri(palmitoil) proinsulina I)	11356

(b) Escisión con cóctel de enzimas de palmitoil proinsulina I recombinante. Una alícuota de la solución en Tris-HCl de la mezcla de productos se analiza por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, la mezcla de productos (0.05 $\mu\text{mol/ml}$) se deja reaccionar con tripsina (1.56 x 10⁴ $\mu\text{mol/ml}$) y carboxipeptidasa B (0.78 x 10⁴ $\mu\text{mol/ml}$). Después de 30 minutos, la reacción se detiene por la adición de 9 ml de ácido trifluoroacético al 0.1 % en acetonitrilo. Los productos principales se identifican por tiempo de retención en HPLC y análisis espectral de masa. Se obtiene insulina, LisB29-palmitoil insulina y Lis64-palmitoil péptido C. La mezcla de productos de la reacción se procesa y analiza por HPLC. El tiempo de retención en HPLC con relación al de los estándares de referencia y el análisis espectral de masa se usan para determinar la identidad y pureza de cada producto.

Los ésteres activados de cadena acilo (C2 a C18) se hacen reaccionar con proinsulina I con el uso del procedimiento en el ejemplo 37(a) y se someten al cóctel de enzimas como en el ejemplo 37(b) para obtener los productos finales insulinas aciladas en Lis B29 y péptidos C acilados en Lis64 correspondientes a la cadena acilo.

Ejemplo 38

Preparación de insulina a partir de proinsulina carbonilada

(a) Carbonilación de proinsulina I recombinante. Se obtiene proinsulina I recombinante (PM 10,642 Dalton). Una porción (1.79 x 10⁻³ mmol) de proinsulina I se disuelve en 1 ml de DMSO y se añade a trietilamina 0.25 ml, y la solución se agita durante 20 minutos. La solución resultante se añade a una solución de éster carbonato de arilo (9.30 x 10⁻³ mmol) (éster carbonato N-hidroxisuccinimida de fenol) en 1 ml de THF. El curso de la reacción de conjugación (carbonilación) se controla por HPLC. Cuando la reacción parece concluir, se detiene con solución de TFA al 1 %. Después, la mezcla de reacción se procesa para eliminar solventes, N-hidroxisuccinimida y fenol, y se cambia a amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6.

Una pequeña porción de la mezcla de reacción antes del cambio con amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6 se procesa y analiza por HPLC. Los productos principales se purifican por HPLC y se analizan por espectroscopía de masa. Así, se obtienen dos productos monocarbonilados de proinsulina I, un producto dicarbonilado y uno tricarbonilado. El tiempo de retención en HPLC con relación al de los estándares de referencia y el análisis espectral de masa se usan para determinar la identidad y pureza de cada producto (Tabla 16).

Tabla 16

Conjugados de proinsulina I y oligómero con éster carbonato de fenol activado	
Conjugado	(Producto)
Proinsulina I Mono B	(proinsulina I carbonilada en Lis _{B29})
Proinsulina I Mono A	(proinsulina I carbonilada en Lis64)
Proinsulina I Di	(proinsulina I Lis _{B29} , Lis 64 di(carbonilada))
Proinsulina I, Tri	(proinsulina I Lis _{B29} , Lis 64 y N-amino de péptido líder tri(carbonilada))

(b) Escisión con cóctel de enzimas de proinsulina I recombinante carbonilada. Una alícuota de la solución en Tris-HCl de la mezcla de productos se analiza por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos. Una solución de tripsina (tratada con TPCK; de páncreas bovino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Una solución de carboxipeptidasa B (de páncreas porcino) se prepara en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Después, la mezcla de productos (0.05 $\mu\text{mol/ml}$) se deja reaccionar con tripsina (1.56 x 10⁴ $\mu\text{mol/ml}$) y carboxipeptidasa B (0.78 x 10⁴ $\mu\text{mol/ml}$). Después de 30 minutos, la reacción se detiene por la adición de 9 ml de ácido trifluoroacético al 0.1 % en acetonitrilo. Después, la mezcla de reacción se procesa y se cambia a amortiguador fosfato 10 mM, pH 7.2.

Una pequeña porción de la mezcla de reacción antes del cambio con amortiguador fosfato 10 mM, pH 7.2 se procesa y analiza por HPLC. Los productos principales se purifican por HPLC y se analizan por espectroscopía de masa. Los productos principales se identifican por tiempo de retención en HPLC y análisis espectral de masa. Se obtiene insulina, LisB29-Fenilcarbamato de insulina y Lis64-Fenilcarbamato de péptido C. La mezcla de productos de la reacción se procesa y analiza por HPLC. El tiempo de retención en HPLC con relación al de los estándares de referencia y el análisis espectral de masa se usan para determinar la identidad y pureza de cada producto.

(c) Escisión de insulina carbonilada con enzima elastasa pancreática. Una alícuota de la solución en amortiguador fosfato 0.01 M de la mezcla de productos se analiza por HPLC para determinar la concentración de polipéptidos. Una solución de elastasa pancreática (Tipo III; de páncreas porcino) se prepara en amortiguador fosfato 10 mM, pH 7.2. Después, la mezcla de productos (5x10⁻³M) se deja reaccionar con elastasa pancreática (2.56x10⁻⁴M) a temperatura

ambiente. Después de 60 minutos, la reacción se detiene por la adición de un volumen igual de ácido cítrico 0.02 M. Esta etapa puede lograrse por hidrólisis básica, tal como en un amortiguador alcalino, por ejemplo, a pH 10 o superior en condiciones controladas.

5 Los productos principales se identifican por el tiempo de retención en HPLC y el análisis espectral de masa. Se obtiene insulina y Lis64-péptido C. La mezcla de productos de la reacción se procesa y analiza por HPLC. El tiempo de retención en HPLC con relación al de los estándares de referencia y el análisis espectral de masa se usan para determinar la identidad y pureza de cada producto.

10 Ejemplo 39

Optimización del proceso de transformación enzimática

15 En una modalidad de la presente invención, la concentración de enzima necesaria para escindir péptidos de una molécula de polipéptido de proinsulina para producir insulina puede reducirse hasta 4000X, mientras se mantiene la actividad de escisión eficaz y específica. Se emplea un cóctel de tripsina-CPB, de acuerdo con los protocolos descritos en la presente descripción para la escisión de polipéptidos para producir insulina, en donde la enzima tripsina está presente en una cantidad que es >700 mol de tripsina por cada mol de proinsulina, y puede estar presente, por ejemplo, en la siguiente relación: 1 mol de proinsulina:1/2000 mol de tripsina. La carboxipeptidasa B (CPB) puede estar presente en el cóctel en una cantidad que es >2000 -2200 mol de CPB en comparación con proinsulina y puede estar presente por ejemplo en la siguiente relación: 1 mol de proinsulina:1/4000 mol de CPB. Así, el cóctel de enzimas de tripsina y CPB puede emplearse de la siguiente manera: 1 mol de sustrato:1/ >700 mol de tripsina:1/ >2000 -2200 mol de CPB y puede ser, por ejemplo, 1 mol de sustrato:1/2000 mol de tripsina:1/4000 mol de CPB. La relación de sustrato, tal como proinsulina, respecto a tripsina y CPB puede ser cualquier valor por encima o por debajo de los valores descritos en la presente descripción, y puede ser, por ejemplo, 1 mol de sustrato:1/750 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/800 mol de tripsina, 1 mol de sustrato/850 mol de tripsina 1 mol de sustrato/900 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/950 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/1000 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/1200 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/1400 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/1500 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/1600 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/1700 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/1800 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/1900 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/2000 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/2200 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/2400 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/2500 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/2600 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/2800 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/3000 mol de tripsina, 1 mol de sustrato:1/2100 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/2200 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/2400 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/2500 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/2600 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/2800 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/3000 mol de CPB, 1 mol de sustrato: 1/3200 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/3400 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/3600 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/3800 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/4000 mol de CPB, 1 mol de sustrato: 1/4200 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/4400 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/4600 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/4800 mol de CPB, 1 mol de sustrato:1/5000 mol de CPB, etc., y/o cualquier combinación de estas con respecto a una relación de sustrato, tripsina y CPB.

40 Así, la presente invención proporciona, además, un método para producir insulina a partir de un polipéptido de proinsulina, que comprende poner con contacto el polipéptido de proinsulina con un cóctel enzimático para escindir péptido C y péptido líder del polipéptido de proinsulina, en donde el cóctel enzimático comprende una enzima similar a tripsina (por ejemplo, las enzimas tripsina, trombina, de *Achronabacter lyticus*) y una enzima similar a carboxipeptidasa (por ejemplo, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B), en condiciones en donde

45 c) la relación molar de la enzima similar a tripsina respecto a la enzima similar a carboxipeptidasa es $1/ >700$:1/ >2000 .

50 En algunas modalidades de la presente invención, cuando el sustrato es un polipéptido de proinsulina, la relación de enzima tripsina respecto a enzima CPB es una relación de enzimas a la cual la escisión del polipéptido de proinsulina se produce en Arg31 y en residuos de Arg que conectan la cadena B con el péptido líder y que conectan la cadena B con el péptido C y que conectan la cadena A con el péptido C pero no se produce en un grado significativo (por ejemplo, es menor que 1 %, 5 % o 10 %) en Arg B22 del polipéptido de proinsulina.

55 Ejemplo 40

Uso de precursores de insulina de una sola cadena para producir derivado de insulina sin proceso de transpeptidación

60 La conjugación (acilación) de insulina en el residuo amino de Lis B-29 de la cadena B se hace mediante la reacción de la insulina nativa con una entidad activada (por ejemplo, éster N-hidroxisuccinimida de oligómero) (Figura 33) en un medio de reacción seleccionado. La selectividad de la reacción hacia Lis B-29 se reduce fundamentalmente debido a la acilación en los grupos amino de Gli A-1 así como Fen B-1 hacia el éster de N-hidroxisuccinimida. En estas condiciones, la reacción conduce a una mezcla de conjugados de insulina compuesto de modificaciones en Lis B-29 así como Gli A-1 y B-Fen. Por consiguiente, el conjugado en Lis B-29 se purifica de otros productos por cromatografía a un rendimiento bajo. Se ha demostrado que el uso de condiciones optimizadas que involucran un medio orgánico y una base orgánica y

una cantidad estequiométrica de N-hidroxisuccinimida mejora la selectividad de acilación en Lis B-29 respecto a Gli A-1. Sin embargo, el problema de las modificaciones en otros sitios no puede evitarse con el uso de insulina desprotegida.

5 En la presente invención se ha demostrado que el uso de proinsulinas naturales y artificiales (Figuras 34 y 35) proporciona una ruta única para producir derivados de insulina modificados o conjugados en la cadena lateral de Lis de la cadena B con una selectividad mayor que con la ruta de la insulina. En la(s) proinsulina(s), el extremo amino terminal de la cadena A de insulina, Gli A-1, está conectado al extremo carboxilo terminal de la cadena B por medio de un péptido C. Como la cadena lateral amino de Gli A-1 está protegida por el péptido C, la reacción (acilación) de proinsulina con éster de N-hidroxisuccinimida modificará selectivamente la cadena lateral amino de Lis (por ejemplo, B-29, insulina humana) de la cadena B. Tras la escisión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa, el conjugado proporcionará insulina acilada en Lis B-29. La proinsulina se usará como el material de partida en lugar de insulina porque incluso si la Lis (por ejemplo, Lis 64 de proinsulina natural) en el péptido C está acilada junto con Lis B-29, la escisión enzimática con tripsina y carboxipeptidasa del extremo N terminal del péptido líder, aún se producirá en Arg 63, Arg 32 y Arg 31 para proporcionar la insulina acilada en Lis de la cadena B.

15 Las nuevas secuencias pueden expresarse, además, en sistemas de levadura (por ejemplo, *Pichia*, *P. morpha*, etc.) como resultado del péptido C corto (C = 0, -1, -2, -3, -4, -5, etc.).

20 La ventajas del uso de estas nuevas secuencias como el material de partida para proporcionar insulina con Lis modificada (Figuras 36 y 37) son las siguientes.

1. Como el extremo amino terminal de Gli A-1 está protegido de la acilación, el uso de proinsulina proporciona mayor selectividad por la modificación de Lis B-29.
2. Los sitios Fen B-1 pueden estar, además, bloqueados para la conjugación en presencia de una secuencia líder en B-1.
- 25 3. La conjugación en Lis B-29 evita la eliminación de la Tre B-30 con tripsina y por lo tanto no será necesario un proceso de transpeptidación para introducir Tre en B-30.
4. Ambos conjugados, monoconjugado en Lis B-29 y diconjugado, en B29 y L-1 (péptido líder-1), producen un solo producto, insulina modificada en B-29 tras la escisión.
5. El diconjugado, conjugado en Lis B-29 y Fen B-1 con el uso de precursor de insulina de una sola cadena sin péptido líder, produce un solo producto, insulina modificada en B-29 y B-1 tras la escisión.
- 30 6. Esta ruta proporciona una elevada conversión a producto B-29 (>80 %) en comparación con la que se obtiene por medio de conjugación con el uso de insulina.
7. Esta ruta puede usarse con cualquier tipo de proinsulina independientemente de la secuencia de la parte no escindible del espaciador (minipéptido C) entre las cadenas A y B o péptido líder.
- 35 8. Esta ruta puede usarse para producir modificación en la cadena lateral de Lis independientemente de la posición de la Lis en la cadena B. Por lo tanto, puede usarse con cualquier tipo de proinsulina (proinsulina con péptido líder o proteína de fusión) o miniproinsulina (proinsulina con cadenas de péptido C pequeñas) o molécula similar a proinsulina (por ejemplo, pro LisPro).
9. Esta ruta proporciona una ruta directa a insulina diacilada (modificada) en Lis B-29, Fen B-1 con el uso de un precursor de insulina de una sola cadena sin un péptido líder (por ejemplo, constructo 1).
- 40 10. Esta ruta proporciona un esquema de fabricación comercialmente más barato y de alto rendimiento para producir insulina modificada en Lis B-29 (por ejemplo, HIM2) respecto al uso de insulina o precursores de insulina de una sola cadena que no contienen Tre.

45 Secuencias de precursores de insulina de una sola cadena sin transpeptidación:

- Constructo 1: cadena B-Arg-cadena A
 Constructo 2: His-Gli-Arg-cadena B-Arg-cadena A
 Constructo 3: His-Gli-Arg-cadena B-Arg-Arg-cadena A
 Constructo 3: péptido líder-Arg-cadena B-Arg-Ala-Lis-Arg-cadena A
 50 Constructo 4: péptido líder-Arg-cadena B-Arg-Pro-Arg-cadena A
 Constructo 5: cadena B-Arg-Arg-cadena A

cadena B y cadena A: cadenas B y A de secuencias de insulina humana y otras (por ejemplo, bovina, porcina, murina, etc.), o modificaciones de cualquier secuencia de insulina (por ejemplo, Lis28Pro29 insulina) o análogos de insulina sin uno (por ejemplo, desTre cadena B) o más aminoácidos o sustitución de uno o más aminoácidos.

La presente invención se ha descrito en la presente descripción con referencia a varias modalidades. El alcance de la invención se define por las siguientes reivindicaciones.

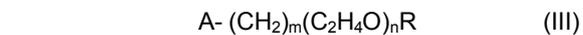
Reivindicaciones

1. Un método para sintetizar un conjugado de polipéptido de insulina y oligómero que comprende:
 - (a) poner en contacto un polipéptido de proinsulina con un oligómero que comprende una porción hidrofílica y una porción lipofílica en condiciones suficientes para acoplar el oligómero al polipéptido de proinsulina en la Lis29 de la cadena B de la proinsulina, y proporcionar un conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero, en donde las condiciones suficientes para acoplar el oligómero al polipéptido de proinsulina comprenden la acilación con un éster de hidroxisuccinimida a la Lis29 de la cadena B de insulina, y en donde la porción hidrofílica comprende una porción de polialquilenglicol, en donde el polipéptido de proinsulina comprende: una cadena A y una cadena B de insulina y polipéptidos conectores no insulínicos o residuos de aminoácidos que conectan las cadenas A y B entre sí, en donde el polipéptido de proinsulina con polipéptidos o residuos de aminoácidos conectores se selecciona de:
 - (1) His-Gli-Arg-cadena B-Arg-cadena A;
 - (2) His-Gli-Arg-cadena B-Arg-Arg-cadena A;
 - (3) péptido líder-Arg-cadena B-Arg-Ala-Lis-Arg-cadena A; o
 - (4) péptido líder-Arg-cadena B-Arg-Pro-Arg-cadena A; y
 - (b) escindir el péptido líder y los polipéptidos no insulínicos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero con una enzima de escisión para proporcionar el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde:
 - (a) el polipéptido de proinsulina tiene una sola lisina en B29, y
 - (b) el conjugado de polipéptido de insulina y oligómero es un monoconjugado en B29.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde:
 - (a) el péptido líder comprende una lisina, y
 - (b) la etapa (a) produce un polipéptido de proinsulina con oligómero en el que la(s) lisina(s) del péptido líder está(n) acoplada(s) a oligómero(s).
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido líder carece de residuos de lisina.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la porción de polialquilenglicol es una porción de polietilenglicol.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la porción de polialquilenglicol tiene entre 1 y 50 subunidades de polialquilenglicol.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la porción de polialquilenglicol tiene entre 2 y 10 subunidades de polialquilenglicol.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la porción de polialquilenglicol tiene al menos 2 subunidades de polialquilenglicol.
9. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la porción lipofílica comprende una porción alquilo.
10. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la porción lipofílica tiene entre 1 y 28 átomos de carbono.
11. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la porción lipofílica tiene entre 2 y 24 átomos de carbono.
12. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la porción lipofílica tiene entre 3 y 18 átomos de carbono.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la etapa de escisión (b) resulta en la escisión del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero en uno o más sitios que comprenden un sitio de escisión con tripsina.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la etapa de escisión (b) resulta en la escisión del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero en uno o más sitios que comprenden un sitio de escisión de arginina.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la escisión del uno o más polipéptidos no insulínicos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero comprende poner con contacto el conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero con una o más enzimas que son capaces de escindir el(los) enlace(s)

entre el uno o más polipéptidos no insulínicos y el polipéptido de insulina en condiciones suficientes para escindir el uno o más polipéptidos no insulínicos del conjugado de polipéptido de proinsulina y oligómero.

5 16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la una o más enzimas se seleccionan de tripsina, carboxipeptidasa B, y mezclas de estas.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el oligómero tiene una fórmula:



en donde:

- 15 (a) A es -C(O)-OH;
(b) m está entre 2 y 22,
(c) n está entre 3 y 12; y
(d) R es una porción alquilo.

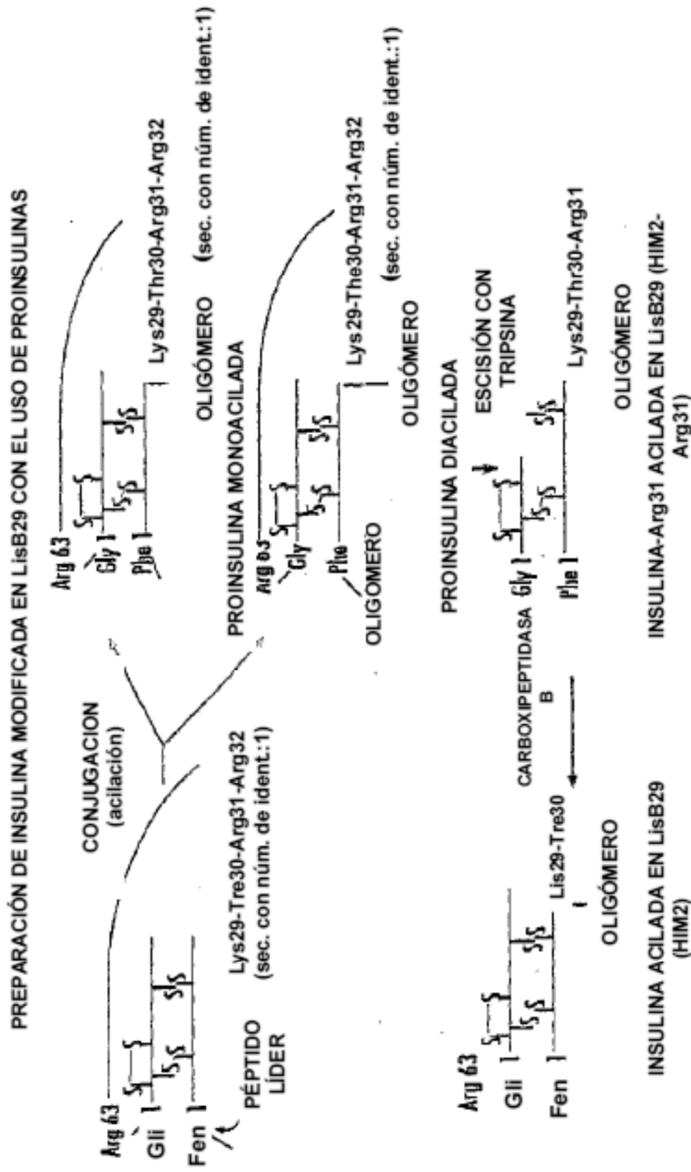


Figura 1

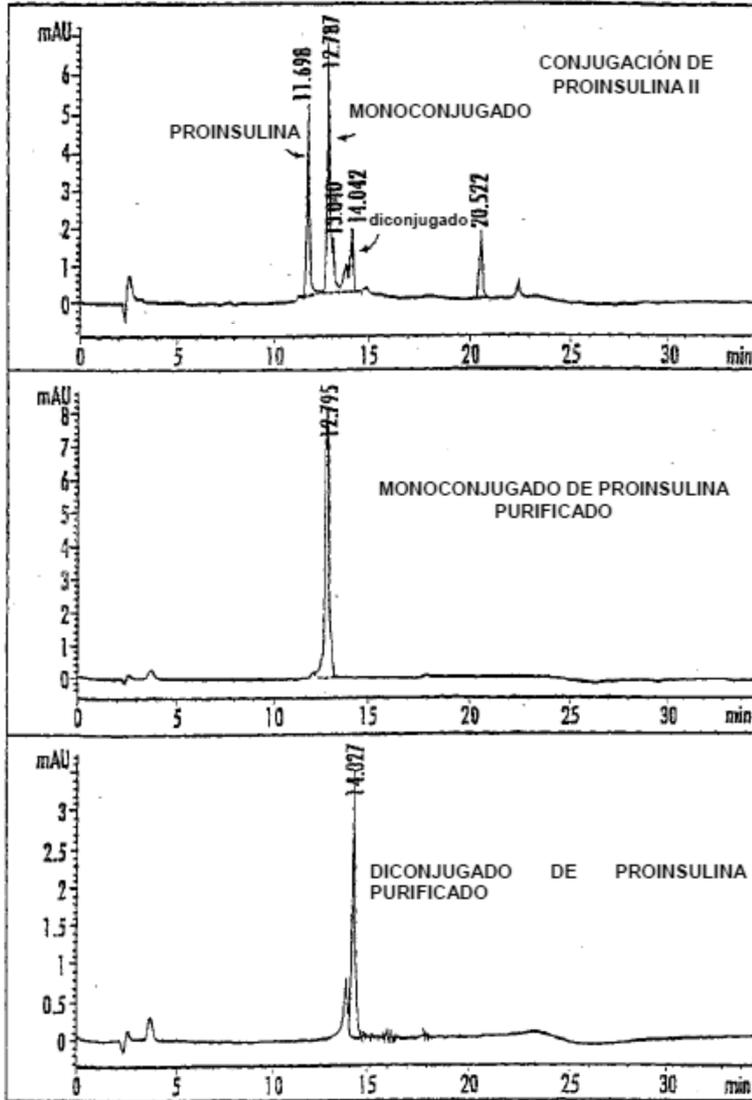


Figura 2

MONOCONJUGADO DE PROINSULINA II PURIFICADO

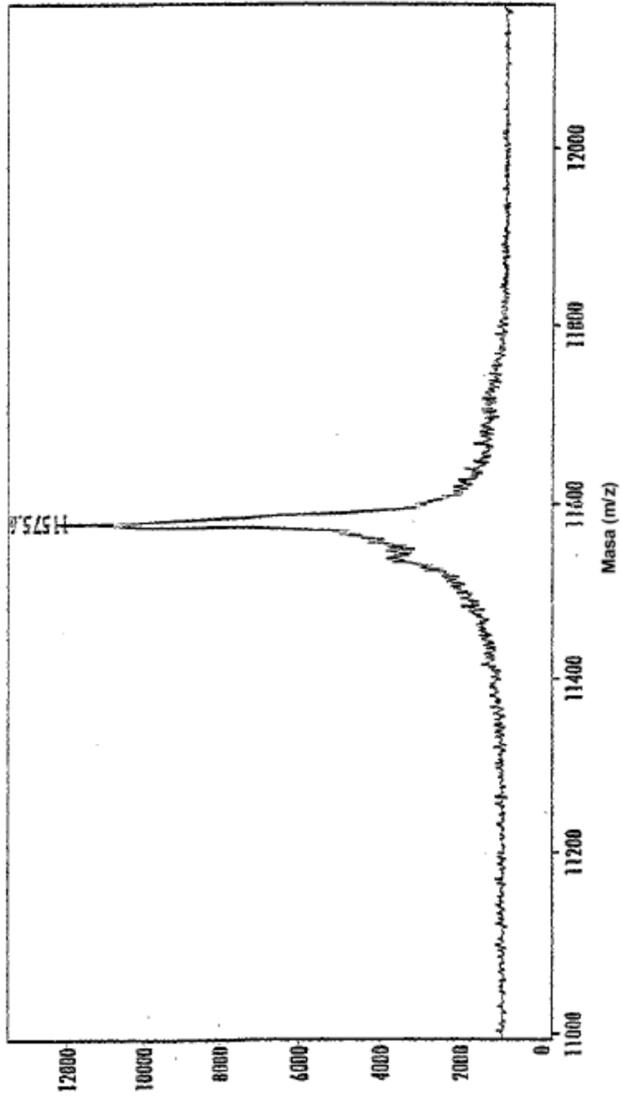


Figura 3

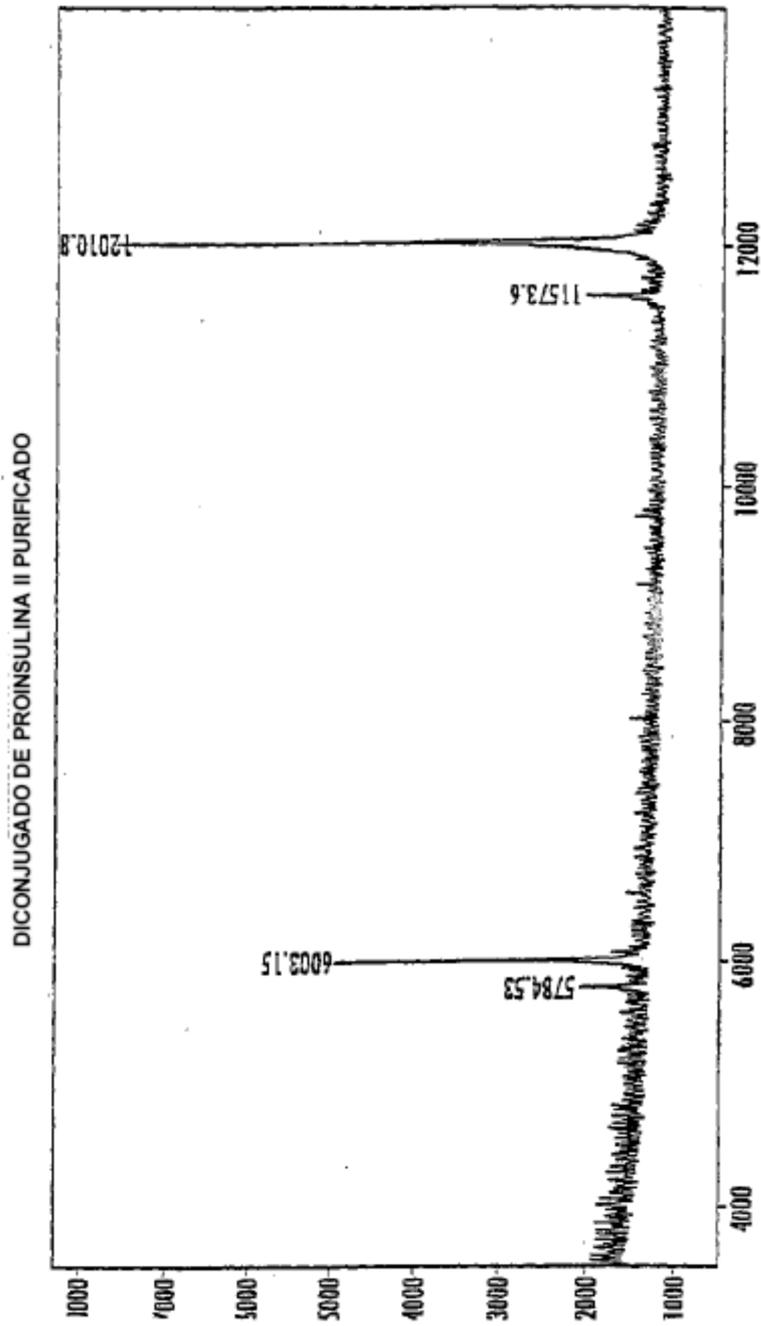


Figura 4

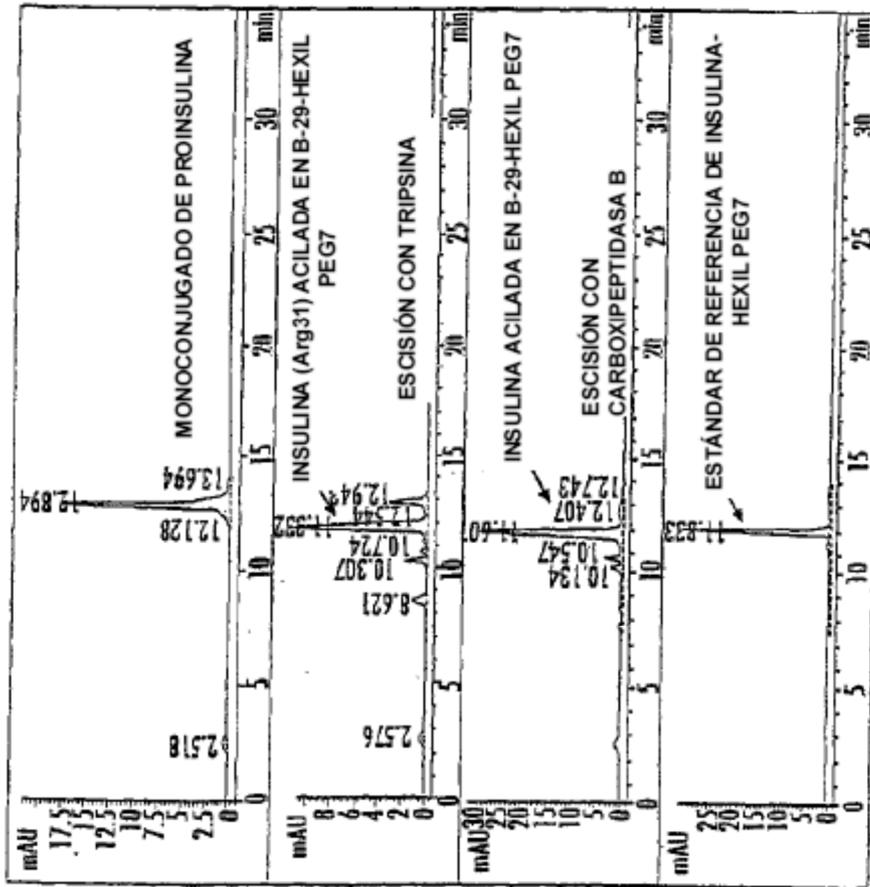


Figura 5

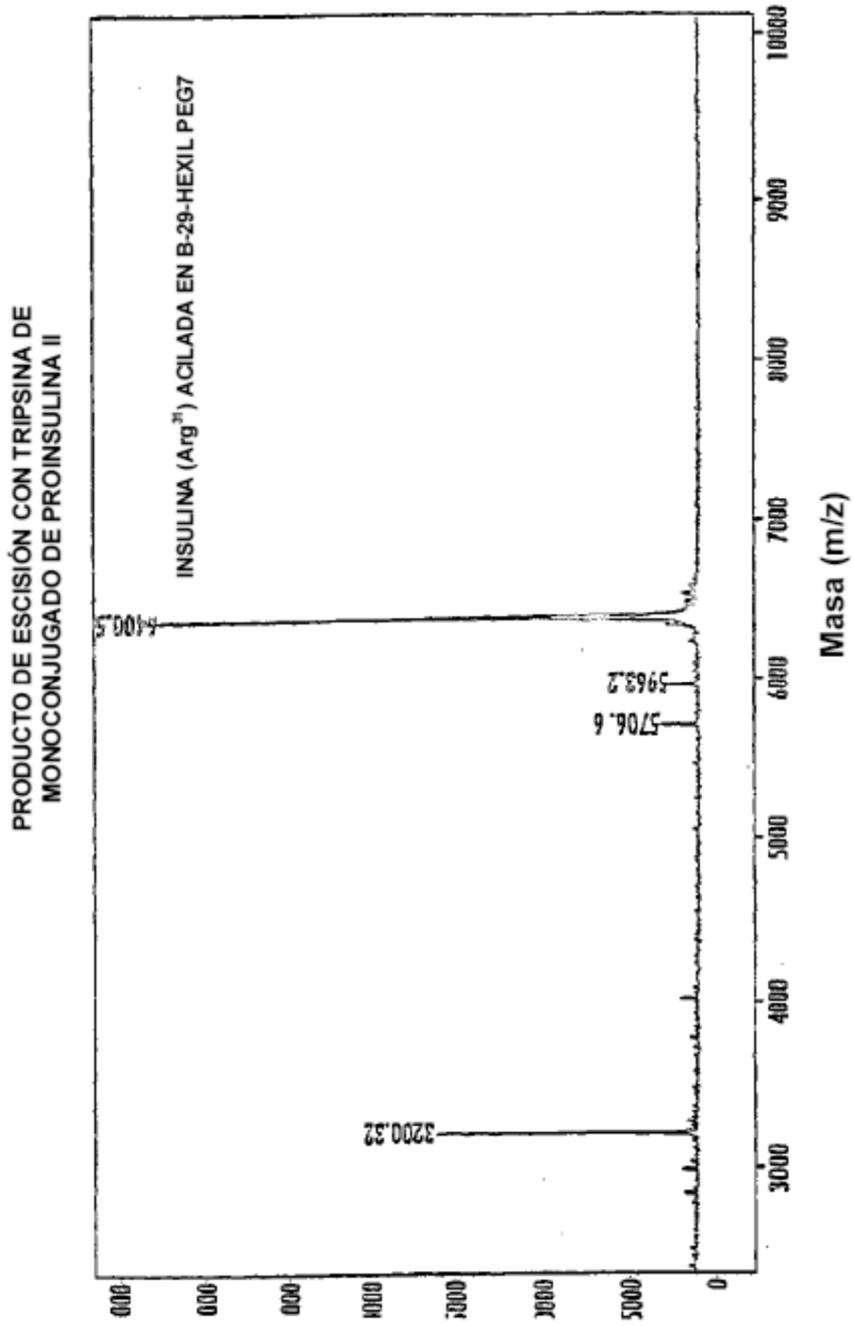


Figura 6

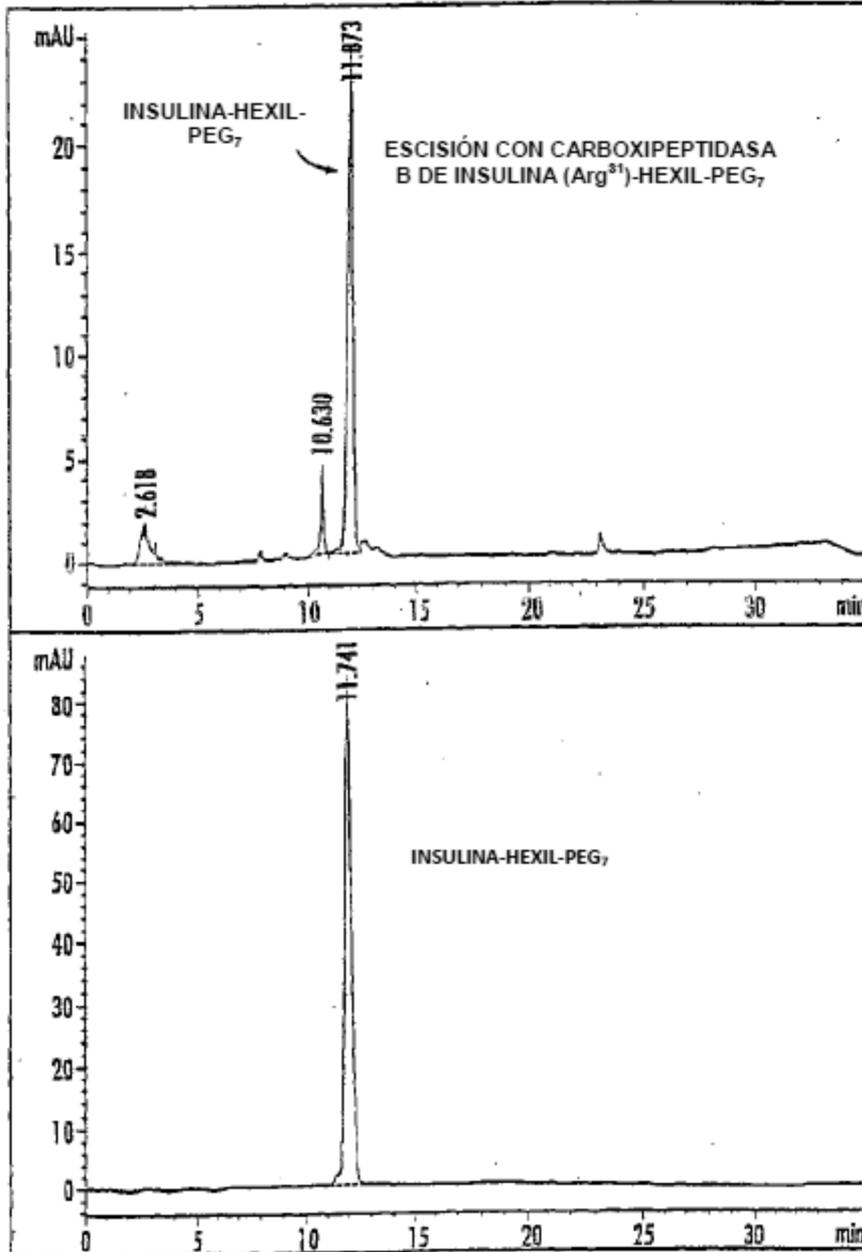


Figura 7

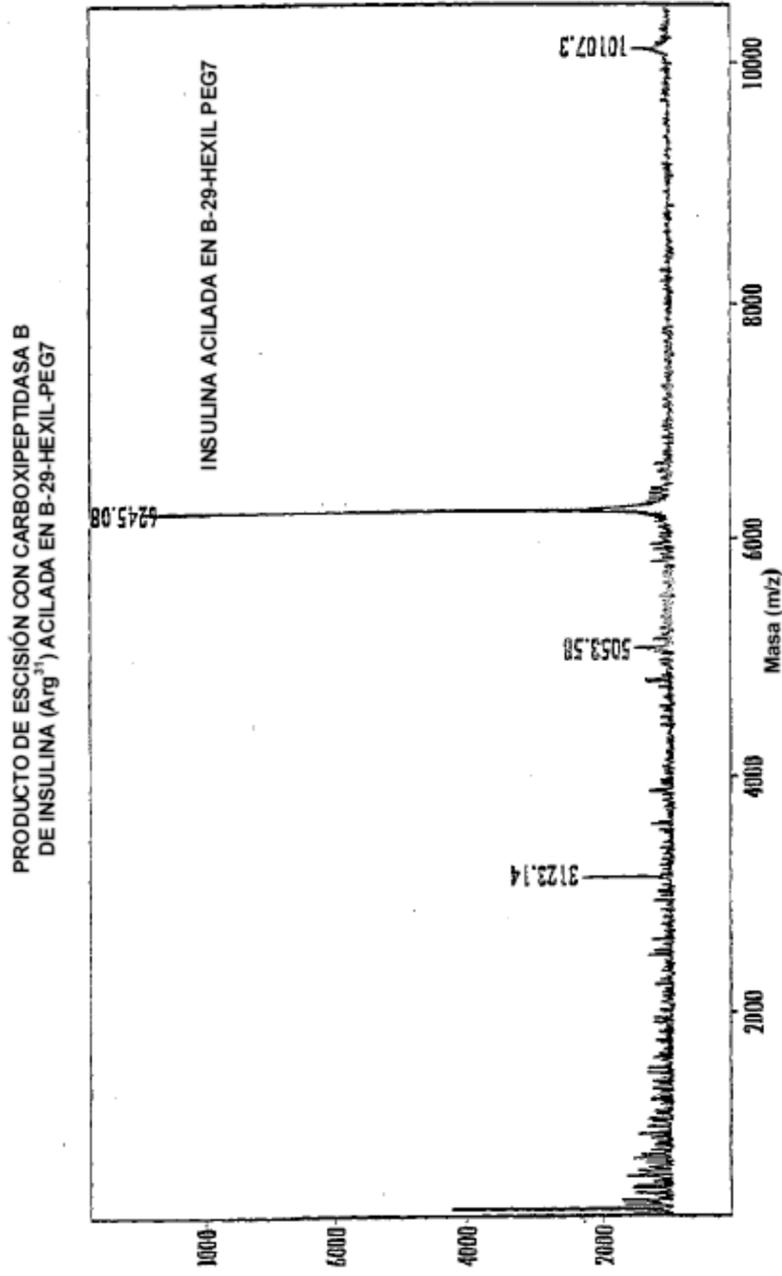


Figura 8

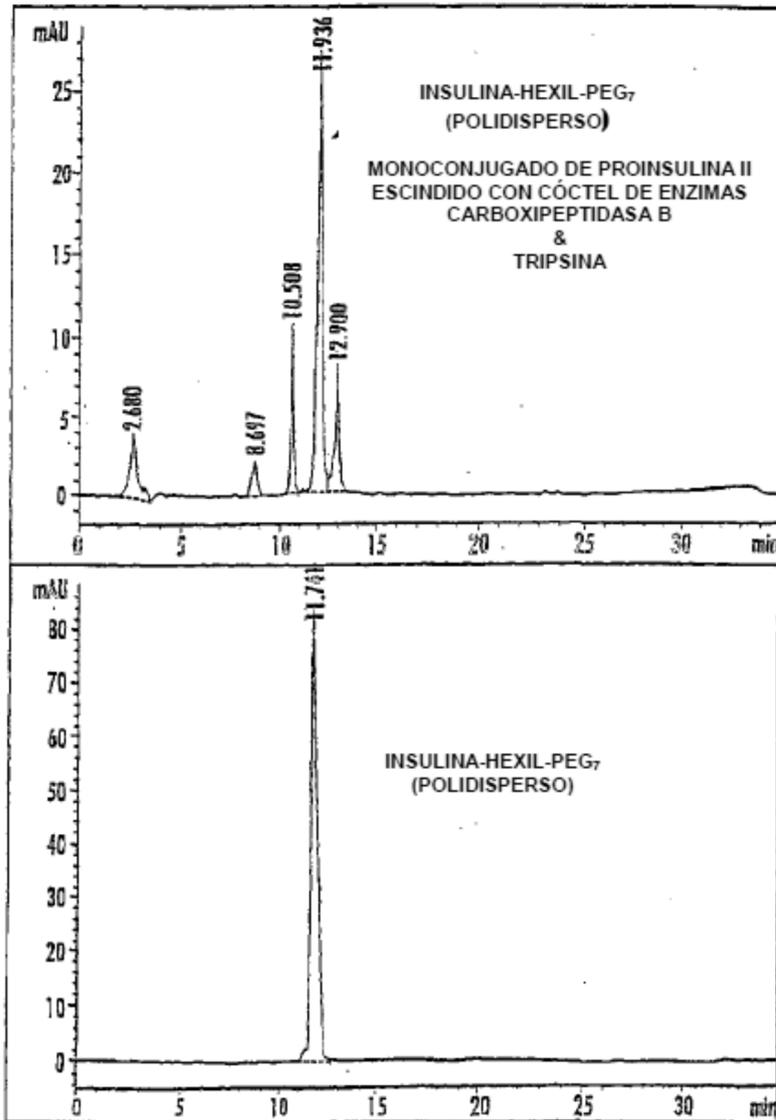


Figura 9

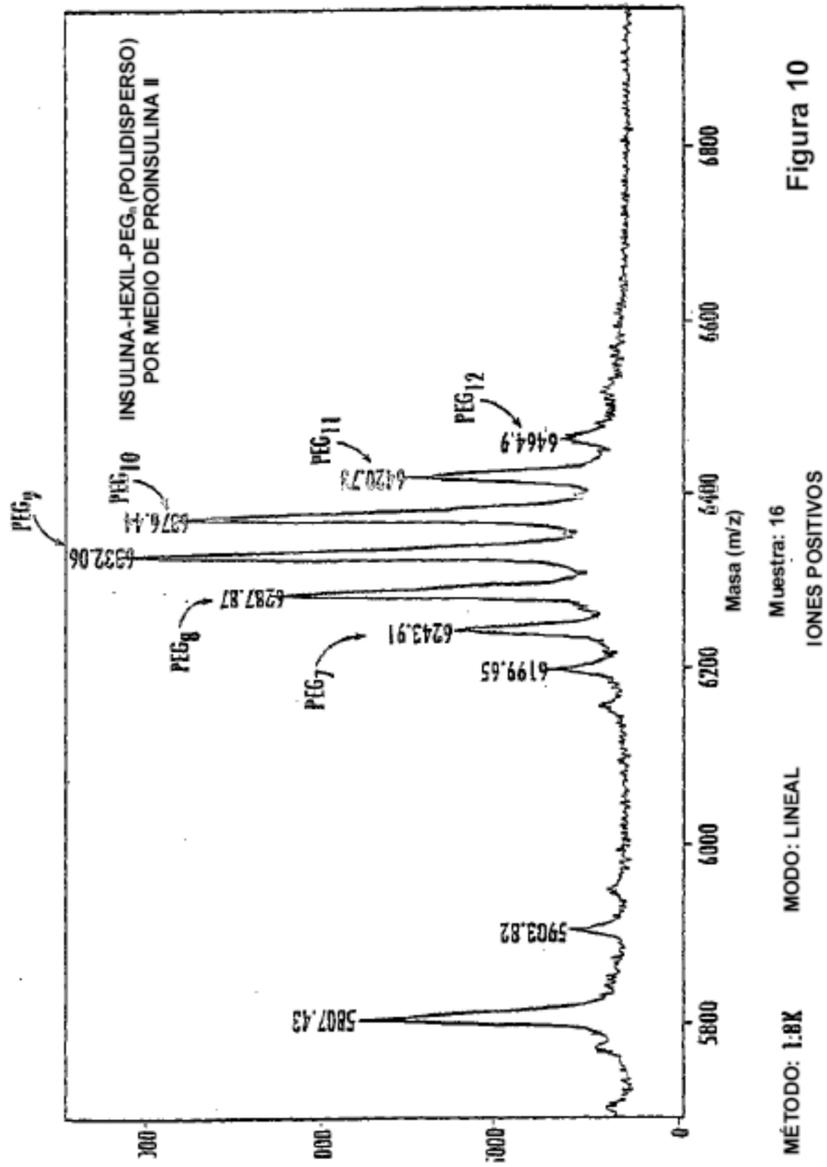


Figura 10

PERFIL DE HPLC DE LA PRODUCCIÓN DE
INSULINA ACILADA EN B-29-HEXIL-PEG7 POR
MEDIO DE PROINSULINA
CROMATOGRAMA(S)



Figura 11

ESPECTRO DE MASA DE INSULINA
ACILADA EN B-29-HEXIL PEG7 POR MEDIO
DE PROINSULINA I

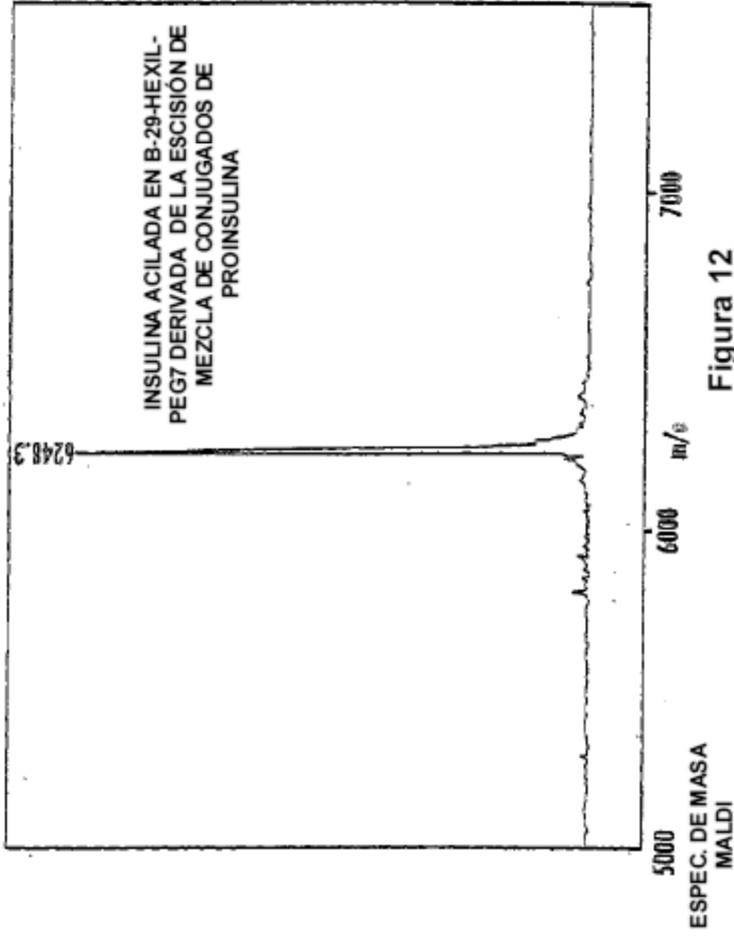


Figura 12

ESPECTRO DE MASA DE INSULINA POR MEDIO
DE PROINSULINA I

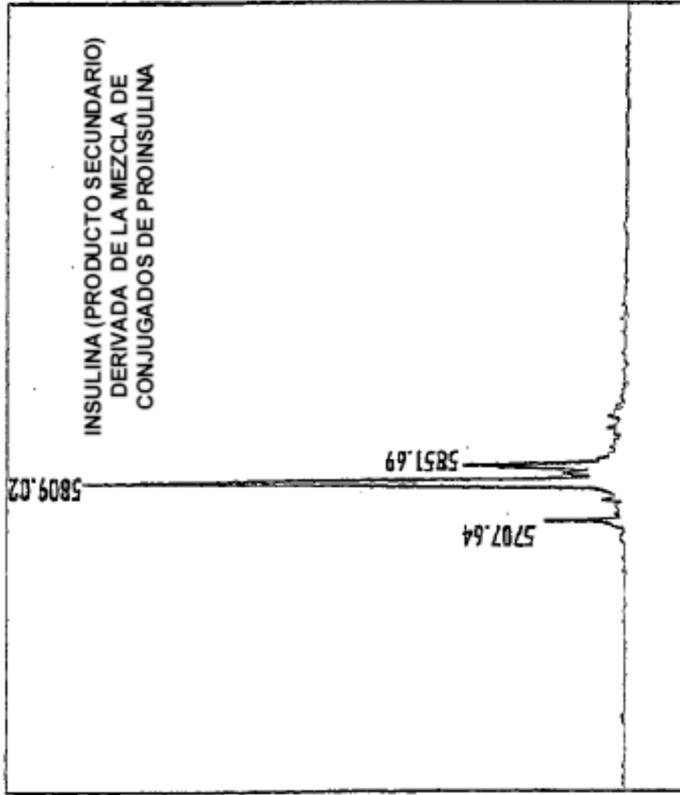


Figura 13

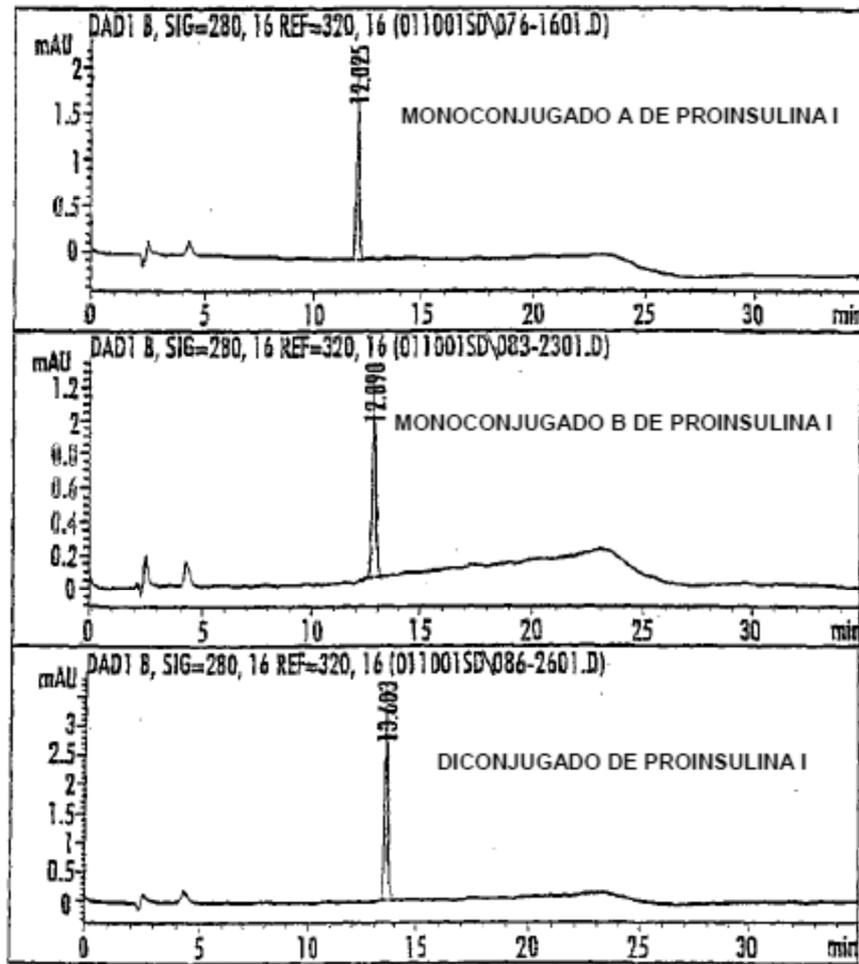


Figura 14

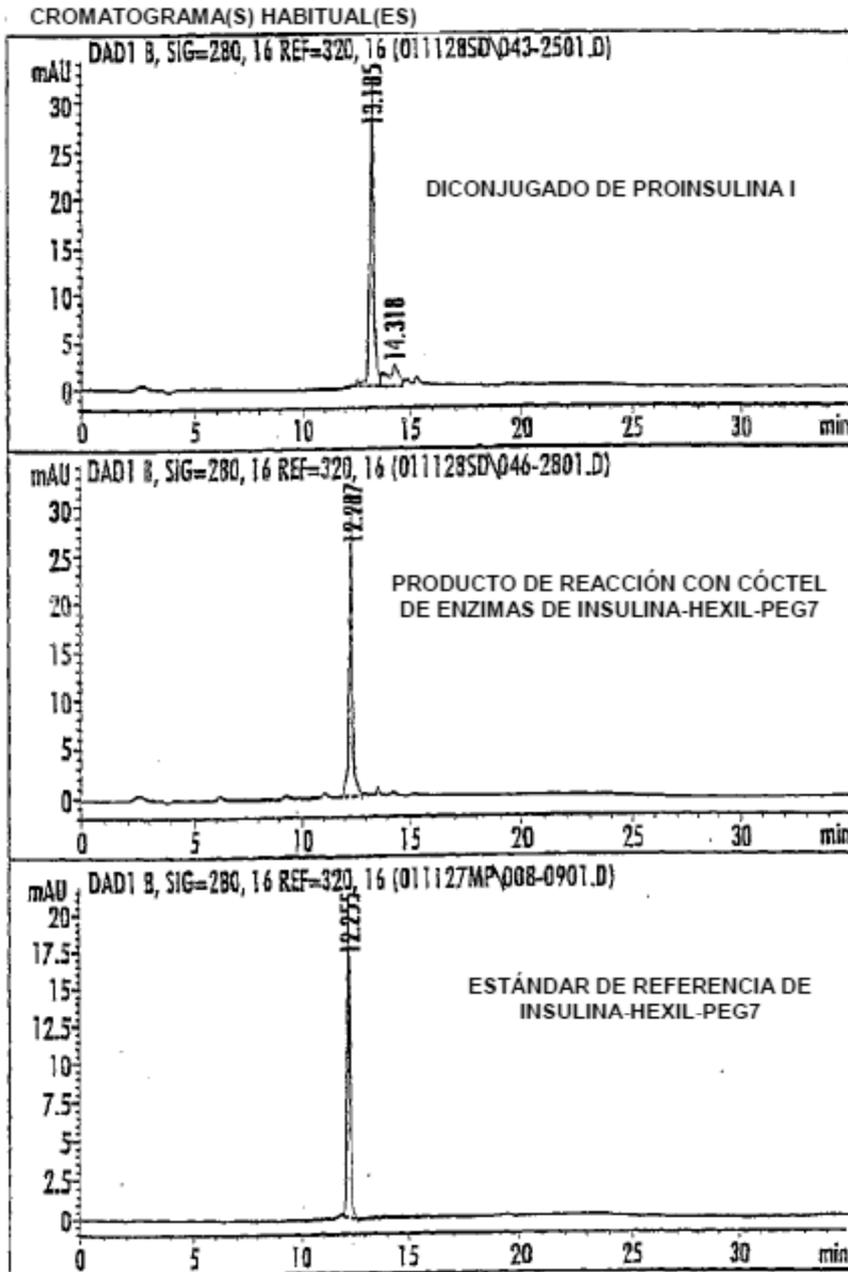


Figura 15

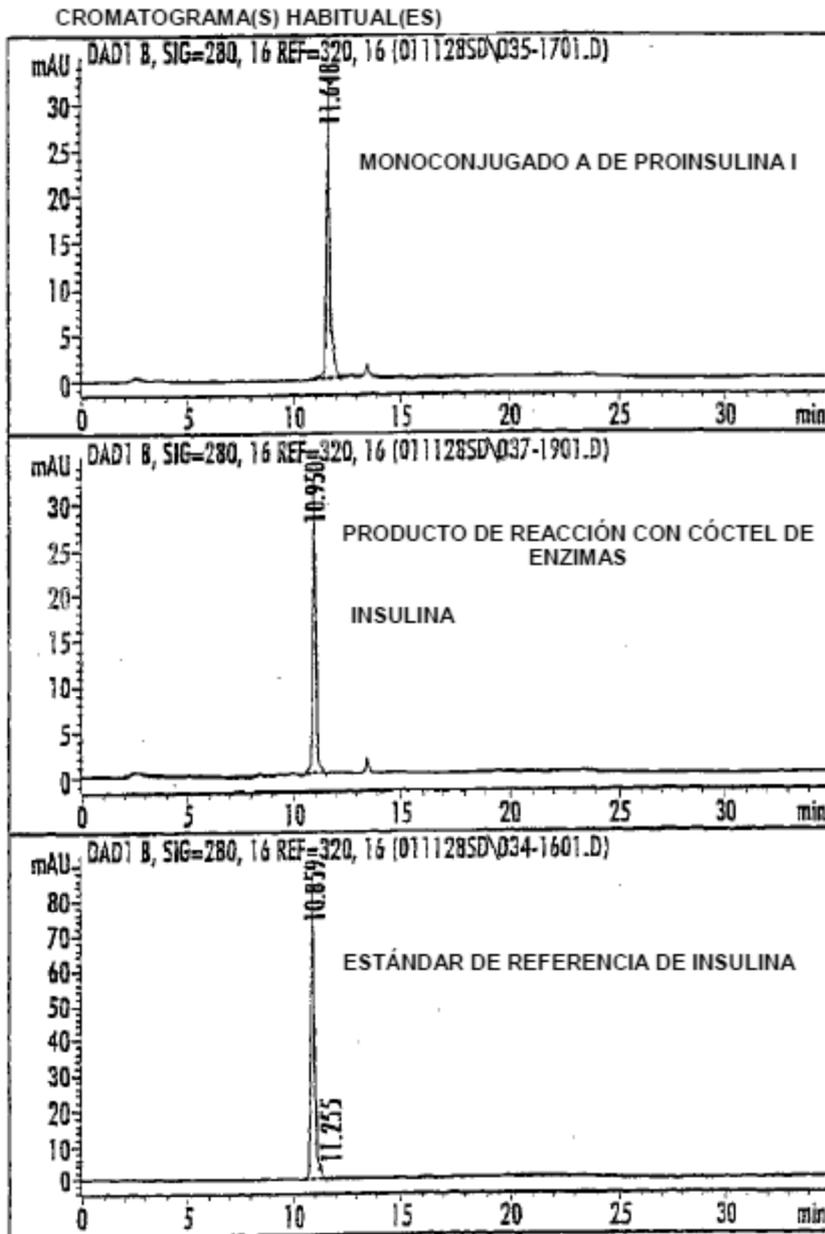


Figura 16

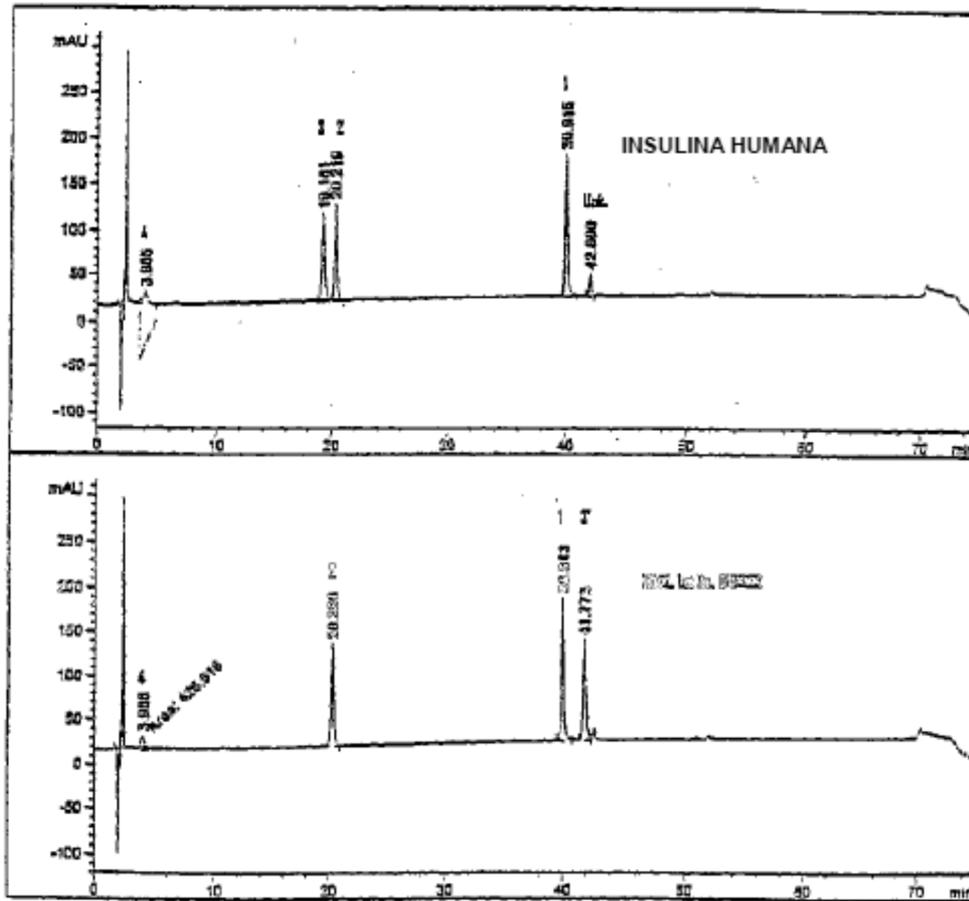


Figura 17a

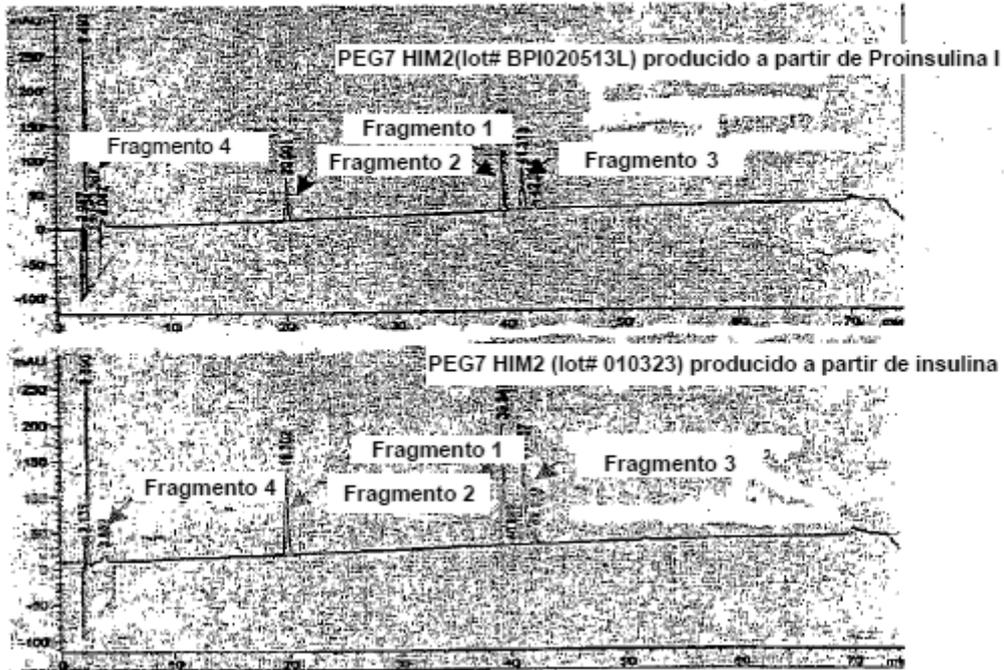


Figura 17b

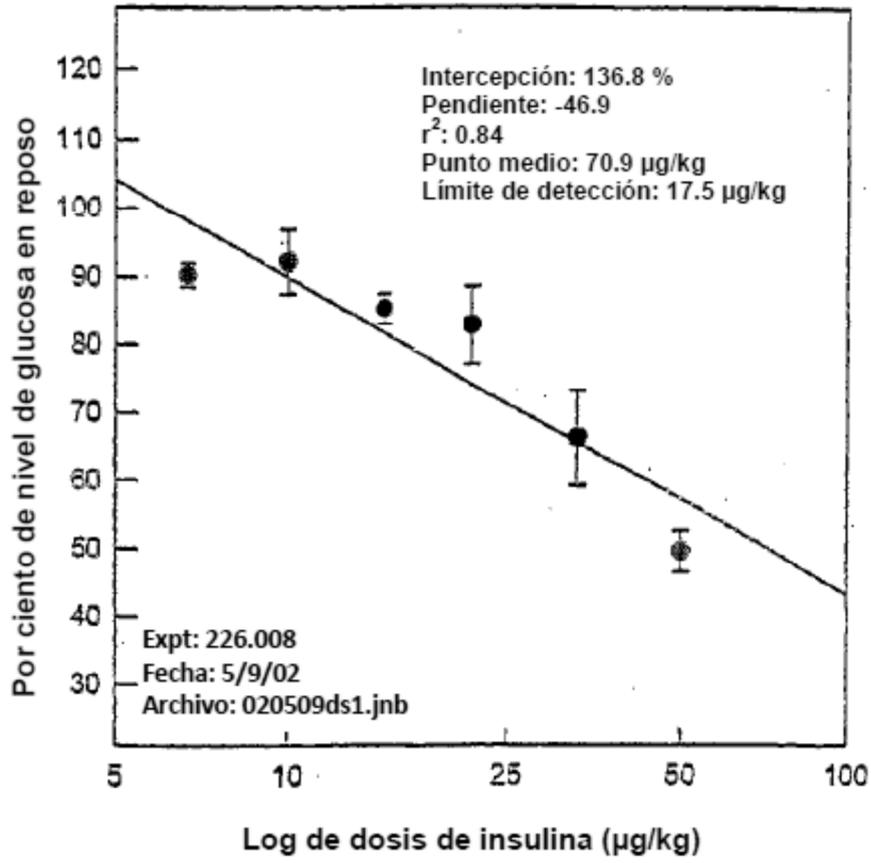


Figura 18a

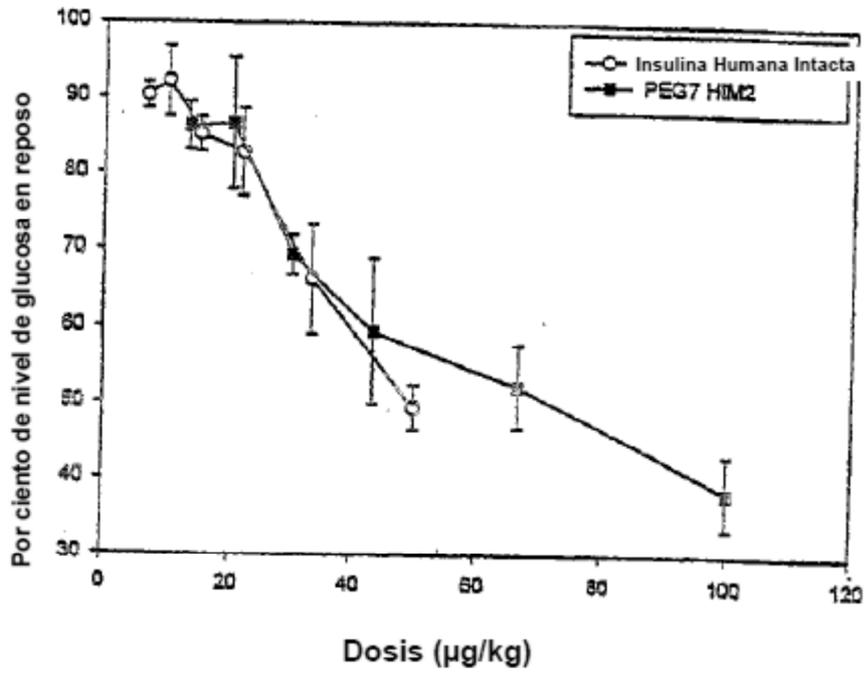


Figura 18b

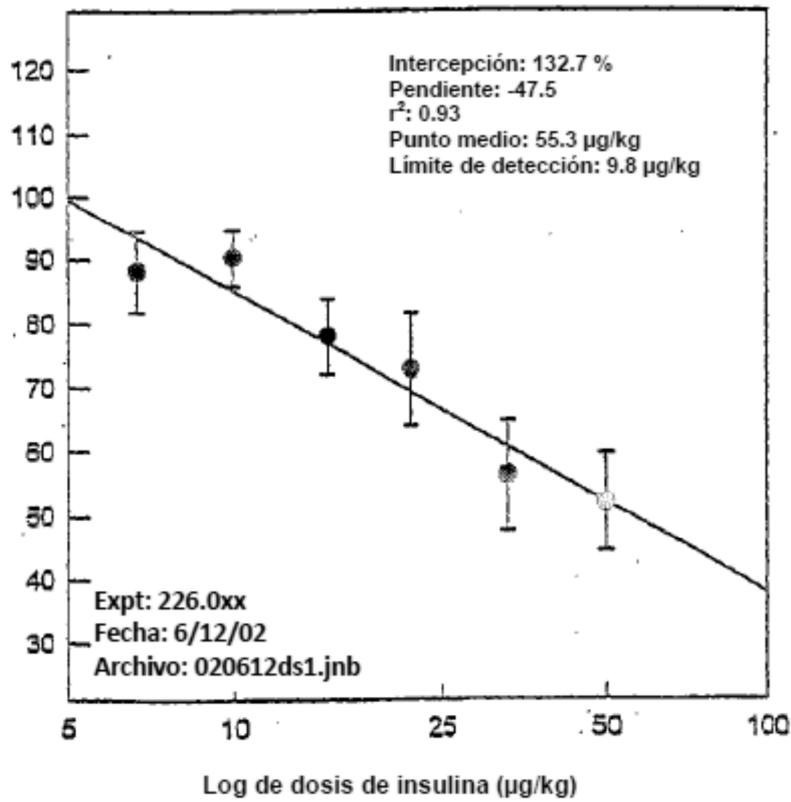


Figura 19a

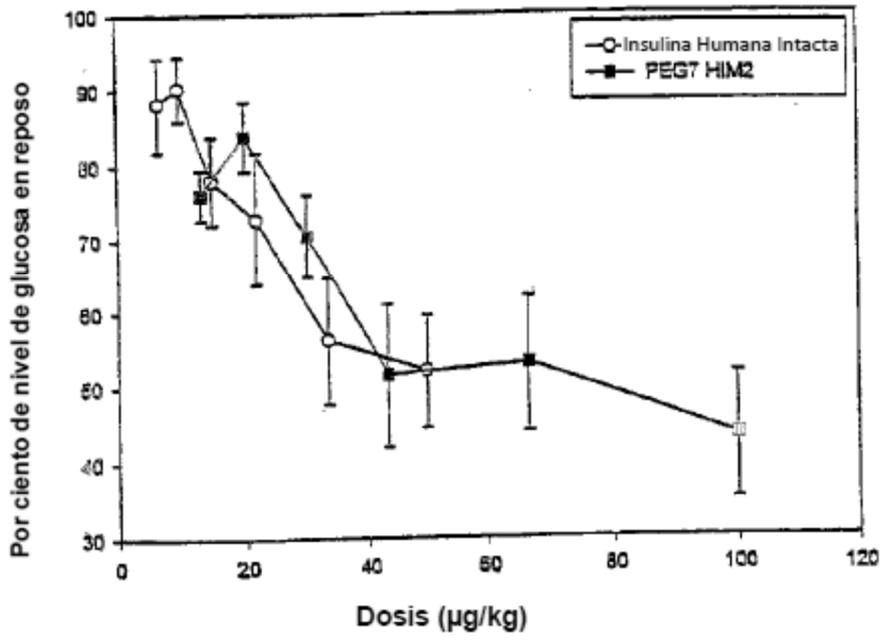


Figura 19b

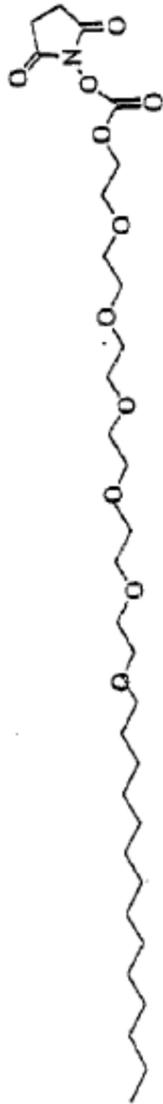


Figura 20

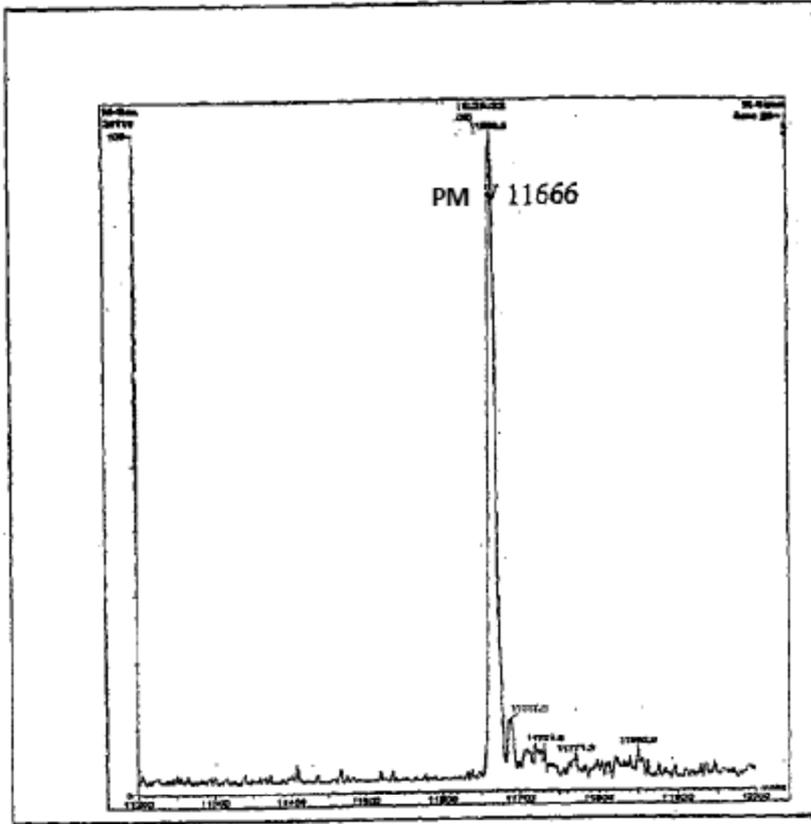


Figura 21

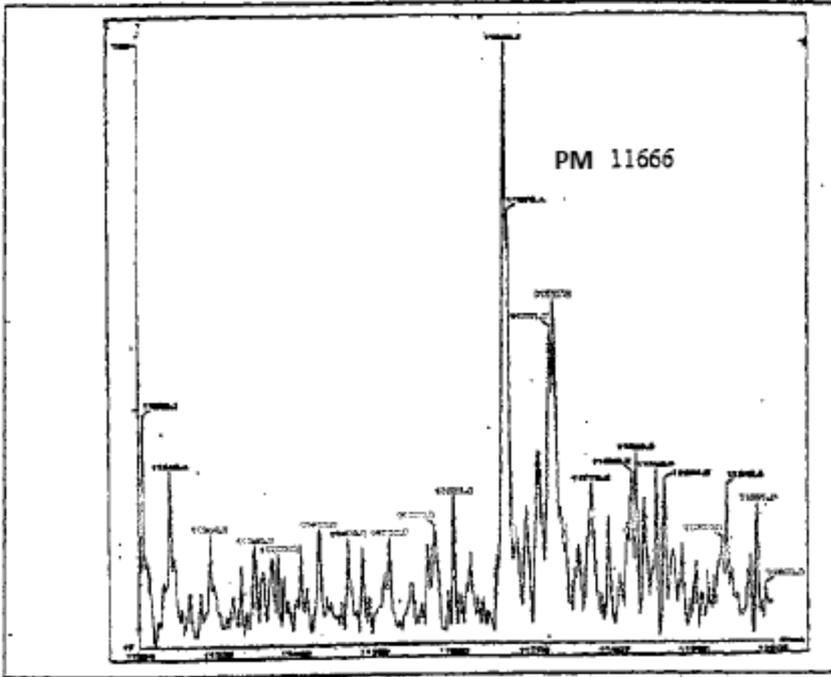


Figura 22

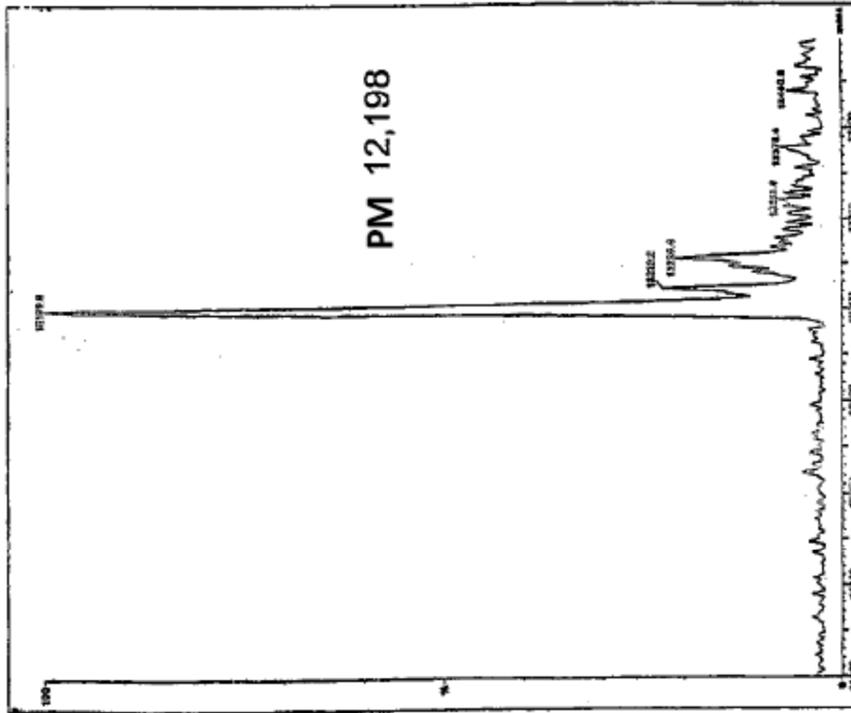


Figura 23

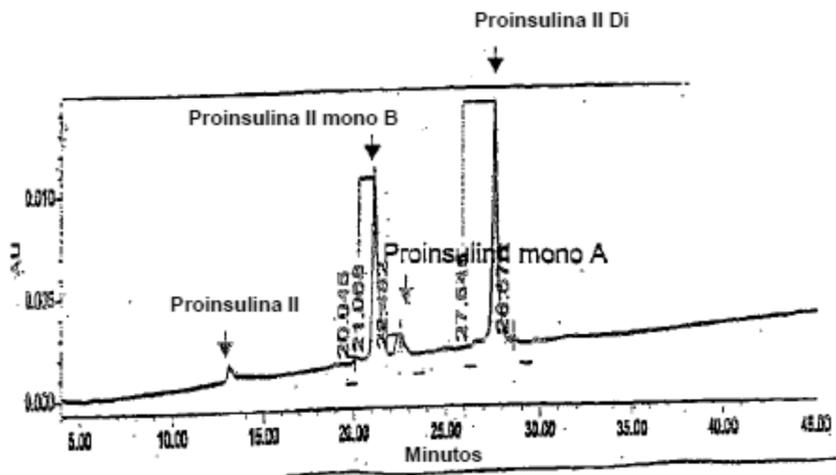


Figura 24

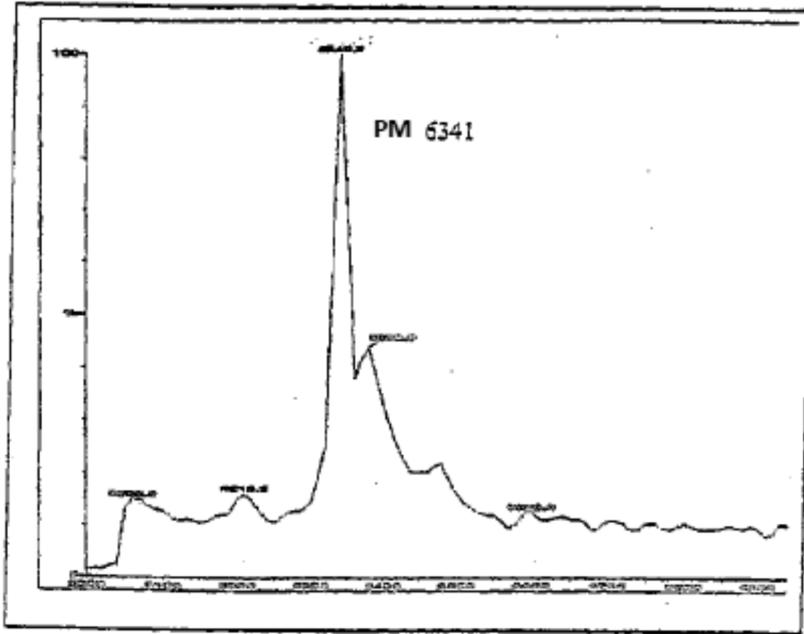


Figura 25

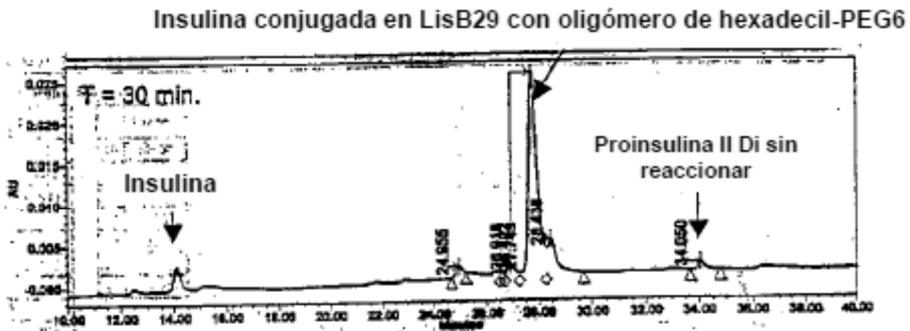


Figura 26

C16 PEG4



C16 PEG8

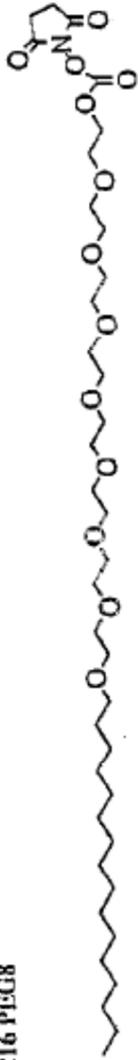


Figure 27

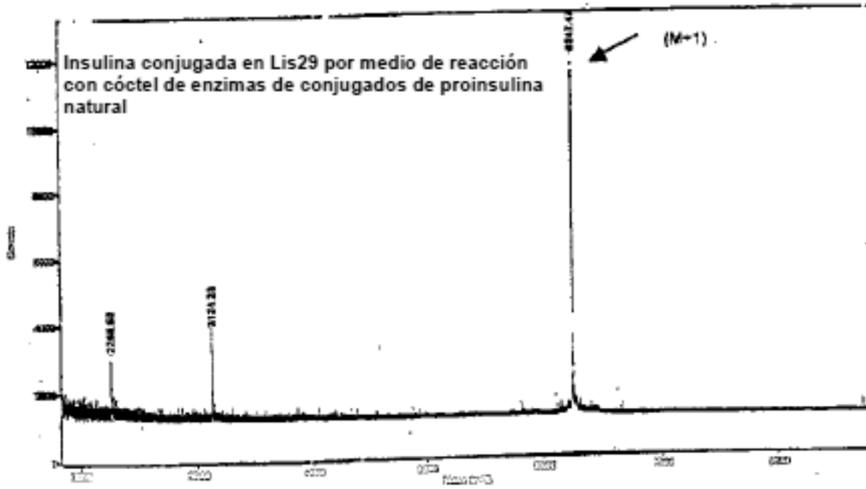


Figura 28

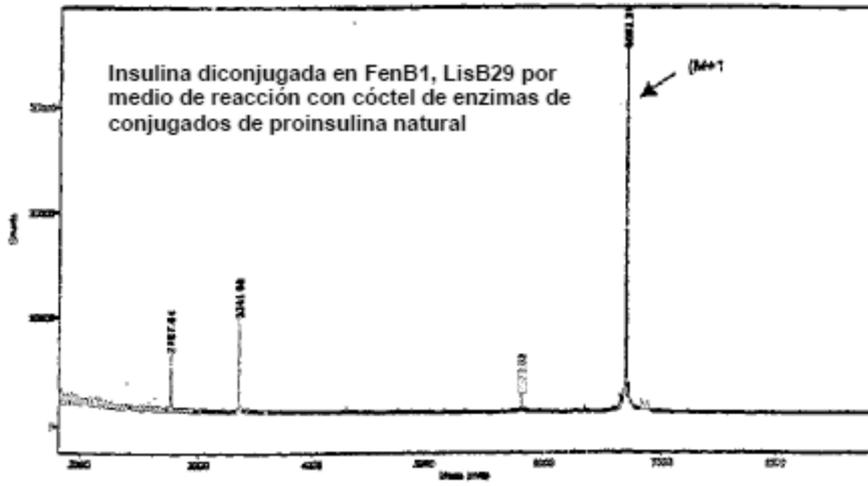


Figura 29

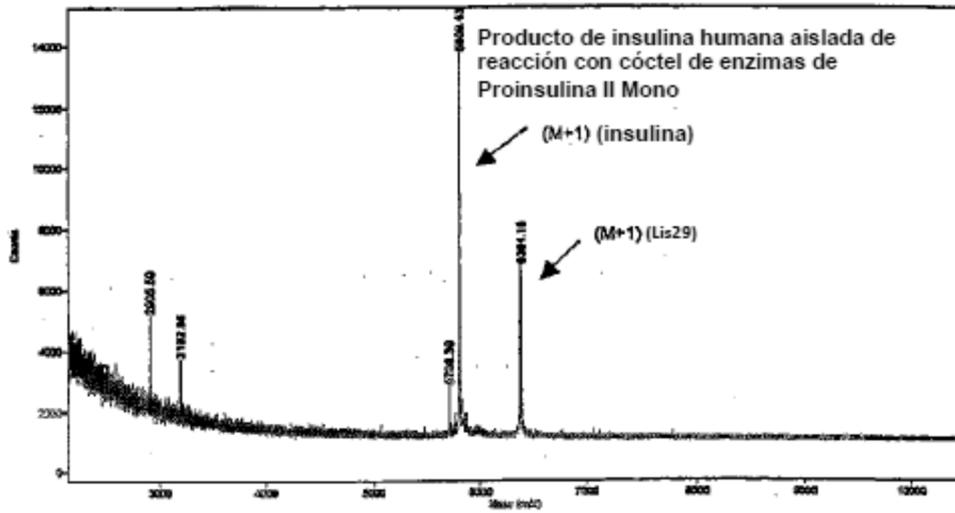


Figura 30

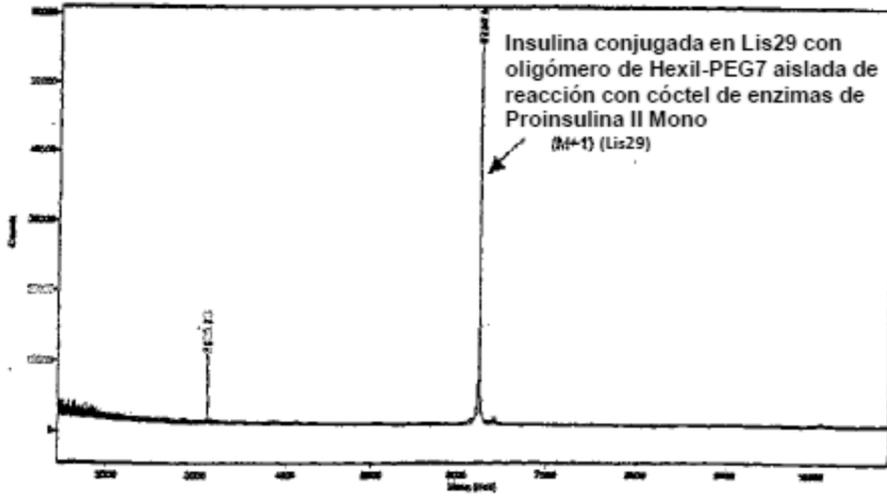


Figura 31

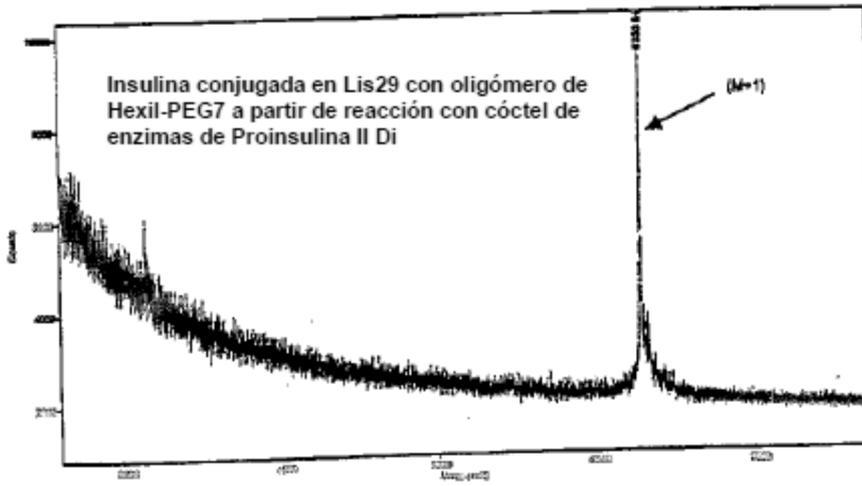
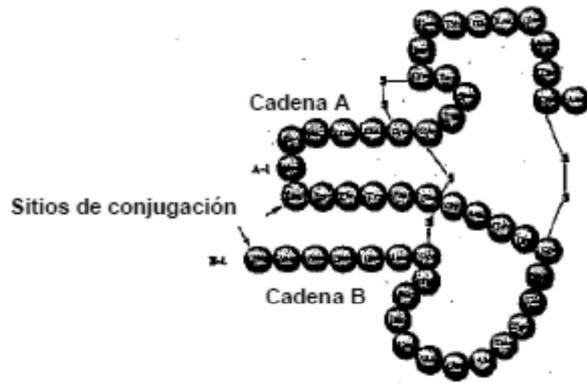


Figura 32



Estructura primaria de miniproinsulina (desTre)

Figura 33

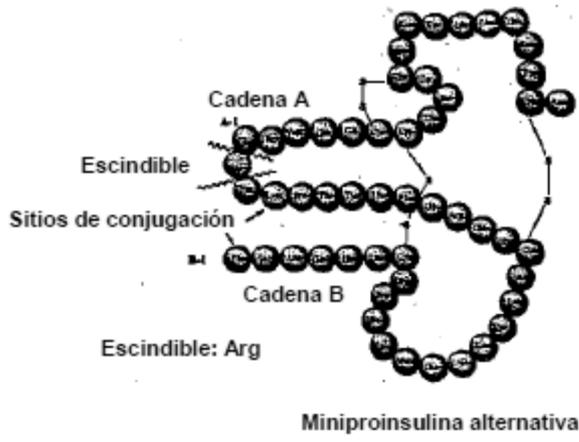


Figura 34

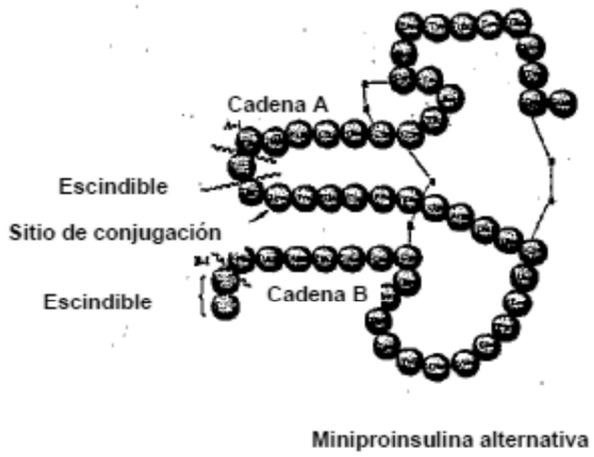


Figura 35

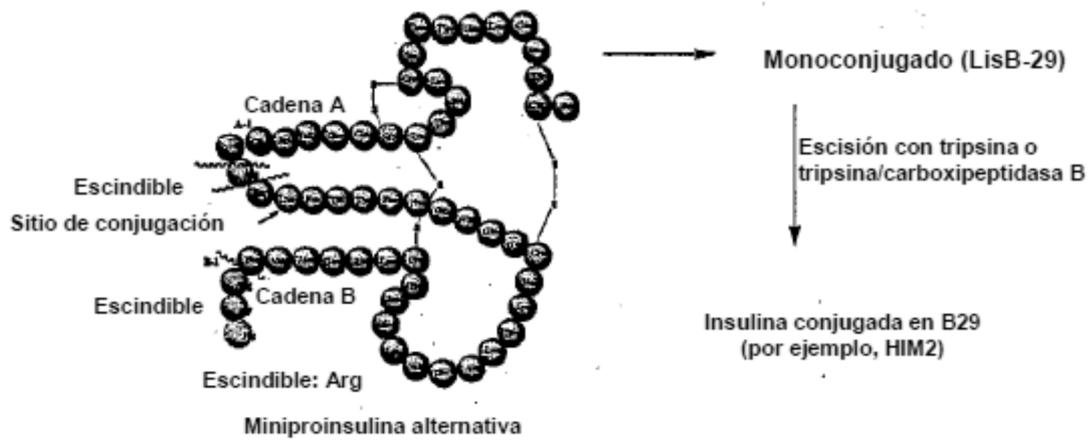


Figura 36

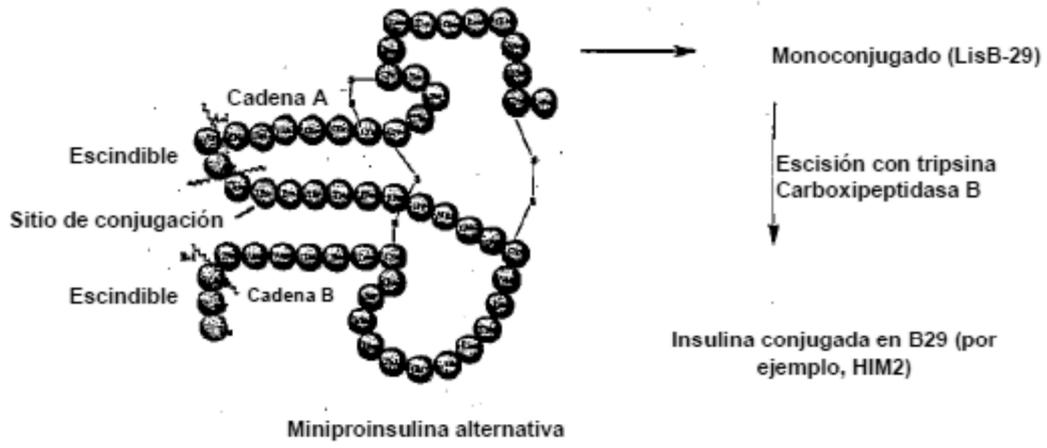


Figura 37