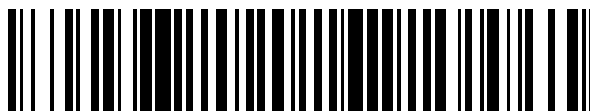


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 028**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2005 E 13166899 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2626368**

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

30 Prioridad:

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.06.2017**

73 Titular/es:

**BIOCON LIMITED (100.0%)**  
**20th K.M. Hosur Road, Electronic City P.O.**  
**Bangalore 560 100, IN**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 618 028 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Conjugados insulina-oligómero, formulaciones y usos de estos.

## 5 2 Campo

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

## 3 Antecedentes

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

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

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

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

## 4 Resumen de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

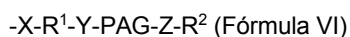
Cualquier asunto objeto identificado en la solicitud como "invención", "realización", "aspecto", etc., que exceda el alcance de la invención tal como se representa mediante las reivindicaciones, no forma parte de la invención reivindicada, sino que sólo sirve como información de antecedentes para comprender mejor la invención.

En general, la invención proporciona un complejo que incluye un conjugado de compuestos de insulina con un compuesto de insulina conjugado a una porción modificadora, y un catión, donde el conjugado de compuestos de insulina forma un complejo con el catión. El compuesto de insulina puede ser, por ejemplo, una insulina nativa, o un análogo de insulina. Ejemplos de compuestos de insulina incluyen insulina humana, insulina lispro, insulina des30, proinsulina nativa, proinsulina artificial, etc. El componente catión puede ser, por ejemplo, un catión metálico divalente seleccionado del grupo que consiste de Zn<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>, Ni<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>.

La porción modificadora se puede seleccionar para hacer al conjugado de compuesto de insulina más, menos o igualmente soluble en comparación al compuesto de insulina correspondiente no conjugado. La porción modificadora se selecciona preferiblemente para hacer al conjugado de compuesto de insulina al menos 1.05, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, o 15 veces más soluble que el compuesto de insulina correspondiente no conjugado en una solución acuosa a un pH de aproximadamente 7.4.

Preferiblemente la porción modificadora se selecciona para rendir un conjugado de compuesto de insulina que tenga una solubilidad acuosa que exceda aproximadamente 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L, 50 g/L, 75 g/L, 100 g/L, 125 g/L, o 150 g/L a un pH de aproximadamente 7.4. Más aun, la porción modificadora se selecciona para hacer al conjugado de compuesto de insulina igualmente o más soluble que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado, y la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición de zinc. En otra realización, la porción modificadora se selecciona para hacer al conjugado de compuesto de insulina igualmente o más soluble que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado; la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición de zinc; y la solubilidad en agua del complejo es mayor que la solubilidad en agua del compuesto de insulina. Aún en otra realización, la lipofilidad relativa del conjugado de compuesto de insulina en comparación con el compuesto de insulina parental correspondiente ( $k_{rel}$ ) es 1 o menos que 1.

La invención también proporciona novedosos conjugados de compuesto de insulina que tienen un compuesto de insulina conjugado con una porción modificador. Por ejemplo, la invención proporciona compuestos de insulina acoplados a una porción modificadora que tiene una fórmula:



dónde,

X, Y y Z son grupos de enlace seleccionados independientemente y cada uno está opcionalmente presente, y X, cuando está presente, se acopla al compuesto de insulina por un enlace covalente,

al menos uno de  $R^1$  y  $R^2$  está presente y es alquilo inferior y puede incluir opcionalmente un grupo carbonilo,  $R^2$  es un grupo de cubrimiento, tal como  $-CH_3$ ,  $-H$ , tosilato, o un grupo activante, y

PAG es una cadena de carbono lineal o ramificada que incorpora una o más porciones de alcalenglicol (es decir, porciones de oxialcaleno), y opcionalmente que incorpora una o más porciones adicionales seleccionadas del grupo que consiste de  $-S-$ ,  $-O-$ ,  $-N-$  y  $-C(O)-$ , y

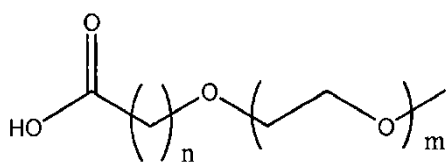
donde la porción modificadora tiene un número máximo de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 átomos pesados.

En realizaciones de la invención, uno o más de X, Y y Z pueden estar ausentes. Además, cuando están presentes, X, Y y/o Z pueden seleccionarse independientemente de  $-C(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C-$  y  $-N-$ . En una realización, Z es  $-C(O)-$ . En otra realización, Z no está presente.

En algunas realizaciones,  $R^1$  es alquilo inferior, y  $R^2$  no está presente. En otras realizaciones,  $R^2$  es alquilo inferior, y  $R^1$  no está presente.

En otra realización, la porción modificadora puede incluir una porción de cadena de carbono lineal o ramificada sustituida que tiene un esqueleto de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 átomos seleccionados del grupo que consiste de  $-C$ ,  $-C-$ ,  $-O-$ ,  $=O$ ,  $-S-$ ,  $-N-$ ,  $-Si-$ . Los átomos pesados incluirán típicamente uno o más átomos de carbono y uno o más átomos pesados no carbono seleccionados del grupo que consiste de  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-N-$ , y  $=O$ . Los átomos de carbono y los átomos pesados no carbonos están típicamente presentes en una relación de al menos 1 átomo de carbono por cada átomo pesado no carbono, preferiblemente al menos 2 átomos de carbono por cada átomo pesado no carbono, más preferiblemente al menos 3 átomos de carbono por cada átomo pesado no carbono. Los átomos de carbono y átomos de oxígeno están típicamente presentes en una relación de al menos 1 átomo de carbono por cada átomo de oxígeno, preferiblemente por lo menos 2 átomos de carbono por cada átomo de oxígeno, más preferiblemente por lo menos 3 átomos de carbono por cada átomo de oxígeno. La porción modificadora puede incluir uno o más grupos de cubrimiento, tales como grupos ramificados o lineales de alquilo  $C_{1-6}$  ramificado o lineal, o un grupo carbonilo. La porción modificadora incluirá típicamente hidrógenos, y uno o más de los hidrógenos pueden ser sustituidos con un flúor (que es un átomo pesado pero no debe contarse como un átomo pesado en la fórmula anterior). La porción modificadora puede excluir en algunos casos, en particular, porciones alquilo no sustituidas. La porción modificadora puede estar acoplado, por ejemplo, a un grupo disponible en un aminoácido, tal como un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo ácido carboxílico libre, el polipéptido, por ejemplo, por un grupo de enlace, tal como un carbamato, carbonato, éter, éster, amida o grupo amina secundario, o mediante un enlace disulfuro. Las moléculas en el grupo de enlace se cuentan como parte de la porción modificadora. En una realización preferida, el peso molecular de la porción modificadora es menor que el peso molecular de la porción modificadora de HIM2.

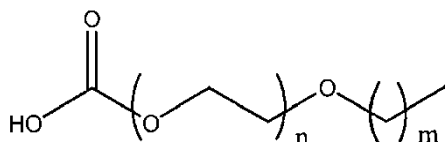
La invención incluye conjugados de compuesto de insulina que tienen porciones modificadoras con una fórmula:



(Fórmula VII)

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

5



(Fórmula VIII)

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

10 Se apreciará que las novedosas porciones modificadoras, así como el uso de tales porciones para modificar la insulina y otros polipéptidos, son por sí mismos aspectos de la invención.

15 La invención también proporciona novedosas formulaciones que incluyen los conjugados de compuesto de insulina y/o conjugados de compuesto de catión-insulina de la invención. Los inventores han descubierto sorprendentemente que ciertas composiciones de ácidos grasos son particularmente útiles, especialmente para la administración oral de los polipéptidos y conjugados de polipéptidos, tales como insulina y conjugados compuestos de insulina y/o administración oral de los complejos conjugados compuestos catión-insulina de la invención. En un aspecto, la invención proporciona composiciones de ácidos grasos con uno o más ácidos grasos C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub> o C<sub>10</sub> saturados o insaturados y/o sales de tales ácidos grasos. Los ácidos grasos preferidos son los ácidos caprílico, cáprico, mirístico y láurico. Las sales de ácidos grasos preferidas son sales de sodio de ácido caprílico, cáprico, mirístico y láurico. El contenido en ácidos grasos de la composición está típicamente dentro de un rango que tiene como un límite inferior de aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, o 3.0 % de p/p, y que tiene como límite superior de aproximadamente 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10.0, 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9, 11.0, 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5, 11.6, 11.7, 11.8, 11.9, o 12.0 % de p/p. En aún otra realización, el contenido de ácidos grasos de la composición está dentro de un rango que tiene como límite inferior aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, o 3.0 % de p/p, y que tiene como límite superior de aproximadamente 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10.0, 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9, 11.0, 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5, 11.6, 11.7, 11.8, 11.9, o 12.0 % de p/p, y el contenido de ácidos grasos de la composición es típicamente mayor que aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, o 99.9% de p/p de un solo ácido graso, preferiblemente caprílico, caprico, mirístico o láurico, o una sal del mismo.

40 La invención también proporciona un método para tratar las deficiencias de insulina o complementar de otro modo la insulina en un sujeto usando los conjugados de compuesto de insulina, complejos de conjugado de compuesto de catión-insulina y/o formulaciones de la invención. Los métodos incluyen generalmente la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los conjugados de compuesto de insulina, complejos de conjugado de compuesto de catión-insulina y/o formulaciones de la invención a un sujeto que lo necesite.

45 5 Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1-15B muestran fotomicrografías de diversos sólidos cristalinos de la invención. Las Figuras 1 y 2 son fotomicrografías tomadas por medio del uso de un microscopio Zeiss Axiovert que muestra complejos de Zn de tipo T de HIM2 a 30 g/L de concentración, los cristales crecieron por 24 horas. La Figura 3 es una fotomicrografía tomada por medio del uso de un microscopio Zeiss Axiovert que muestra complejos de Zn de tipo T de HIM2 a 30 g/L de concentración, cristales crecidos por 5 días. Las Figura 4 es una fotomicrografía tomada por medio del uso de un microscopio Zeiss Axiovert que muestra complejos de Zn de tipo R de HIM2 a 30 g/L cristales crecidos por 4 días. La Figura 5 muestra fotomicrografía de complejos de Zn de tipo R de IN105 que contiene 30% orgánico. Las Figuras 6A-10B muestran fotomicrografías de diversos complejos de Zn de tipo R de HIM2 fabricados por medio del uso de

disolvente orgánico. Las Figuras 11A-14B muestran fotomicrografías de cristales de diversos complejos de Zn de tipo R co-cristalizados de H1M2 y IN105. Las Figuras 15A-15B muestran fotomicrografías de cristales de varios complejos de Zn de tipo R co-cristalizados de H1M2 e insulina humana. La invención incluye cristales que tienen las morfologías mostradas en cualquiera de las Figuras 1-15B.

5 Las Figuras 16-20 muestran los resultados del ensayo de glucosa en sangre de ratón para HIM2 y diversos complejos Zn-HIM2. La Figura 16 muestra perfiles de biopotencia de MBGA para HIM2. La Figura 17 muestra perfiles de biopotencia de MBGA para el producto de compuesto de insulina Zn HIM2 de tipo R. La Figura 18 muestra perfiles de biopotencia de MBGA para el producto de compuesto de insulina Zn HIM2 de tipo T. La Figura 20 muestra perfiles de biopotencia de MBGA para el producto de compuesto de insulina Zn HIM2 con protamina. La Figura 20 muestra los efectos de disminución de glucosa de los complejos de protamina de tipo R a los 30 y 90 minutos después de la dosis. Las Figuras 21-24 muestran los perfiles de biopotencia de MBGA para IN-186, IN-192, IN-190, IN-191, IN-189, IN-178, IN-193, IN-194, IN-185, IN-196 e IN-197.

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

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

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

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

## 6 Definiciones

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

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

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

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

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

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

*anfifilica*" significa una porción que es anfifilica y/o que, cuando se une a un fármaco polipéptido o no-polipéptido, aumenta la anfifilicidad (es decir, aumenta ambas la hidrofiliicidad y la lipofiliicidad) del conjugado resultante, por ejemplo, ciertas porciones modificadoras PEG-ácido graso, y porciones modificadoras azúcar-ácido graso.

5 *"Alquilo inferior"* significa porciones alquilo sustituidas o no sustituidas, lineales o ramificadas que tienen de uno a seis átomos de carbono, es decir, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> o C<sub>6</sub>. *"Alquilo superior"* significa porciones alquilo sustituidas o no sustituidas, lineales o ramificadas que tienen seis o más átomos de carbono, por ejemplo, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>19</sub>, C<sub>20</sub>, etc.

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

25 *"Compuesto de insulina nativa"* como se usa especialmente en la presente descripción significa compuesto de insulina de mamífero (por ejemplo, insulina humana, compuesto de insulina bovina, compuesto de insulina porcina o compuesto de insulina de ballena), proporcionada de fuentes naturales, sintéticas, o diseñada mediante ingeniería genética. La insulina humana está compuesta por una cadena A de veintiún amino ácidos y una cadena B de treinta amino ácidos que se entrecruzan por puentes disulfuro. Una insulina humana correctamente entrecruzada incluye tres puentes disulfuro: uno entre A7 y B7, un segundo entre A20 y B19, y un tercero entre A6 y A11. La insulina humana posee tres grupos amino libres: B1-fenilalanina, A1-glicina, y B29-lisina. Los grupos amino libres en las posiciones A1 y B1 son grupos  $\alpha$ -amino. El grupo amino libre en la posición B29 es un grupo  $\epsilon$ -amino. *"Análogo de la insulina"* significa un polipéptido que exhibe alguna, toda o aumentada actividad relativa a una insulina nativa correspondiente o que se convierte *in vivo* o *in vitro* en un polipéptido que exhibe alguna, toda o aumentada actividad relativa a la insulina nativa correspondiente, por ejemplo, un polipéptido que tiene la estructura de una insulina humana con una o más adiciones, deleciones y/o sustituciones conservativas de amino ácidos. Los análogos de la insulina pueden identificarse por medio del uso de técnicas conocidas, tales como aquellas descritas en la publicación de patente de los Estados Unidos Núm. 20030049654, "Automatización del diseño de proteínas para genotecas de proteínas," presentada el 18 de marzo de 40 2002 a nombre de Dahiyat y otros. Las proinsulinas, pre-proinsulinas, precursores de insulina, precursores de insulina de una sola cadena de humanos y animales no humanos y análogos de cualquiera de los anteriores se denominan en la presente descripción como análogos de la insulina, como son las insulinas de no-mamífero. Muchos análogos de la insulina se conocen en la materia (véase la discusión más abajo). A menos que el contexto específicamente lo indique de cualquier otra forma (por ejemplo, donde se hace referencia a una insulina específica, tal como la "insulina humana" o similares), el término *"compuesto de insulina"* se usa ampliamente para incluir insulinas nativas y análogos de la insulina.

50 *"Polialquilen glicol"* o PAG se refiere a polímeros de polialquilen glicol sustituidos o no sustituidos, lineales o ramificados tales como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG), y polibutilenglicol (PBG), y combinaciones de estos (por ejemplo, polímeros lineales o ramificados que incluyen combinaciones de dos o más subunidades de PAG diferentes, tales como dos o más subunidades de PAG diferentes seleccionadas de subunidades de PEG, PPG, PPG, y PBG), e incluye el monoalquiléter del polialquilen glicol. El término subunidad PAG significa una sola unidad PAG, por ejemplo, *"subunidad PEG"* se refiere a una sola unidad de polietilenglicol, por ejemplo,  $-(CH_2CH_2O)-$ , *"subunidad PPG"* se refiere a una sola unidad de polipropilenglicol, por ejemplo,  $-(CH_2CH_2CH_2O)-$ , y *"subunidad PBG"* se refiere a una sola unidad de polibutilenglicol, por ejemplo,  $-(CH_2CH_2CH_2CH_2O)-$ . Las subunidades PAGs y/o PAG además incluyen subunidades PAGs o PAG sustituidas, por ejemplo, PAGs que incluyen cadenas laterales de alquilo, tales como cadenas laterales metilo, etilo o propilo, o cadenas laterales carbonilo, así como PAGs que incluyen una o más subunidades PAG ramificadas, tales como iso-PPG o iso-PBG.

60 *"Compuesto de proinsulina"* significa un compuesto de insulina en el que el C-terminal de la cadena B se acopla al N-terminal de la cadena A a través de un C-peptido natural o artificial que tiene 5 o más amino ácidos. *"Compuesto de preproinsulina"* significa un compuesto de proinsulina que además incluye una secuencia líder acoplada al N-terminal de la cadena B, tal como una secuencia seleccionada para promover la excreción como una proteína soluble, o una secuencia seleccionada para prevenir la conjugación del N-terminal, o una secuencia seleccionada para mejorar la purificación (por ejemplo, una secuencia con afinidad de unión a una columna de purificación). *"Precursor de compuesto*

de insulina de una sola cadena" o "compuesto de miniproinsulina" significa un compuesto de insulina en el que el C-terminal de la cadena B (o una cadena B truncada que tiene 1, 2, 3 o 4 amino ácidos eliminados del C-terminal) se acopla al N-terminal de la cadena A o una cadena A truncada acortada en el N-terminal por 1, 2, 3 o 4 amino ácidos, sin un C-péptido intermediario, o a través de un C-péptido acortado que tiene 1, 2, 3 o 4 amino ácidos.

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

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

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

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

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

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

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

#### 7 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona complejos de conjugado de compuesto de insulina-catión y diversas composiciones que incluyen tales complejos; así como métodos de elaboración y uso de tales complejos y composiciones. Los complejos son útiles para la administración del compuesto de insulina para el tratamiento de diversos trastornos médicos, tales como afecciones caracterizados por la deficiencia del compuesto de insulina. Los complejos incluyen generalmente un componente catión y un componente conjugado de compuesto de insulina. El componente conjugado de compuesto de insulina incluye generalmente un compuesto de insulina acoplado a una porción modificadora. Ejemplos de otros componentes de los complejos y/o composiciones adecuados incluyen agentes estabilizantes, agentes formadores de complejos, y otros componentes conocidos en la materia para usar en la preparación de complejos catión-proteína. La invención además proporciona nuevos conjugados de compuesto de insulina y formulaciones de ácido graso que incluyen tales conjugados de compuesto de insulina y/o complejos de conjugado de compuesto de insulina-catión.

#### 7.1 Compuesto de insulina

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

5

Se conoce en la técnica una amplia variedad de análogos de compuesto de insulina. Los análogos de compuesto de insulina preferidos son aquellos que incluyen una lisina, preferiblemente una lisina dentro de los 5 amino ácidos del C-terminal de la cadena B, por ejemplo, en las posiciones B26, B27, B28, B29 y/o B30. Un conjunto de análogos adecuados se describe en el documento EP-A 1227000107, que tiene la secuencia del compuesto de insulina, excepto que el residuo de aminoácido en la posición B28 es Asp, Lys, Leu, Val, O Ala; El residuo de aminoácido en la posición B29 es Lys o Pro; El residuo de aminoácido en la posición B10 es His o Asp; El residuo de aminoácido en la posición B1 es Phe, Asp o se elimina solo o en combinación con una deleción del residuo en la posición B2; El residuo de aminoácido en la posición B30 es Thr, Ala o eliminado; y el residuo de aminoácido en la posición B9 es Ser o Asp; Siempre que la posición B28 o B29 sea Lys. Un conjunto de análogos adecuados se describe en el documento EP-A 1227000107(cuya descripción completa se incorpora en la presente descripción por referencia), que tiene la secuencia del compuesto de insulina, excepto que el residuo de aminoácido en la posición B28 es Asp, Lys, Leu, Val, o Ala; El residuo de aminoácido en la posición B29 es Lys o Pro; el residuo de aminoácido en la posición B10 es His o Asp; el residuo de aminoácido en la posición B1 es Phe, Asp o eliminado solo o en combinación con una deleción del residuo en la posición B2; El residuo de aminoácido en la posición B30 es Thr, Ala o eliminado; y el residuo de aminoácido en la posición B9 es Ser o Asp; siempre que la posición B28 o B29 sea Lys.

20

Otros ejemplos de análogos de compuestos de insulina adecuados incluyen insulina humana Asp<sup>B28</sup>, insulina humana Lys<sup>B28</sup>, insulina humana Leu<sup>B28</sup>, insulina humana Val<sup>B28</sup>, insulina humana Ala<sup>B28</sup>, insulina humana Asp<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>, insulina humana Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>, insulina humana Leu<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>, insulina humana Val<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>, insulina humana Ala<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>, tanto como análogos proporcionados usando las pautas de sustitución descritas anteriormente. Los fragmentos de compuesto de insulina incluyen, pero no se limitan a insulina humana B22-B30, insulina humana B23-B30, insulina humana B25-B30, insulina humana B26-B30, insulina humana B27-B30, insulina humana B29-B30, B1-B2 Insulina humana, insulina humana B1-B3, insulina humana B1-B4, insulina humana B1-B5, la cadena A de insulina humana y cadena B de insulina humana.

30

Todavía otros ejemplos de análogos de compuestos de insulina adecuados pueden encontrarse en la publicación de patente de los Estados Unidos No. 20030144181A1, titulada "Composiciones insolubles para controlar la glucosa en sangre", 31-Jul-03; Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20030104983A1, titulada "Formulaciones estables de insulina," 5-Jun-03; Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20030040601A1, titulada "Método para preparar precursores de insulina y precursores de análogos de insulina", 27-Feb-03; Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20030004096A1, titulada "Preparaciones de insulina libre de zinc y bajo contenido de zinc que tienen una estabilidad mejorada", 2 - Ene- 03; Patente de Estados Unidos 6,551,992B1, titulada "Formulaciones estables de Insulina," 22-Abr-03; Patente de Estados Unidos 6,534,288B1, titulada "Péptido C para la preparación mejorada de insulina y análogos de insulina", 18-Mar-03; Patente de los Estados Unidos 6,531,448B1, titulada " Composiciones insolubles para controlar la glucosa en sangre," 11-Mar-03; Patente de los Estados Unidos RE37,971E, titulada " Acilación selectiva de grupos épsilon-amino," 28-Ene-03; Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20020198140A1, titulada " Cristales de insulina pulmonar", 26-Dic-02; Patente de los Estados Unidos 6,465,426B2, titulada "Composiciones insolubles de insulina", 15-Oct-02; Patente de los Estados Unidos 6,444,641B1, titulada "Análogos de insulina acilados con ácidos grasos", 3-Sep-02; Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20020137144A1, titulada "Método para preparar precursores de insulina y análogos de precursores de insulina que tienen un rendimiento de fermentación mejorado en levadura", 26-Sep-02; Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20020132760A1, titulada "Formulaciones de insulina estabilizada", 19-Sep-02; Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20020082199A1, titulada "Composiciones insolubles de insulina", 27-Jun-02; Patente de los Estados Unidos 6,335,316B1, titulada "Método para administrar insulina acilada", 1-Ene-02; Patente de los Estados Unidos 6,268,335B1, titulada "Composiciones insolubles de insulina", 31-Jul-01; Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20010041787A1, titulada "Método para preparar precursores de insulina y análogos de precursores de insulina que tienen un rendimiento de fermentación mejorado en levadura", 15-Nov-01; Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20010041786A1, titulada "Formulaciones de insulina acilada estabilizada", 15-Nov-01; Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20010039260A1, titulada "Cristales de insulina pulmonar", 8-Nov-01; Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20010036916A1, titulada "Composiciones insolubles de insulina", 1-Nov-01; Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20010007853A1, titulada "Método para administrar análogos monoméricos de insulina", 12-Jul-01; Patente de los Estados Unidos 6,051,551A, titulada "Método para administrar insulina acilada", 18-Abr-00; Patente de los Estados Unidos 6,034,054A, titulada "Formulaciones estables de insulina", 7-Mar-00; Patente de los Estados Unidos 5,970,973A, titulada "Método de administración de insulina lispro", 26-Oct-99; Patente de los Estados Unidos 5,952,297A, titulada "Formulaciones monoméricas de análogos de insulina", 14-Sep-99; Patente de los Estados Unidos 5,922,675A, titulada "Análogos de insulina acilados", 13-Jul-99; Patente de los Estados Unidos 5,888,477A, titulada "Uso de insulina monomérica como un medio para mejorar la biodisponibilidad de insulina inhalada", 30-Mar-99; Patente de los Estados Unidos 5,873,358A, titulada "Método para mantener el nivel de glucosa en sangre de un paciente diabético en un rango deseado", 23-Feb-99; Patente de los Estados Unidos 5,747,642A, titulada "Formulaciones monoméricas de análogos de insulina", 5-May-98; Patente de los Estados Unidos 5,693,609A, titulada "Análogos de

65



compuestos de insulina acilados", 2-Dic-97; Patente de los Estados Unidos 5,650,486A, titulada "Formulaciones monoméricas de análogos de insulina", 22-Jul-97; Patente de los Estados Unidos 5,646,242A, titulada "Acilación selectiva de grupos épsilon-amino", 8-Jul-97; Patente de los Estados Unidos 5,597,893A, titulada "Preparación de cristales análogos de insulina estables", 28-Ene-97; Patente de los Estados Unidos 5,547,929A, titulada "Formulaciones análogas de insulina", 20-Ago-96; U.S. 5,504,188A, titulada "Preparación de cristales análogos de compuesto de insulina de zinc estable", 2-Abr-96; U.S. 5,474,978A, titulada "Formulaciones análogas de insulina", 12-Dic-95; Patente de los Estados Unidos 5,461,031A, titulada "Formulaciones monoméricas de análogos de insulina", 24-Oct-95; Patente de los Estados Unidos 4,421,685A, titulada "Procesos para producir una insulina", 20-Dic-83; Patente de los Estados Unidos 6,221,837, titulada "Derivados de insulina con un aumento de la unión al zinc" 24-Abr-01; Patente de los Estados Unidos 5,177,058, titulada "Formulación farmacéutica para el tratamiento de la diabetes mellitus" 5-Ene-93 (describe formulaciones farmacéuticas que incluyen un derivado de compuesto de insulina modificado con una base en B31 y que tiene un punto isoeléctrico entre 5.8 y 8.5 y/o al menos una de sus sales fisiológicamente toleradas en un excipiente farmacéuticamente aceptable y un contenido de iones de zinc relativamente alto en el rango desde arriba de 1 mg a aproximadamente 200 mg de zinc/IU, incluyendo el compuesto de insulina B31-Arg-OH y la insulina humana B31-Arg-B32-Arg-OH). La divulgación completa de cada uno de los documentos de patente precedentes se incorpora aquí como referencia, particularmente para enseñar sobre la fabricación, uso y composiciones de diversos análogos de compuestos de insulina.

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

## 7.2 Porción modificadora

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

Ejemplos de porciones modificadoras adecuadas y conjugados de compuestos de insulina útiles en las composiciones de conjugado de compuesto de insulina se pueden encontrar en las siguientes patentes, cuyas descripciones se incorporan en la presente como referencia: Patente de los Estados Unidos 6,303,569, titulada "Promármacos poliméricos facilitados por bloqueo de trialkilo de agentes bioactivos que contienen amino", 16-Oct-01; Patente de los Estados Unidos 6,214,330, "Cumarina y profármacos poliméricos basados en aromáticos relacionados", 10-Abr-01; Patente de los Estados Unidos 6,113,906, titulada "Polímero no antigénico soluble en agua, enlazable a material biológicamente activo", 05-Sep-00; Patente de los Estados Unidos 5,985,263, titulada "Conjugados sustancialmente puros de polímero de proteína enlazados a histidina, 16-Nov-99; Patente de los Estados Unidos 5,900,402, titulada "Método para reducir los efectos secundarios asociados con la administración de proteínas portadoras de oxígeno", 04-05-99; Patente de los Estados Unidos 5,681,811, "Composiciones de agentes terapéuticos estabilizados por conjugación, formulaciones de administración y diagnóstico que las comprenden, y método para fabricar y usar la misma" 28-Oct-97; Patente de los Estados Unidos 5,637,749, titulada "Óxidos de polialquileño activados con arilimidato", 10-Jun-97; Patente de los Estados Unidos 5,612,460, titulada "Carbonatos activos de óxidos de polialquileño para modificación de polipéptidos", 18-Mar-97; Patente de los Estados Unidos 5,567,422, titulada "Óxidos de polialquileño activados con azlactona conjugados con nucleófilos biológicamente activos", 22-Oct-96; Patente de los Estados Unidos 5,405,877, titulada "Óxidos de polialquileño activados con imidazona cíclica", 11-Abr-95; y Patente de los Estados Unidos 5,359,030, titulada "Composiciones de polipéptidos estabilizados por conjugación, administración terapéutica y formulaciones de diagnóstico que las comprenden, y método para preparar y usar las mismas", 25-Oct-94.

Ejemplos adicionales de polipéptidos conjugados útiles en las formulaciones de la presente invención se pueden encontrar en las siguientes solicitudes de Patente de los Estados Unidos, cuyas especificaciones completas se incorporan en la presente descripción por referencia: Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Nos. 09/134,803, presentada el 14-Ago-98; 10/018,879, presentada el 19-Dic-01; 10/235,381, presentada el 05-Sep-02; 10/235,284, presentada el 05-Sep-02; y 09/873,797, presentada el 04-Jun-01. La divulgación completa de cada una de las patentes y solicitudes de patente anteriores se incorporan aquí como referencia para sus enseñanzas concernientes a las porciones usadas para modificar los polipéptidos

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

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

#### 7.2.1 Porciones hidrofílicas

Ejemplos de porciones hidrofílicas adecuadas incluyen porciones PAG. Otros polímeros hidrófilos, porciones de azúcar, porciones de polisorbato y combinaciones de los mismos.

#### 7.2.2 Porciones polialquilen glicol.

PAGs son compuestos con unidades de alquilen glicol repetidas. En algunas realizaciones, las unidades son todas idénticas (por ejemplo, PEG o PAG). En otras realizaciones, las unidades de alquilen son diferentes (por ejemplo, polietilén-co-propilenglicol, o PLURONICS®). Los polímeros pueden ser copolímeros aleatorios (por ejemplo, donde se copolimerizan óxido de etileno y óxido de propileno) o copolímeros ramificados o de injerto.

PEG es un PAG preferido, y es útil en aplicaciones biológicas porque tiene propiedades altamente deseables y generalmente se considera como seguro (GRAS) por la Administración de alimentos y fármacos. El PEG generalmente tiene la fórmula  $H-(CH_2CH_2O)_n-H$ , donde n puede estar en el intervalo desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4000 o más, aunque las porciones de cubierta pueden variar, por ejemplo, mono-metoxi o di-hidroxi. El PEG típicamente es incoloro, inodoro, soluble en agua o miscible en agua (en dependencia del peso molecular), estable al calor, inerte químicamente, hidrolíticamente estable, y generalmente no tóxico. El PEG es además biocompatible, y típicamente no produce una respuesta inmune en el cuerpo. Las porciones PEG preferidas incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más subunidades PEG.

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

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

El PEG puede además ser ramificado, lo que en una realización se representa como  $R(-PEG_nOH)_m$  en la que R representa un agente núcleo central (típicamente polihídrico) tal como pentaeritritol, azúcar, lisina o glicerol, n representa el número de subunidad PEG y puede variar para cada brazo y es típicamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 y m representa el número de brazos, y está en el intervalo desde 2 al máximo número de sitios de unión en el agente núcleo. Cada ramificación puede ser la misma o diferente y puede terminar, por ejemplo, con éteres y/o ésteres. El número de brazos m puede estar en el intervalo desde tres a un centenar o más, y uno o más de los grupos hidroxilo terminales se puede acoplar al remanente del compuesto de insulina, o de cualquier otra forma someterse a modificación química.

Otros PEG ramificados incluyen los representados por la fórmula  $(CH_3O-PEG-)_pR-Z$ , donde p es igual a 2 o 3, R representa un núcleo central tal como lisina o glicerol, y Z representa un grupo tal como carboxilo que está sujeto a

activación química lista. Todavía otra forma ramificada, el PEG colgante, tiene grupos reactivos, tales como carboxilos, a lo largo del esqueleto de PEG en lugar de, o además del extremo de las cadenas de PEG. El PEG bifurcado puede ser representado mediante la fórmula  $\text{PEG}(-\text{LCHX}_2)_n$ , donde L es un grupo de enlace y X es un grupo terminal activado.

### 5 7.2.3 Porciones de azúcar

Las porciones modificadoras descritas aquí pueden incluir porciones de azúcar. En general, la porción de azúcar es un producto de carbohidrato de al menos un grupo de sacarosa. Las porciones de azúcar representativas incluyen, pero no se limitan a, porciones de glicerol, mono-, di-, tri- y oligosacáridos, y polisacáridos tales como almidones, glicógeno, 10 celulosa y gomas de polisacárido. Los monosacáridos específicos incluyen  $\text{C}_6$  y azúcares superiores (preferiblemente  $\text{C}_6$  a  $\text{C}_8$ ) tales como glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa y sedoheptulosa; di- y trisacáridos incluyen porciones que tienen dos o tres unidades de monosacáridos (preferiblemente  $\text{C}_5$  a  $\text{C}_8$ ) tales como sacarosa, celobiosa, maltosa, lactosa y rafinosa. La conjugación usando porciones de azúcar se describe en las patentes US 5,681,811, 5,438,040 y 5,359,030, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente descripción por referencia.

### 15 7.2.4 Porciones de polisorbato

Las porciones modificadoras pueden incluir una o más porciones polisorbato. Los ejemplos incluyen ésteres de sorbitán y polisorbato derivados con polioxietileno. La conjugación usando porciones de polisorbato se describe en las patentes 20 US 5,681,811, 5,438,040 y 5,359,030, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente descripción por referencia.

### 7.2.5 Porciones policatiónicas solubles en agua biocompatibles

En algunas realizaciones, se pueden usar polímeros policatiónicos biocompatibles solubles en agua. Los polímeros policatiónicos solubles en agua biocompatibles incluyen, por ejemplo, cualquier porción modificadora que tiene heterociclos protonados unidos como grupos colgantes. En este contexto, "soluble en agua" significa que la porción 25 modificadora completa es soluble en soluciones acuosas, tales como solución salina regulada o solución salina regulada con pequeñas cantidades de solventes orgánicos añadidos como cosolventes, a una temperatura entre 20 y 37 °C. En algunas realizaciones, la propia porción modificadora no es suficientemente soluble en soluciones acuosas en sí, sino que se lleva a la solución mediante injerto con polímeros solubles en agua tales como cadenas de PEG. Ejemplos incluyen poliaminas que tienen grupos amina en el esqueleto de la porción modificadora o en las cadenas laterales de porciones modificadores, tales como poli-L-Lys y otros poliaminoácidos cargados positivamente de aminoácidos naturales o sintéticos o mezclas de aminoácidos, incluyendo poli(D-Lys), poli(ornitina), poli(Arg), y poli(histidina), y poliaminas no péptidas tales como poli(aminoestireno), poli(aminoacrilato), poli(N-metilaminoacrilato), poli(N-etilaminoacrilato), poli(N,N-dimetilaminoacrilato), poli(N, N-dietilaminoacrilato), poli(aminometacrilato), poli(N-metilamino- 35 metacrilato), poli(N-etil aminometacrilato), poli(N,N-dietilaminometacrilato), poli(etilenimina), polímeros de aminas cuaternarias, tales como poli(cloruro de N, N, N-trimetilaminoacrilato), poli(cloruro de metacrilamidopropiltrimetilamonio) y polisacáridos naturales o sintéticos tales como quitosano.

### 40 7.2.6 Otras porciones hidrofílicas

Las porciones modificadoras también pueden incluir otros polímeros hidrofílicos. Ejemplos incluyen poli (polioles oxietilados) tales como poli(glicerol oxietilado), poli(sorbitol oxietilado) y poli (glucosa oxietilada); poli(alcohol vinílico) ("PVA"); dextrano; polímeros a base de carbohidratos y similares. Los polímeros pueden ser homopolímeros o 45 copolímeros aleatorios o de bloques y terpolímeros basados en los monómeros de los polímeros anteriores, de cadena lineal o ramificada.

Ejemplos específicos de polímeros adicionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, poli(oxazolina), poli(acriloilmorfolina) difuncional ("PACM") y poli(vinilpirrolidona) (PVP). PVP y poli (oxazolina) son polímeros bien conocidos en la técnica y su preparación será fácilmente evidente para el experto en la técnica. PACM y su síntesis y uso se describen en la Patente de Estados Unidos 5,629,384 y en la Patente de Estados Unidos 5,631,322, cuyas divulgaciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

### 55 7.2.7 Porciones bioadhesivas polianiónicas

Ciertos polímeros hidrofílicos parecen tener propiedades bioadhesivas potencialmente útiles. Ejemplos de tales polímeros se encuentran, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 6,197,346 de Mathiowitz, et al. Aquellos polímeros que contienen grupos carboxílicos (por ejemplo, poli(ácido acrílico)) presentan propiedades bioadhesivas, y también se conjugan fácilmente con los compuestos de insulina descritos en la presente descripción. Los polímeros rápidamente bioerosionables que exponen grupos de ácido carboxílico en la degradación, tales como poli(lactideoglicolida), polianhídridos y polioctoésteres, son también polímeros bioadhesivos. Estos polímeros pueden utilizarse para suministrar los compuestos de insulina al tracto gastrointestinal. A medida que los polímeros se degradan, pueden exponer grupos de ácido carboxílico para permitirles adherirse fuertemente al tracto gastrointestinal, y pueden ayudar en el suministro de los conjugados de compuesto de insulina.

65

## 7.2.8 Porciones lipofílicas

En algunas realizaciones, las porciones modificadoras incluyen una o más porciones lipofílicas. La porción lipofílica puede ser diversas porciones lipofílicas como comprenderán los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, porciones alquilo, porciones alquenilo, porciones alquinilo, porciones arilo, porciones arilalquilo, porciones alquilarilo, porciones de ácido graso, adamantantilo y colesterilo, así como como polímeros y/o oligómeros lipofílicos.

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

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

La porción lipofílica puede ser una porción de ácido graso, tal como una porción de ácido graso, lineal o ramificado, natural o sintético, saturado o insaturado. En algunas realizaciones, la porción de ácido graso tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más átomos de carbono. En algunas realizaciones, una porción modificadora específicamente no consiste de una porción de ácido graso; o específicamente no consiste de una porción de ácido graso que tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más átomos de carbono.

Cuando la porción modificadora incluye un anillo arilo, el anillo puede ser funcionalizado con un grupo funcional nucleofílico (tal como OH, o SH) que está posicionado de tal manera que pueda reaccionar de forma intramolecular con la porción carbamato y ayudar en su hidrólisis. En algunas realizaciones, el grupo nucleofílico está protegido con un grupo protector capaz de ser hidrolizado o degradado de otra manera in vivo, con el resultado de que cuando el grupo protector está desprotegido, la hidrólisis del conjugado y la liberación resultante del compuesto de insulina parental es facilitado.

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

## 7.2.9 Porciones anfífilas

En algunas realizaciones, la porción modificadora incluye una porción anfífilica. Muchos polímeros y oligómeros son anfífilicos. Estos son a menudo co-polímeros bloqueadores, copolímeros ramificados o co-polímeros injertados que incluyen porciones hidrofílicas y lipofílicas, que pueden estar en forma de oligómeros y/o polímeros, tales como polímeros o co-polímeros de cadenas lineales, ramificados, o injertados.

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

Los grupos lipofílicos pueden derivarse, por ejemplo, de ácidos mono- o di-carboxílicos, o cuando sea apropiado, equivalentes reactivos de ácidos carboxílicos tales como anhídridos o cloruros de ácido. Ejemplos de precursores adecuados para los grupos lipofílicos son ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido isobutírico, ácido trimetilacético, ácido caproico, ácido caprílico, ácido heptanoico, ácido cáprico, ácido pelargónico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido cerático, ácido montanoico, ácido isoesteárico, ácido isononanoico, ácido 2-etilhexanoico, ácido oleico, ácido ricinoleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido erúxico, ácido graso de soja, ácido graso de linaza, ácido graso de ricino deshidratado, ácido graso de

aceite alto, ácido graso de aceite de tung, ácido graso de girasol, ácido graso de cártamo, ácido acrílico, ácido metacrílico, anhídrido maleico, anhídrido ortoftálico, ácido tereftálico, ácido isoftálico, ácido adípico, ácido azelaico, ácido sebácico, anhídrido tetrahidroftálico, anhídrido hexahidroftálico, ácido succínico y ácidos carboxílicos de poliolefina.

5

Los grupos lipofílicos terminales no necesitan ser equivalentes, es decir, los copolímeros resultantes pueden incluir grupos lipofílicos terminales que son iguales o diferentes. Los grupos lipofílicos pueden derivarse de más de un grupo alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilalquilo o alquilarilo mono o di-funcional como se ha definido anteriormente.

10

#### 7.2.10 Porciones modificadoras PAG-alquilo

15

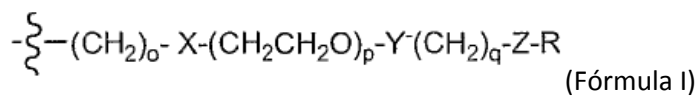
La porción modificadora puede ser una porción polimérica lineal o ramificada que tiene una o más porciones PAG lineales o ramificadas y/o una o más porciones alquilo lineales o ramificadas, sustituidas o no sustituidas. En ciertos casos, tales porciones se consideran anfifílicas; sin embargo, las porciones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

20

Las porciones PAG en algunas realizaciones incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 subunidad PEGs dispuestas en forma lineal o ramificada. Las porciones pag en algunas realizaciones incluyen subunidades PEG, PPG y/o PBG. En algunas realizaciones las porciones alquilo preferiblemente tienen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 átomos de carbono. Las porciones alquilo son preferiblemente porciones alcano. La porción modificadora puede incluir una porción de cubierta, tal como -OCH<sub>3</sub>. Más aun, la porción modificadora puede incluir un grupo hidrofóbico, tal como un grupo pivaloilo.

25

En una realización, la porción modificadora tiene una fórmula:



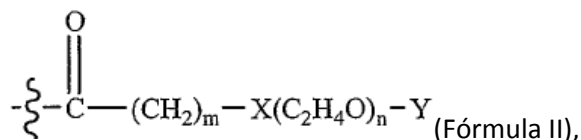
30

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

35

40

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



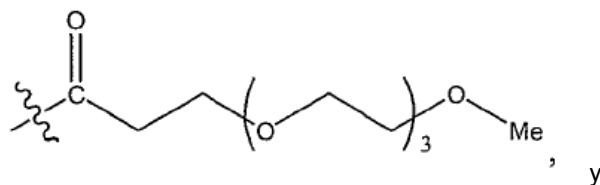
45

donde m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 y n es desde 2 hasta 100, preferiblemente 2 hasta 50, más preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, X es -C-, -O-, -C(O)-, -NH-, -NHC(O)-, o -C(O)NH-, y Y es alquilo inferior o -H. X es preferiblemente O y Y es preferiblemente -CH<sub>3</sub>. En algunos casos el grupo carbonilo (-C(O)-) puede estar ausente, y la porción -(CH<sub>2</sub>)- puede acoplarse a un grupo disponible sobre un amino ácido, tales como un grupo hidroxilo o un grupo ácido carboxílico libre.

50

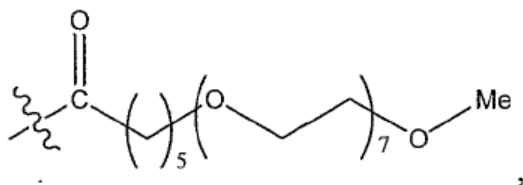
En una realización preferida, la porción modificadora tiene una estructura seleccionada de las siguientes:

55



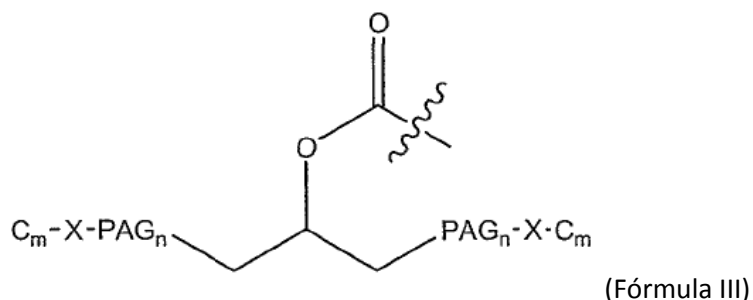
(cuando la porción modificadora inmediatamente precedente se acopla a insulina humana en B29, el monoconjugado resultante se denomina IN105).

5



10 (cuando la porción modificadora inmediatamente precedente se acopla a insulina humana en B29, el monoconjugado resultante se denomina HIM2). Cualquiera de las anteriores porciones puede, por ejemplo, acoplarse a insulina humana en un residuo nucleofílico, por ejemplo, A1, B1 o B29. En algunos casos el grupo carbonilo ( $-\text{C}(\text{O})-$ ) puede estar ausente o remplazarse con una porción alquilo, preferiblemente una porción alquilo inferior, y la porción  $-(\text{CH}_2)-$  puede acoplarse a un grupo disponible en un amino ácido, tal como un grupo hidroxilo o un grupo ácido carboxílico libre.

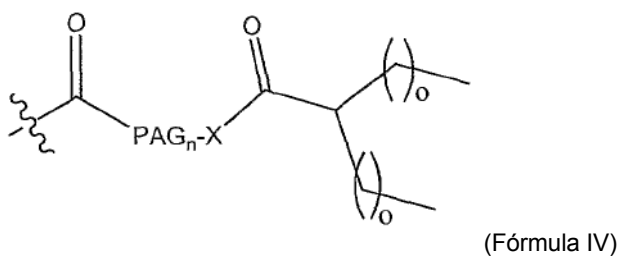
15 En otra realización, la porción modificadora tiene una fórmula:



20 donde cada C se selecciona independientemente y es una porción alquilo que tiene m carbonos y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20; y cada PAG se selecciona independientemente y es una porción PAG que tiene n subunidades y n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25; cada X se selecciona independientemente y es una porción enlazadora que acopla PAG a C, y es preferiblemente  $-\text{C}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})-$ , o  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ . En algunas realizaciones la porción  $\text{C}_m-\text{X}$  está ausente, y la porción  $\text{PAG}_n$  termina con una porción  $-\text{OH}$  o una porción  $-\text{OCH}_3$ . Por ejemplo, el PAG puede ser un PAG terminado en metoxi o terminado en hidroxilo, que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 subunidades PAG, que incluyen subunidades PEG, PPG, y/o PBG. En algunos casos el grupo carbonilo ( $-\text{C}(\text{O})-$ ) puede remplazarse con una porción alquilo, preferiblemente una porción alquilo inferior, que puede acoplarse a un grupo disponible en un amino ácido, tal como un grupo hidroxilo o un grupo ácido carboxílico libre.

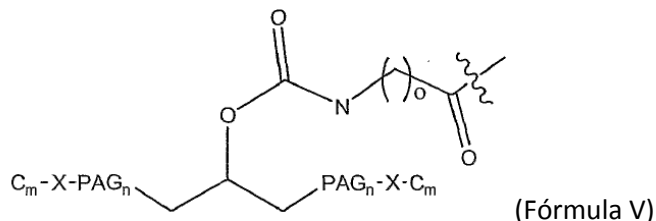
30

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



donde cada C se selecciona independientemente y es una porción alquilo que tiene m carbonos y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20; y cada PAG se selecciona independientemente y es una porción PAG que tiene n subunidades y n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25; X es -O-, o -NH-; cada o se selecciona independientemente y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. Por ejemplo, el PAG puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 subunidades PAG, PEG, y/o PBG. En algunos casos el grupo carbonilo (-C(O)-) proximal al punto de unión puede estar ausente o remplazarse con una porción alquilo, preferiblemente una porción alquilo inferior, y la porción -(CH<sub>2</sub>)- puede acoplarse a un grupo disponible en un amino ácido, tal como un grupo hidroxilo o un grupo ácido carboxílico libre.

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



donde cada C se selecciona independientemente y es una porción alquilo que tiene m carbonos y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20; y cada PAG se selecciona independientemente y es una porción PAG que tiene n subunidades y n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25; cada X se selecciona independientemente y es una porción enlazadora que acopla PAG a C, y es preferiblemente -C-, -O-, -C(O)-, -NH-, -NHC(O)-, o -C(O)NH-; cada o se selecciona independientemente y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. En algunas realizaciones la porción C<sub>m</sub>-X está ausente, y la porción PAG<sub>n</sub> termina con una porción -OH o una porción -OCH<sub>3</sub>. Por ejemplo, el PAG puede ser PAG terminado en metoxi o terminado en hidroxilo, que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 subunidades PAG, que incluyen subunidades PEG, PPG, y/o PBG. En algunos casos el grupo carbonilo (-C(O)-) proximal al punto de unión puede estar ausente, y la porción -(CH<sub>2</sub>)- puede acoplarse a un grupo disponible en un amino ácido, tal como un grupo hidroxilo o un grupo ácido carboxílico libre.

En otra realización, la porción modificadora puede tener una fórmula:

-X-R<sup>1</sup>-Y-PAG-Z-R<sup>2</sup> (Fórmula VI)

dónde,

X, Y y Z son grupos de enlace seleccionados independientemente y cada uno está opcionalmente presente, y X, cuando está presente, se acopla al compuesto de insulina por un enlace covalente,

al menos uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> está presente y es alquilo inferior y puede incluir opcionalmente un grupo carbonilo,

R<sup>2</sup> es un grupo de cubrimiento, tal como -CH<sub>3</sub>, -H, tosilato, o un grupo activante, y

PAG es una cadena de carbono lineal o ramificada que incorpora una o más porciones de alcalenglicol (es decir, porciones de oxialcaleno), y opcionalmente que incorpora una o más porciones adicionales seleccionadas del grupo que consiste de -S-, -O-, -N- y -C(O)-, y

donde la porción modificadora tiene un número máximo de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 átomos pesados.

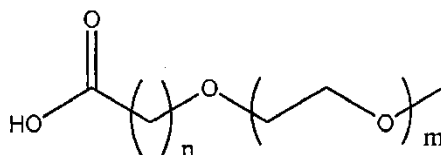
En realizaciones de la invención, uno cualquiera o más de X, Y y Z pueden estar ausentes. Además, cuando están presentes, X, Y y/o Z pueden seleccionarse independientemente de -C(O)-, -O-, -S-, -C- y -N-. En una realización, Z es -C(O)-. En otra realización, Z no está presente.

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es alquilo inferior, y R<sup>2</sup> no está presente. En otras realizaciones, R<sup>2</sup> es alquilo inferior, y R<sup>1</sup> no está presente.

En otra realización, la porción modificadora puede incluir una porción de cadena de carbono lineal o ramificada sustituida que tiene un esqueleto de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 átomos seleccionados del grupo que consiste de -C-, -C-, -O-, =O-, -S-, -N-, -Si-. Los átomos pesados incluirán típicamente uno o más átomos de carbono y uno o más átomos pesados no carbono seleccionados del grupo que consiste de -O-, -S-, -N-, y =O. Los átomos de carbono y los átomos pesados no carbono están típicamente presentes

5 en una relación de al menos 1 átomo de carbono por cada átomo pesado no carbono, preferiblemente al menos 2  
 10 átomos de carbono por cada átomo pesado no carbono, más preferiblemente al menos 3 átomos de carbono por cada  
 15 átomo pesado no carbono. Los átomos de carbono y átomos de oxígeno están típicamente presentes en una relación de  
 al menos 1 átomo de carbono por cada átomo de oxígeno, preferiblemente al menos 2 átomos de carbono por cada  
 átomo de oxígeno, más preferiblemente al menos 3 átomos de carbono por cada átomo de oxígeno. La porción  
 modificadora puede incluir uno o más grupos de cubrimiento, tales como C1-6 ramificados o lineales, ramificados o  
 lineales, o un grupo carbonilo. La porción modificadora incluirá típicamente hidrógenos, y uno o más de los hidrógenos  
 pueden estar sustituidos con un flúor (que es un átomo pesado pero no debe contarse como un átomo pesado en la  
 fórmula anterior). La porción modificadora puede excluir en algunos casos, en particular, fracciones alquilo no  
 sustituidas. La porción modificadora puede estar acoplada, por ejemplo, a un grupo disponible en un aminoácido, tal  
 como un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo ácido carboxílico libre, el polipéptido, por ejemplo, por un grupo de  
 unión, tal como un carbamato, un carbonato, éter, éster, amida o grupo amina secundaria, o mediante un enlace  
 disulfuro. Las moléculas en el grupo de enlace se cuentan como parte de la porción modificadora. En una realización  
 preferida, el peso molecular de la porción modificadora es menor que el peso molecular de la porción modificadora de  
 HIM2.

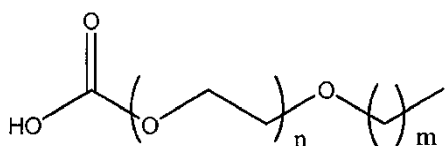
La invención incluye porciones modificadoras que tienen una fórmula:



(Fórmula VII)

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

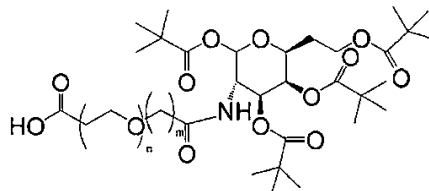
La invención incluye porciones modificadoras que tienen una fórmula:



(Fórmula VIII)

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

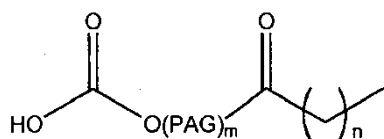
La invención incluye porciones modificadoras que tienen una fórmula:



(Fórmula IX)

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

La invención incluye además porciones modificadoras que tienen una fórmula:



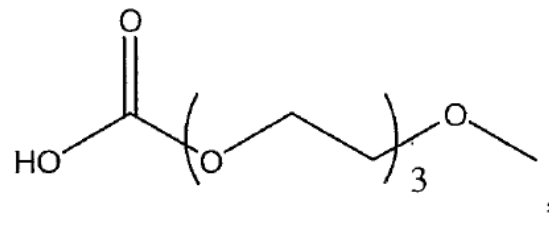
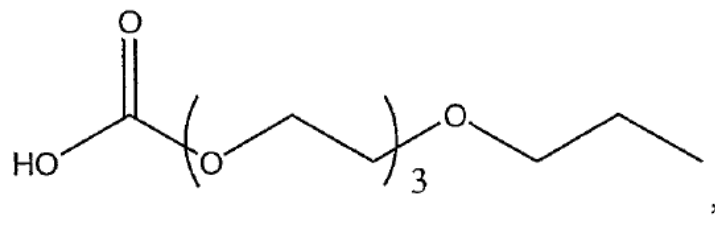
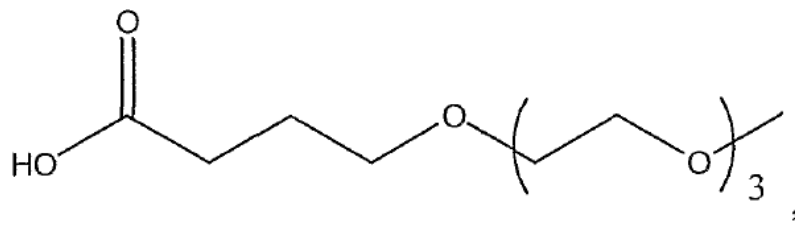
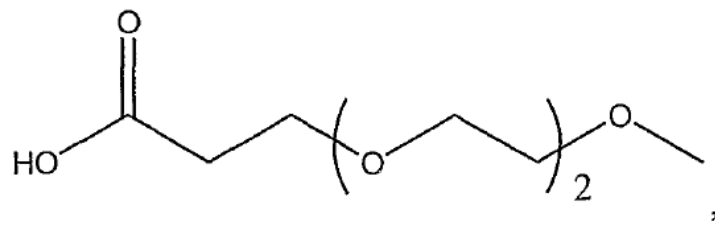
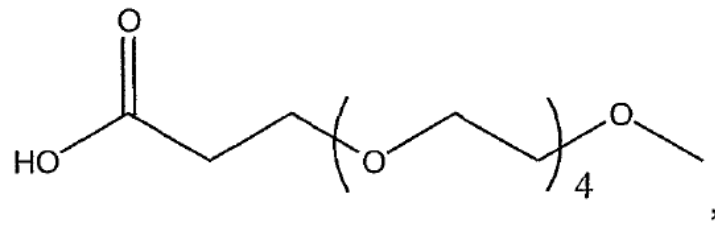
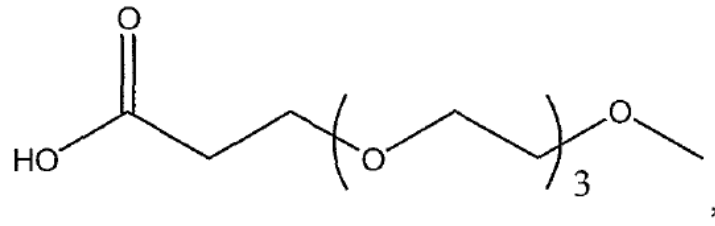
(Fórmula X)

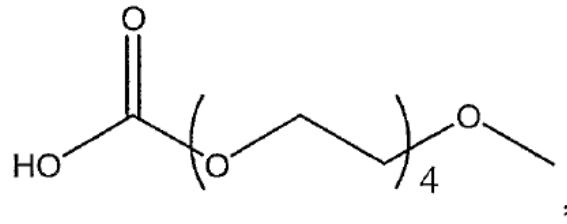


5

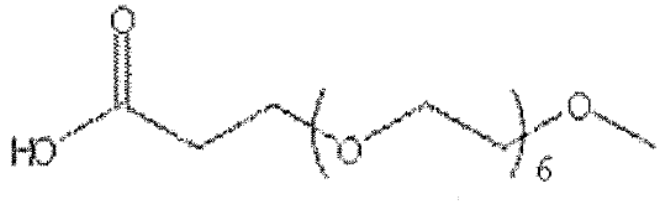
donde PAG es una porción PAG que tiene m subunidades y m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 y n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20.

10 Otras porciones modificadoras preferidas incluyen:



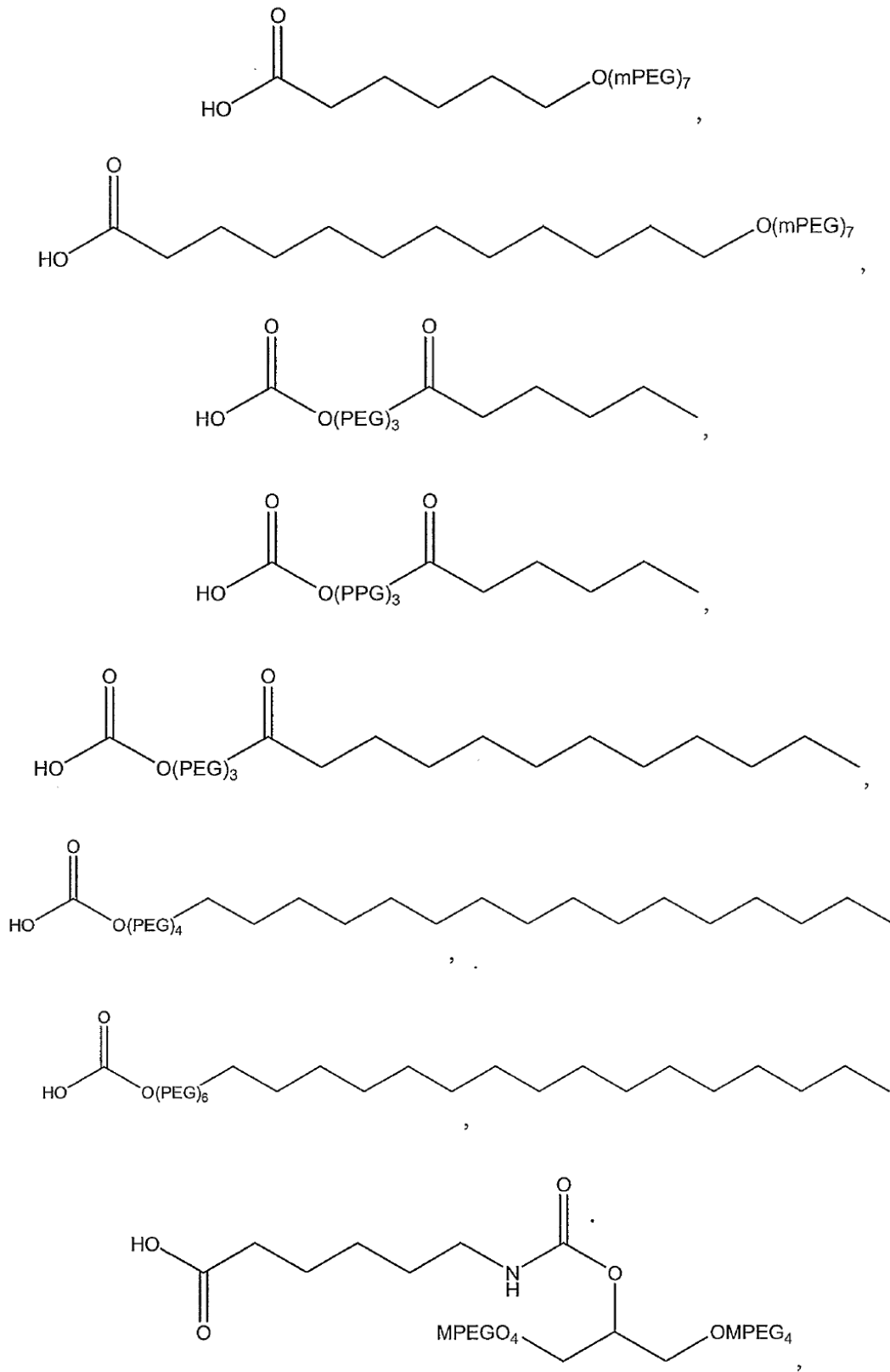


y



5

Las siguientes porciones modificadoras pueden preferirse particularmente para usarse en un régimen de reemplazo de compuesto de insulina basal.



y













- R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 5 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-,  
 10 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 15 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 20 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 25 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 30 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 35 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>,  
 40 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>,  
 R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>,  
 45

donde R es -H, -OH, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)<sub>2</sub>, -C(O)OH, -CH<sub>2</sub>C(O)OH, o una porción activadora, tal como una carbodiimida, un anhídrido mixto o una N-hidroxisuccinimida, o un grupo de cubrimiento. La invención también incluye tales porciones unidas a una proteína o péptido, preferiblemente a un compuesto de insulina. Las estrategias de conjugación específicas se discuten con más detalle a continuación. De estas porciones modificadoras, las porciones preferidas son aquellas que hacen que el compuesto de insulina sea menos lipofílico y/o más hidrófilo que el correspondiente compuesto de insulina no conjugado. La invención incluye tales porciones modificadoras que incluyen además uno o más grupos carbonilo, preferiblemente 1, 2, 3, 4, o 5 grupos carbonilo; los grupos carbonilo pueden insertarse en la porción modificadora, o un -O- o -CH<sub>2</sub>- se puede sustituir con un carbonilo. Además, cualquiera de las porciones -CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>3</sub> pueden ser sustituidas, por ejemplo, con un alquilo inferior o una cadena -OH o PAG que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 subunidades PAG, que pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, R se selecciona de modo que cada -O- se separa del -O- más próximo por al menos 2 carbonos. La invención también incluye porciones modificadoras ramificadas en las que dos o más de las porciones están unidos a una porción ramificante, tal como una lisina.

Las características farmacéuticas, tales como hidrofiliidad/lipofiliidad de los conjugados de acuerdo con las realizaciones de la invención, pueden variarse por, por ejemplo, el ajuste de las partes lipofílicas e hidrofílicas de las porciones modificadoras, por ejemplo, por el aumento o la disminución del número de monómeros PAG, el tipo y longitud de la cadena alquilo, la naturaleza del enlace PAG-péptido, y el número de sitios de conjugación. La naturaleza exacta del enlace porción modificadora-péptido puede variar de forma tal que es estable y/o sensible a la hidrólisis a pH fisiológico o en el plasma. La invención además incluye cualquiera de las porciones modificadoras anteriores acopladas a un polipéptido, preferiblemente al compuesto de insulina. Preferiblemente, la porción modificadora hace al polipéptido

más soluble que un polipéptido correspondiente no conjugado, por ejemplo, por un multiplicador de al menos 1.05, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, o 15. Una porción modificadora de la invención puede ser acoplada, por ejemplo, a un compuesto de insulina, tal como una insulina humana, en cualquier punto de unión disponible. Un punto preferido de unión es un residuo neofílico, por ejemplo, A1, B1 y/o B29.

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

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

#### 7.2.11 Porciones formadoras de sal

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

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

#### 7.3 Estrategias de conjugación

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

En algunas realizaciones, los conjugados de compuesto de insulina son monoconjugados. En otras realizaciones, los conjugados de compuesto de insulina son multi-conjugados, tales como di-conjugados, tri-conjugados, tetra-conjugados, penta-conjugados y similares. El número de porciones modificadoras en el compuesto de insulina se limita solamente por el número de sitios de conjugación en el compuesto de insulina. Todavía en otras realizaciones, los conjugados de compuesto de insulina son una mezcla de mono-conjugados, di-conjugados, tri-conjugados, tetra-conjugados, y/o penta-conjugados. Las estrategias de conjugación preferidas son aquellas que rinden un conjugado que relaciona alguna o toda la actividad biológica del compuesto de insulina parental.

Sitios de unión preferidos incluyen N-terminal de A1, N-terminal de B1, y cadena lateral de la lisina de B29. El B29 monoconjugado y B1, B29 diconjugados, son altamente preferidos. Otro punto preferido de unión es una funcionalidad amino en un componente C-péptido o un componente péptido líder del compuesto de insulina.

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

### 7.3.1 Acoplamiento de la porción modificadora al compuesto de insulina

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

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

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

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

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

La porción modificadora puede acoplarse al compuesto de insulina a través de uno o más grupos amino. Los ejemplos en insulina humana incluyen los grupos amino en A1, B1 y B29. En una realización, una sola porción modificadora se acopla a un solo grupo amino en el compuesto de insulina. En otra realización, dos porciones modificadoras se conectan cada una a un grupo amino diferente en el compuesto de insulina. Donde hay dos porciones modificadoras acopladas a dos grupos amino, una disposición preferida es el acoplamiento en B1 y B29. Donde hay múltiples polímeros, los polímeros pueden ser todos iguales o uno o más de los polímeros pueden ser diferentes de los otros. Diversos métodos y tipos de acoplamiento de polímeros a compuestos de insulina se describen en solicitud de patente de los Estados Unidos Núm. 09/873,899, titulada "Mezclas de conjugados de compuesto de insulina que comprenden polialquilen glicol, usos de estas, y métodos de hacer las mismas," presentada el 4 de julio de 2001, cuya descripción completa se incorpora en la presente descripción por referencia.

Todavía en otras realizaciones, se puede usar un enfoque de profármaco parcial, en el que una parte de la porción modificadora se hidroliza. Por ejemplo, véase la patente de los Estados Unidos 6,309,633 a Ekwuribe y otros (cuya descripción completa se incorpora en la presente descripción por referencia), que describe porciones modificadoras que tienen componentes hidrofílicos y lipofílicos en los que el componente lipofílico se hidroliza *in vivo* para producir un conjugado micropegilado.

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

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

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

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

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

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

35 En una realización preferida, la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición de  $Zn^{++}$ . En algunas realizaciones, la porción modificadora se selecciona para hacer al conjugado de compuesto de insulina igualmente o más soluble que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado, y la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición de zinc. En otras realizaciones, la porción modificadora se selecciona para hacer al conjugado de compuesto de insulina igualmente o más soluble que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado, la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición de zinc, y la solubilidad en agua del complejo de cation es mayor que la solubilidad en agua del compuesto de insulina.

45 En otro aspecto, el conjugado de compuesto de insulina es un compuesto de insulina acilado de ácido graso, el cation es zinc, y la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición del zinc. Todavía en otra realización, el conjugado de compuesto de insulina es un compuesto de insulina acilado de ácido graso que es igualmente o más soluble en agua que un compuesto de insulina correspondiente no conjugado, el cation es zinc, y la solubilidad en agua del conjugado de compuesto de insulina disminuye por la adición del zinc.

50 En ciertas realizaciones preferidas, la lipofilicidad del conjugado de compuesto de insulina en relación al compuesto de insulina correspondiente parental es 1 o menos que 1. La lipofilicidad relativa del conjugado de compuesto de insulina en comparación al compuesto de insulina correspondiente parental ( $k_{rel}$ ) puede, por ejemplo, determinarse como sigue:  $k_{rel} = (t_{conjugado} - t_0)/(t_{humano} - t_0)$ , donde la lipofilicidad relativa se mide en una columna de cromatografía líquida de alta resolución LiChroSorb RP18 (5µm, 250 X 4 mm) por elusión isocrática a 40 °C. Las siguientes mezclas se pueden usar como eluyentes: 0.1M amortiguador sodio fosfato a pH 7.3 que contiene 10% acetonitrilo, y 50% acetonitrilo en agua. El tiempo muerto ( $t_0$ ) se identifica por la inyección de 0.1 mM nitrato de sodio. El tiempo de retención para la insulina humana se ajusta a al menos  $2t_0$  por la variación de la relación entre las mezclas de (c)(i) y (c)(ii). Preferiblemente, en estas realizaciones, la lipofilicidad relativa es aproximadamente igual a 1 o es menos que 1 o prácticamente menos que 1.

55 En una realización preferida, el compuesto de insulina es insulina humana, y la lipofilicidad relativa es menos que 1. Preferiblemente la lipofilicidad relativa es menos que aproximadamente 0.99, 0.98, 0.97, 0.96, 0.95, 0.94, 0.93, 0.92, 0.91, o 0.90. La discusión de las técnicas para determinar la solubilidad y/o lipofilicidad de la insulina y los conjugados de insulina se exponen en la patente de los Estados Unidos 5,750,499 titulada "Insulina acilada" concedida a Harelund y otros, el 12 de mayo de 1998, cuya descripción completa se incorpora en la presente descripción por referencia.

65

- En una realización, la lipofilicidad relativa es como se describe anteriormente y la porción modificadora es una cadena de carbono que tiene 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 carbonos, en donde la cadena comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 grupos oxi insertados en la misma. En otra realización, la lipofilicidad relativa es como se describe anteriormente y la porción modificadora es una cadena de carbono que tiene 5, 6, 7, 8, 9 o 10 carbonos, en donde la cadena de carbono comprende 2, 3 o 4 grupos oxi insertados en la misma. En una realización relacionada, la lipofilicidad relativa es como se describe anteriormente y la porción modificadora comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades polialcalen glicol. En otra realización relacionada, la lipofilicidad relativa es como se describe anteriormente y la porción modificadora comprende 1, 2 o 3 unidades de polietilenglicol y 1, 2 o 3 unidades de polipropilenglicol.
- 7.4 Componente catión metálico y características de los complejos
- Los complejos de conjugado de compuesto de insulina-catión incluyen un catión metálico. Los cationes metálicos adecuados para usar como el componente catión incluyen cualquier catión metálico capaz de formar complejos, agregar, o cristalizar con el conjugado de compuesto de insulina. Se prefiere que el catión metálico forme un complejo con el conjugado de compuesto de insulina. Se pueden usar cationes simples o múltiples. El catión es preferiblemente no significativamente oxidante para el conjugado de compuesto de insulina, es decir, no oxidante al extremo de que los complejos se inutilicen para sus propósitos previstos.
- En algunas realizaciones, el catión metálico es biocompatible. Un catión metálico es biocompatible si el catión presenta efectos perjudiciales no excesivamente significativos en el cuerpo del receptor, tales como una reacción inmunológica significativa en el sitio de reacción. Sin embargo, se apreciará que en algunas circunstancias, el riesgo de toxicidad y otros efectos perjudiciales pueden compensarse por los beneficios de la composición de conjugado de compuesto de insulina-catión, y por lo tanto pueden ser aceptables bajo tales circunstancias.
- La idoneidad de los cationes metálicos para la estabilización de agentes biológicamente activos y la relación de catión metálico a agente biológicamente activo necesaria se puede determinar por el experto en la materia por la realización de una variedad de pruebas para estabilidad tales como electroforesis en gel de poliacrilamida, focalización isoeléctrica, cromatografía de fase reversa, y análisis HPLC sobre partículas de agentes biológicamente activos estabilizados por catión metálico antes de y a continuación de la reducción de tamaño y/o encapsulación de las partículas .
- El componente catión metálico adecuado incluye uno o más cationes metálicos monovalentes, divalentes, o trivalentes, o combinaciones de estos. En una realización preferida, el catión metálico es un catión metálico del Group II o de transición. Ejemplos de cationes divalentes adecuados incluyen  $Zn^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Ni^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Co^{++}$  y/o  $Mg^{++}$ . Donde se incluye un catión monovalente, es preferiblemente  $Na^+$ ,  $Li^+$ , o  $K^+$ . El catión se adiciona preferiblemente como una sal, tal como una sal cloruro o acetato, los más preferidos son  $ZnCl_2$  y  $ZnAc$ .
- La relación molar de conjugado de compuesto de insulina a catión es típicamente entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:100, preferiblemente entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:12, y con mayor preferencia entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:7 o aproximadamente 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, o 1:7. En una realización particular, el  $Zn^{++}$  se usa como componente catión, se proporciona a una relación molar componente catión de zinc a conjugado de compuesto de insulina de aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:100, preferiblemente entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:12, y con mayor preferencia entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:7 o aproximadamente 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, o 1:7.
- El componente catión es preferiblemente mayor que aproximadamente 90% un catión simple, tal como el  $Zn^{++}$ . Preferiblemente, el catión es mayor que aproximadamente 95%, 99%, o 99.9%  $Zn^{++}$ .
- Preferiblemente la resistencia del conjugado de compuesto de insulina que forma complejo a la degradación por quimotripsina es mayor que la degradación por quimotripsina del conjugado de compuesto de insulina correspondiente *que no forma complejo*. Preferiblemente la resistencia del conjugado de compuesto de insulina que forma complejo a la degradación por quimotripsina es mayor que la degradación por quimotripsina del compuesto de insulina correspondientes que forma complejo pero no está conjugado.
- El conjugado de compuesto de insulina que forma complejo puede ser más biodisponible oralmente en un mamífero que un control científicamente aceptable, tal como un conjugado de compuesto de insulina correspondiente *no complejo*. En otras realizaciones, el conjugado de compuesto de insulina que forma complejo es más biodisponible oralmente en un humano que un control científicamente aceptable, tal como un conjugado de compuesto de insulina correspondiente que no forma complejo. En ciertas realizaciones, la absorción del conjugado de compuesto de insulina que forma complejo, por ejemplo, según se mide por los niveles en el plasma del conjugado, es al menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, o 4 veces mayor que la absorción de un conjugado de compuesto de insulina que no forma complejo.
- El conjugado de compuesto de insulina que forma complejo, puede ser más biodisponible oralmente en un mamífero que un control científicamente aceptable, tal como un compuesto de insulina correspondiente que forma complejo pero no está conjugado. En otras realizaciones, el conjugado de compuesto de insulina que forma complejo es más biodisponible oralmente en un humano que un control científicamente aceptable, tal como un compuesto de insulina

correspondiente que forma complejo pero no está conjugado. En ciertas realizaciones, la absorción del conjugado de compuesto de insulina que forma complejo, por ejemplo, según se mide por los niveles en el plasma del conjugado, es al menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, o 4 veces mayor que la absorción de un compuesto de insulina que forma complejo pero no está conjugado.

5

#### 7.5 Agentes formadores de complejos.

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

10

15

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

20

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

25

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

30

#### 7.6 Agentes estabilizantes

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

35

#### 7.7 Presentación de Complejos

40

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

45

##### 7.7.1 Composiciones Sólidas

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

50

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

55

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

60

65

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

#### 25 7.7.2 Composiciones Líquidas

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

#### 35 7.7.3 Mezclas y Co-cristales

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

40 Así, por ejemplo, la invención proporciona composiciones que incluyen dos o más conjugados de compuestos de insulina y/o compuestos de insulina no conjugados. Más aun, cuando las composiciones incluyen sólidos, los sólidos pueden tener diferentes formas. Así, por ejemplo, un sólido puede ser cristalino y otro sólido puede ser un sólido amorfo. Como se indicó en otros lugares, los sólidos se pueden proporcionar en una forma seca o se pueden proporcionar como componentes sólidos de una mezcla líquida. En una realización que se prefiere, la mezcla de la invención incluye dos o más conjugados de compuestos de insulina diferentes, y los conjugados de compuestos de insulina diferentes tienen diferentes solubilidades. En una realización, uno de los complejos comprende un conjugado de compuesto de insulina lipofílico y el otro comprende un conjugado de compuesto de insulina hidrofílico. En aún otra realización, los complejos pueden incluir diferentes conjugados de compuestos de insulina, donde uno o más de los complejos tiene una vida media de circulación de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 horas, y uno o más de los complejos tiene una vida media de circulación que es significativamente mayor que la vida media de circulación del primer complejo. En una realización relacionada, uno de los complejos tiene un perfil de acción rápida y otro de los complejos tiene un perfil de acción media a prolongada. De manera adicional, uno de los complejos puede tener el perfil adecuado para el control basal del compuesto de insulina mientras que otro tiene un perfil adecuado para el control de glucosa post-prandial. Las mezclas que se prefieren son mezclas de insulina y HIM2, mezclas de HIM2 y IN105, mezclas de IN105 y de compuestos de insulina, mezclas de IN105 y de insulina acilada de ácido graso, mezclas de insulina acilada de ácido graso y HIM2. Las insulinas aciladas de ácido graso adecuadas se describen en las siguientes patentes de los Estados Unidos, cuya descripción completa se incorpora en la presente descripción por referencia: patente de los Estados Unidos 6,531,448, titulada "Insoluble compositions for controlling blood glucose," concedida 11-Mar-03; patente de los Estados Unidos RE37,971, titulada " Selective acylation of epsilon-amino groups", concedida 28-Ene-03; patente de los Estados Unidos 6,465,426, titulada " Insoluble insulin compositions", concedida 15-Oct-02; patente de los Estados Unidos 6,444,641, titulada "Fatty acid-acylated insulin analogs." concedida 03-Sep-02; patente de los Estados Unidos 6,335,316, titulada " Method for administering acylated insulin",concedida 01-Ene-02; patente de los Estados Unidos 6,268,335, titulada " Insoluble insulin compositions", concedida 31-Jul-01; patente de los Estados Unidos 6,051,551, titulada " Method for administering acylated insulin",concedida 18-Abr-00; patente de los Estados Unidos 5,922,675, titulada " Acylated Insulin Analogs", concedida 13-Jul-99; patente de los Estados Unidos 5,700,904, titulada "Preparation of an acylated protein powder," concedida 23-Dic-97; patente de los Estados Unidos 5,693,609, titulada "Acylated insulin analogs Granted," concedida 02-Dec97; patente de los Estados Unidos 5,646,242, titulada " Selective acylation of

5 epsilon-amino groups", concedida 08-Jul-97; patente de los Estados Unidos 5,631,347, titulada "Reducing gelation of a fatty acid-acylated protein," concedida 20-May-97; patente de los Estados Unidos 6,451,974, titulada "Method of acylating peptides and novel acylating agents," concedida 17-Sep-02; patente de los Estados Unidos 6,011,007, titulada "Acylated insulin," concedida 04-Ene-00; patente de los Estados Unidos 5,750,497, titulada "Acylated insulin Granted: 12-May-98; patente de los Estados Unidos 5,905,140, titulada "Selective acylation method," concedida el 18 de mayo de 1999; patente de los Estados Unidos 6,620,780, titulada "Insulin derivatives," concedida el 16 de sep. de 2003; patente de los Estados Unidos 6,251,856, titulada "Insulin derivatives," concedida el 26 de junio de 2001; patente de los Estados Unidos 6,211,144, titulada "Stable concentrated insulin preparations for pulmonary delivery," concedida el 3 de abril de 2001; patente de los Estados Unidos 6,310,038, titulada "Pulmonary insulin cristales," concedida el 30 de octubre de 2001; y patente de los Estados Unidos 6,174,856, titulada "Stabilized insulin compositions," concedida el 16 de enero de 2001. De manera especial se prefieren insulinas aciladas de mono-ácidos grasos que tienen ácidos grasos de 12, 13, 14, 15, o 16 carbonos unidos covalentemente a la Lys (B29) de la insulina humana.

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

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

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

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

35 Más aun, la invención proporciona complejos que tienen dos conjugados de compuesto de insulina diferentes y/o un conjugado de compuesto de insulina y un compuesto de insulina no conjugado. La invención proporciona co-cristales híbridos de dos, tres o más conjugados de compuesto de insulina diferentes. La invención proporciona un complejo que tiene un conjugado de compuesto de insulina con un compuesto de insulina no conjugado. La invención proporciona un co-cristal con dos o más conjugados de compuesto de insulina hidrofílicos diferentes; dos o más diferentes conjugados de compuesto de insulina hidrofóbicos diferentes; dos o más conjugados de compuesto de insulina anfífilicos diferentes; un conjugado de compuesto de insulina hidrofílico y un conjugado de compuesto de insulina lipofílico; un conjugado de compuesto de insulina hidrofílico y un conjugado de compuesto de insulina no conjugado; HIM2 junto con un compuesto de insulina no conjugado; IN105 junto con un compuesto de insulina no conjugado; HIM2 junto con IN105; HIM2 junto con un compuesto de insulina e IN105; y otras combinaciones de los elementos anteriores. Como se mencionó en otra parte, los complejos pueden proporcionarse como sólidos secos, como complejos disueltos en solución y/o como complejos no disueltos en la solución. Pueden emplearse diversas combinaciones, por ejemplo, para proporcionar un complejo o co-cristal que tenga un perfil extendido.

#### 50 7.8 Solubilidad de los Complejos de la Invención

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

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

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

#### 7.8.1 Complejos tipo R

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

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

#### 7.8.2 Complejos tipo T

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

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

#### 7.8.3 Complejos Tipo NPH

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

#### 7.9 Propiedades Farmacéuticas

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

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

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

#### 25 7.10 Método de Fabricación

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

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

40 Para preparar el sólido tipo T (con catión y conjugado de compuesto de insulina y sin protamina) en las condiciones de solución acuosa que se describen anteriormente, la relación molar del conjugado de compuesto de insulina al catión es preferiblemente de aproximadamente 1:1.5 a 1:3, de manera ideal de aproximadamente 1:2. Para preparar el sólido tipo R (con catión, composición de insulina y compuesto estabilizante (por ejemplo, un compuesto fenólico), y sin protamina) en las condiciones de solución acuosa que se describen anteriormente, la relación molar del conjugado de compuesto de insulina al catión es preferiblemente de aproximadamente 1:4 a 1:9, preferiblemente de aproximadamente 1:7 a aproximadamente 1:9, de manera ideal de aproximadamente 1:8.

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

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

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

concentración del catión está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 g/L, con mayor preferencia de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 4 g/L.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 En una realización de la invención, los sólidos se forman a temperatura ambiente (25 °C) sin que se requiera una reducción de la temperatura para inducir la precipitación de sólidos. Por ejemplo, la temperatura ambiente es efectiva para los cristales tipo T y tipo R. La temperatura para la formación del sólido es de aproximadamente 0 a

aproximadamente 40 °C, con preferencia de aproximadamente 17 a aproximadamente 30 °C, y aún con mayor preferencia de aproximadamente 22 a aproximadamente 27 °C, de manera ideal aproximadamente 25 °C.

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

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

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

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

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

#### 40 7.11 Formulación

Los complejos se pueden formular para la administración en un vehículo farmacéutico de acuerdo con técnicas que se conocen. Véase, por ejemplo, Alfonso R. Gennaro, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (junio 2003), y Howard C. Ansel, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 7ª ed. (octubre 1999), cuya descripción completa se incorpora en la presente descripción por referencia para sus enseñanzas relativas a la selección, fabricación y uso de formas de dosificación farmacéuticas.

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

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

estómago y para disolverse de manera completa o sustancialmente de manera completa en el intestino para la entrega del ingrediente activo. Los ejemplos de sistemas transdérmicos adecuados incluyen ultrasonidos, iontoforética, y sistemas de suministro por parche.

- 5 En un aspecto, la invención proporciona composiciones de ácidos grasos que comprenden uno o más ácidos grasos C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub> or C<sub>10</sub> saturados o insaturados y/o sales de tales ácidos grasos. Los ácidos grasos que se prefieren son caprílico, cáprico, mirístico y láurico. Las sales de ácidos grasos que se prefieren son sales sódicas de ácido caprílico, cáprico, mirístico y láurico.
- 10 Las composiciones de ácidos grasos que se prefieren incluyen un único ácido graso o una sal de ácido graso única y no incluyen cantidades sustanciales de otros ácidos grasos o sales de ácidos grasos. En un aspecto de la invención, el contenido de ácido graso de la composición es mayor que aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, o 99.9% p/p de un solo ácido graso. En otra realización, el contenido de ácido graso de la composición
- 15 está dentro de un intervalo que tiene un límite inferior de aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, or 3.0 % p/p, y tiene un límite superior de aproximadamente 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10.0, 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9, 11.0, 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5, 11.6, 11.7, 11.8, 11.9, o 12.0 % p/p. Aún en
- 20 otra realización, el contenido de ácido graso de la composición está dentro de un intervalo que tiene un límite inferior de aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, o 3.0 % p/p, y tiene un límite superior de aproximadamente 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10.0, 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9, 11.0, 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5, 11.6, 11.7, 11.8, 11.9, o 12.0 % p/p, y el contenido de ácido graso de la composición es mayor que
- 25 aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, o 99.9% p/p de un solo ácido graso.
- Los componentes activos de estas formulaciones pueden incluir proteínas y/o péptidos complejados o no complejados, conjugados o no conjugados. Las proteínas y/o péptidos que se prefieren son los que se describen en la presente invención. Los conjugados que se prefieren son los que se describen en la presente invención. Los complejos que se prefieren son los que se describen en la presente invención. Las composiciones orales que se prefieren son composiciones que se preparan para la ingestión por el sujeto. De manera ideal, las composiciones orales se preparan
- 30 para sobrevivir o sobrevivir sustancialmente al paso a través del estómago y para disolverse de manera completa o sustancialmente de manera completa en el intestino para el suministro del ingrediente activo. La formulación puede en algunos casos incluir un recubrimiento entérico, y en algunos casos, la formulación excluirá específicamente un recubrimiento entérico. La composición se proporciona preferiblemente como una tableta, polvo, cápsula de gelatina dura o cápsula de gelatina blanda, aunque otras formas que se describen en la presente invención son adecuadas también.
- 40 Las composiciones de ácidos grasos de la invención pueden incluir insulinas aciladas de ácidos grasos. Los ejemplos de insulinas aciladas de ácidos grasos adecuadas se describen en las siguientes patentes de los Estados Unidos, cuyas divulgaciones completas se incorpora en la presente descripción por referencia: patente de los Estados Unidos 6,531,448, titulada "Insoluble compositions for controlling blood glucose," concedida 11-Mar-03; patente de los Estados Unidos RE37,971, titulada "Acilación selectiva de grupos épsilon-amino", concedida 28-Ene-03; patente de los Estados Unidos 6,465,426, titulada "Composiciones insolubles de insulina", concedida 15-Oct-02; patente de los Estados Unidos 6,444,641, titulada "Fatty acid-acylated insulin analogs," concedida 03-Sep-02; patente de los Estados Unidos 6,335,316, titulada "Método para administrar insulina acilada", issued 01-Ene-02; patente de los Estados Unidos 6,268,335, titulada "Composiciones insolubles de insulina", concedida 31-Jul-01; patente de los Estados Unidos 6,051,551, titulada "Método para administrar insulina acilada", concedida 18-Abr-00; patente de los Estados Unidos 5,922,675, titulada "Análogos de insulina acilados", concedida 13-Jul-99; patente de los Estados Unidos 5,700,904, titulada "Preparation of an acylated protein powder," concedida 23-Dic-97; patente de los Estados Unidos 5,693,609, titulada "Acylated insulin analogs Granted," concedida 02-Dic-97; patente de los Estados Unidos 5,646,242, titulada "Acilación selectiva de grupos épsilon-amino", concedida 08-Jul-97; patente de los Estados Unidos 5,631,347, titulada "Reducing gelation of a fatty acid-acylated protein," concedida 20-May-97; patente de los Estados Unidos 6,451,974, titulada "Method of acylating peptides and novel acylating agents," concedida 17-Sep-02; patente de los Estados Unidos 6,011,007, titulada "Insulina acilada", concedida 04-Ene-00; patente de los Estados Unidos 5,750,497, titulada "Acylated insulin Concedida: 12-May-98; patente de los Estados Unidos 5,905,140, titulada "Selective acylation method," concedida el 18 de mayo de 1999; patente de los Estados Unidos 6,620,780, titulada "Insulin derivatives," concedida el 16 de sep.de 2003; patente de los Estados Unidos 6,251,856, titulada "Insulin derivatives," concedida el 26 de junio de 2001; patente de los Estados Unidos 6,211,144, titulada "Stable concentrated insulin preparations for pulmonary delivery," concedida el 3 de abril de 2001; patente de los Estados Unidos 6,310,038, titulada "Pulmonary insulin cristales," concedida el 30 de octubre de 2001; y patente de los Estados Unidos 6,174,856, titulada "Stabilized insulin compositions," concedida el 16 de enero de 2001. Se prefieren de manera especial las insulinas monoaciladas de
- 60

ácidos grasos que tienen ácidos grasos de 12, 13, 14, 15, o 16 carbonos unidos covalentemente a Lys(B29) de la insulina humana.

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

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

25 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración bucal (sublingual) incluyen pastillas que comprenden la mezcla de conjugados de compuesto de insulina en una base saborizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; y pastillas que comprenden la mezcla de conjugados de compuesto de insulina en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia. Ejemplos de formulaciones adecuadas se pueden encontrar en la publicación de las patentes de los Estados Unidos núms. 20030229022 ("Pharmaceutical formulation"); 20030236192 ("Method of modifying the release profile of sustained release compositions"); 20030096011 ("Method of producing submicron particles of a labile agent and use thereof"); 20020037309 ("Process for the preparation of polymer-based sustained release compositions"); 20030118660 ("Residual solvent extraction method and microparticles produced thereby"); así como también las patentes de los Estados Unidos 6,180,141 ("Composite gel microparticles as active principle carriers"); 6,737,045 ("Methods and compositions for the pulmonary delivery of insulin compound"); 6,730,334 ("Multi-arm block copolymers as drug delivery vehicles"); 6,685,967 ("Methods and compositions for pulmonary delivery of insulin compound"); 6,630,169 ("Particulate delivery systems and methods of use"); 6,589,560 ("Stable glassy state powder formulations"); 6,592,904 ("Dispersible macromolecule compositions and methods for their preparation and use"); 6,582,728 ("Spray drying of macromolecules to produce inhaleable dry powders"); 6,565,885 ("Methods of spray drying pharmaceutical compositions"); 6,546,929 ("Dry powder dispersing apparatus and methods for their use"); 6,543,448 ("Apparatus and methods for dispersing dry powder medicaments"); 6,518,239 ("Dry powder compositions having improved dispersivity"); 6,514,496 ("Dispersible antibody compositions and methods for their preparation and use"); 6,509,006 ("Devices compositions and methods for the pulmonary delivery of aerosolized medicaments"); 6,433,040 ("Stabilized bioactive preparations and methods of use"); 6,423,344 ("Dispersible macromolecule compositions and methods for their preparation and use"); 6,372,258 ("Methods of spray-drying a drug and a hydrophobic amino acid"); 6,309,671 ("Stable glassy state powder formulations"); 6,309,623 ("Stabilized preparations for use in metered dose inhalers"); 6,294,204 ("Method of producing morphologically uniform microcapsules and microcapsules produced by this method"); 6,267,155 ("Powder filling systems, apparatus and methods"); 6,258,341 ("Stable glassy state powder formulations"); 6,182,712 ("Power filling apparatus and methods for their use"); 6,165,463 ("Dispersible antibody compositions and methods for their preparation and use"); 6,138,668 ("Method and device for delivering aerosolized medicaments"); 6,103,270 ("Methods and system for processing dispersible fine powders"); 6,089,228 ("Apparatus and methods for dispersing dry powder medicaments"); 6,080,721 ("Pulmonary delivery of active fragments of parathyroid hormone"); 6,051,256 ("Dispersible macromolecule compositions and methods for their preparation and use"); 6,019,968 ("Dispersible antibody compositions and methods for their preparation and use"); 5,997,848 ("Methods and compositions for pulmonary delivery of insulin compound"); 5,993,783 ("Method and apparatus for pulmonary administration of dry powder.alpha.1-antitrypsin"); 5,922,354 ("Methods and system for processing dispersible fine powders"); 5,826,633 ("Powder filling systems, apparatus and methods"); 5,814,607 ("Pulmonary delivery of active fragments of parathyroid hormone"); 5,785,049 ("Method and apparatus for dispersion of dry powder medicaments"); 5,780,014 ("Method and apparatus for pulmonary administration of dry powder alpha 1-antitrypsin"); 5,775,320 ("Method and device for delivering aerosolized medicaments"); 5,740,794 ("Apparatus and methods for dispersing dry powder medicaments"); 5,654,007 ("Methods and system for processing dispersible fine powders"); 5,607,915 ("Pulmonary delivery of active fragments of parathyroid hormone"); 5,458,135 ("Method and device for delivering aerosolized medicaments"); 6,602,952 ("Hydrogels derived from chitosan and poly(ethylene glycol) or related polymers"); y 5,932,462 ("Multiarmed, monofunctional, polymer for coupling to molecules and surfaces"). Más aun, formulaciones de liberación sostenida adecuadas se describen en la Patente de los Estados Unidos 5,968,554 de Cardinal Health, titulada "A sustained release pharmaceutical preparation," concedida 19-oct-99, cuya divulgación completa se incorpora en la presente descripción por referencia. Formulaciones de micropartículas adecuadas se describen en la Publicación de Patente Internacional de Spherics, Inc. WO/2003-049,701, titulada "Methods and products useful in the formation and isolation of microparticles," publicada 30-oct-03.



Formulaciones bioadhesivas adecuadas se describen en la Publicación de Patente Internacional de Spherics, Inc. WO/2003-051,304, titulada "Bioadhesive drug delivery system with enhanced gastric retention", publicada 06-mayo-04.

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

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

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

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

35 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos que se adaptan para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Las composiciones adecuadas para la administración transdérmica pueden suministrarse además mediante iontoforesis (véase, por ejemplo, *Pharmaceutical Research* 3 (6):318 (1986)) y adoptarán típicamente la forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada de la mezcla de conjugados de compuesto de insulina. Las formulaciones adecuadas comprenden tampón citrato o bis/tris (pH 6) o etanol/agua y contienen de 0.1 a 0.2 M de ingrediente activo.

40 En una realización que se prefiere, los complejos se administran como componentes de formulaciones de ácidos grasos sólidos como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos núm. 60/494,821, presentada el 13-Ag-03, por Opawale y otros, cuya divulgación completa se incorpora en la presente descripción por referencia.

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

#### 7.12 Métodos de tratamiento

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

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

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

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

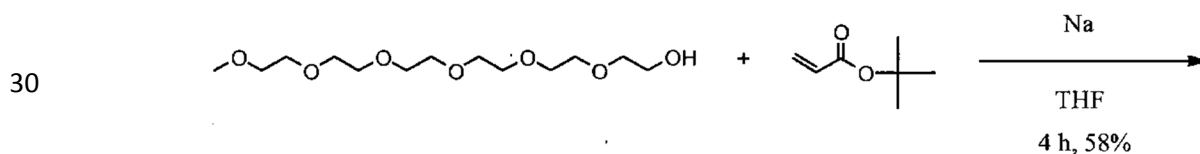
15 La frecuencia de administración suele ser de una, dos o tres veces al día o según sea necesario para controlar la enfermedad. Alternativamente, las composiciones conjugado de compuesto de insulina-cación se pueden administrar por infusión continua. La duración del tratamiento depende del tipo de deficiencia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

### 8 Ejemplos de Síntesis

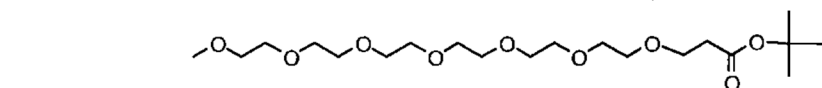
20 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar y explicar la invención.

25 8.1 Síntesis de oligómero protegido MPEG<sub>6</sub>C<sub>3</sub> ter-butil éster de ácido (3-{2-[2-(2-[2-(2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi)-propiónico)

25



35



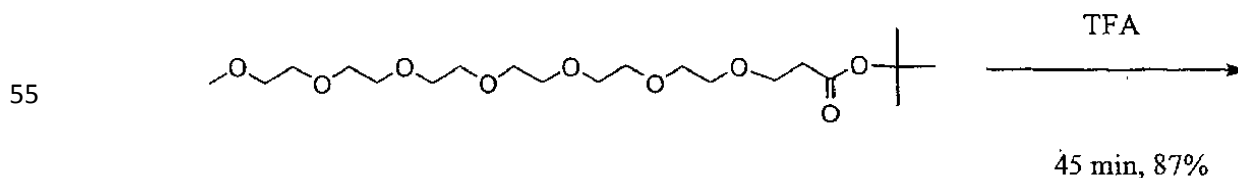
40

45 Se disolvieron metil hexaetilen glicol (1.0 g, 3.37 mmol) y *ter*-butil acrilato (0.216 g, 1.69 mmol) en THF seco (10 mL). Se añadieron a la solución 0.4 mg, 0.016 mmol de metal sódico). Después de agitar durante 4 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de HCl 1 M (15 mL). La mezcla de reacción inactivada se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 x 50 mL, 1 x 25 mL). La capa orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró. Después de la purificación por cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo como eluyente), se obtuvo el producto como un aceite (0.832 g, 58%).

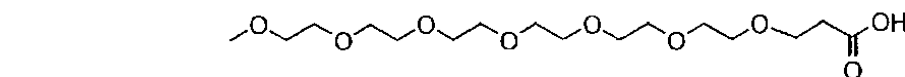
45

50 8.2 Síntesis de ácido oligomérico MPEG<sub>6</sub>C<sub>3</sub> ácido (3-{2-[2-(2-[2-(2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico)

50



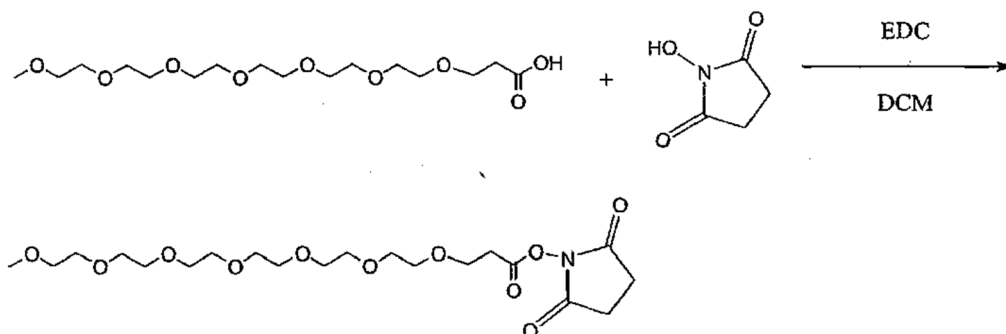
60



65

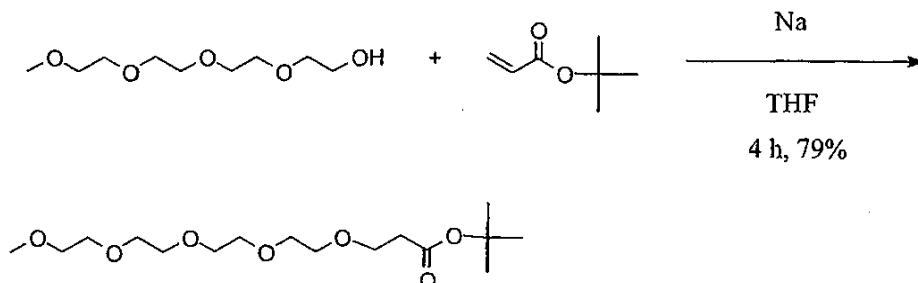
El *ter*-butil éster (0.165 g, 0.0389 mmol) se desprotegió por agitación a temperatura ambiente en ácido trifluoroacético (2.0 mL). Los contenidos se concentraron después hasta un peso constante (0.125 g, 87%).

8.3 Síntesis de oligómero activado MPEG<sub>6</sub>C<sub>3</sub> 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido (3-{2-[2-(2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propiónico)



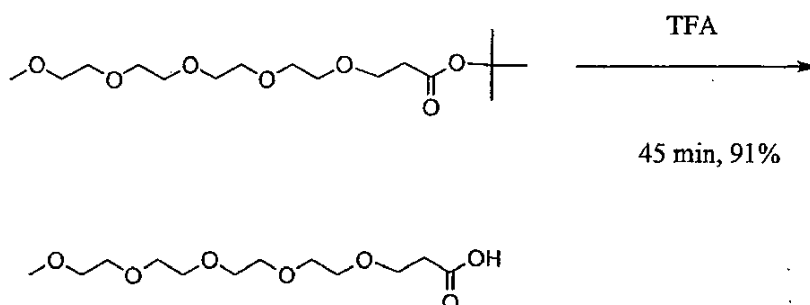
El ácido (0.660 g, 1.79 mmol) y la *N*-hidroxisuccinimida (0.2278 g, 1.97 mmol) se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (15 mL). Se añadió hidrocloreto de etil dimetilaminopropil carbodiimida (EDC, 0.343 g, 1.79 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la mezcla de reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con agua (2 x 45 mL). La capa orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró hasta un peso constante. El producto fue un aceite (0.441 g, 53%).

8.4 Síntesis de oligómero protegido MPEG<sub>4</sub>C<sub>3</sub> *ter*-butil éster de ácido (3-(2-{2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico)



Se disolvieron metil tetraetilen glicol (1.0 g, 4.80 mmol) y *ter*-butil acrilato (0.308 g, 2.40 mmol) en THF seco (10 mL). Se añadieron 0.6 mg, 0.024 mmol) de metal sódico a la solución. Después de agitar durante 4 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de HCl 1 M (15 mL). La mezcla de reacción que se inactivó se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 x 50 mL, 1 x 25 mL). La capa orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró. Después de la purificación por cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo como eluyente), se obtuvo el producto como un aceite (1.28 g, 79%).

8.5 Síntesis de ácido oligomérico MPEG<sub>6</sub>C<sub>3</sub> ácido (3-(2-{2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico)

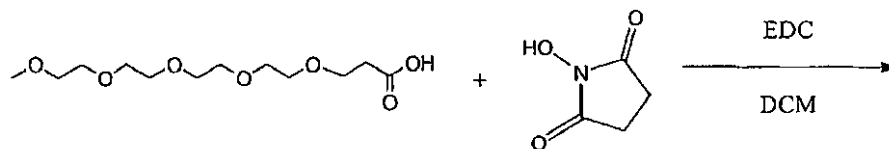


El *ter*-butil éster (1 g, 3.42 mmol) se desprotegió mediante agitación a temperatura ambiente en ácido trifluoroacético (6.0 mL). Los contenidos se concentraron hasta un peso constante (0.87 g, 91%).

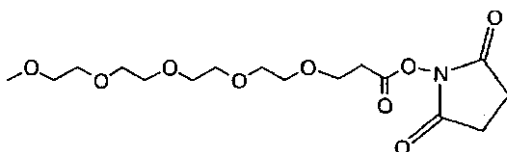
5

8.6 Síntesis de oligómero activado MPEG<sub>4</sub>C<sub>3</sub> 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido (3-(2-[2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-propiónico)

10



15



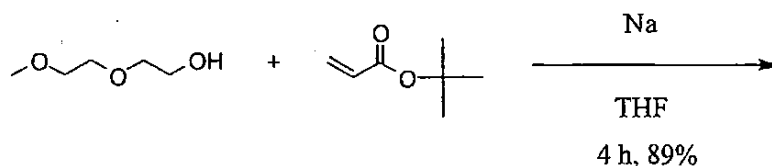
20

El ácido (0.6 g, 2.14 mmol) y la *N*-hidroxisuccinimida (0.271 g, 2.35 mmol) se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (20 mL). Se añadió hidrocloreto de etil dimetilaminopropil carbodiimida (EDC, 0.409 g, 2.14 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la mezcla de reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con agua (2 x 45 mL). La capa orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró hasta un peso constante. El producto fue un aceite (0.563 g, 69%).

25

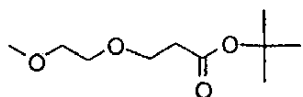
8.7 Síntesis de oligómero protegido MPEG<sub>4</sub>C<sub>3</sub> *ter*-butil éster de ácido (3-(2-Metoxi-etoxi)-propiónico)

30



35

40



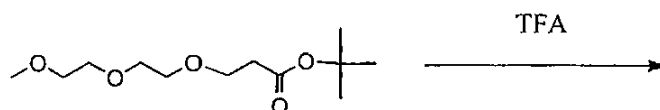
45

Se disolvieron metil tetraetilenglicol (5.0 g, 41.6 mmol) y *ter*-butil acrilato (2.66 g, 20.8 mmol) en THF seco (20 mL). Se añadió metal sódico 0.47mg, 20.8 mmol) a la solución. Después de agitar durante 4 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de HCl 1 M (30 mL). La mezcla de reacción inactivada se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 x 100 mL, 1 x 50 mL). La capa orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró. Después de la purificación por cromatografía en gel de sílice (acetato de etilo como eluyente), se obtuvo el producto como un aceite (7.5 g, 89%).

50

8.8 Síntesis de ácido oligomérico MPEG<sub>6</sub>C<sub>3</sub> ácido (3-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-propiónico)

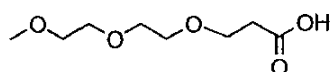
55



60

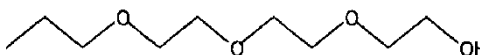
45 min, 91%

65



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

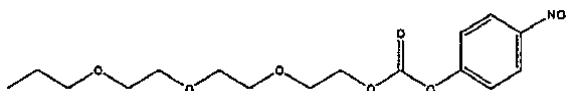
5 8.9 Síntesis de 2-[2-(2-propoxi-etoxi)-etoxi]-etanol (1)



10 Se disolvió trietilenglicol (19.5 g, 0.13 mol) en tetrahidrofurano (150 ml) y se añadió hidruro de sodio (2.60 g, 0.065 mol) en porciones durante 0.5 h y la reacción se agitó durante 1 h adicional. Después se añadió 1-bromopropano (8.0 g, 0.065 mol) disuelto en tetrahidrofurano (30 mL) gota a gota mediante un embudo de adición y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción bruta se filtró a través de Celita, se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y se evaporó hasta que estuvo seca. El aceite resultante se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 mL), se lavó con NaCl (250 mL) saturado, H<sub>2</sub>O (250 mL), se secó con MgSO<sub>4</sub>, y se evaporó hasta que estuvo seco. La cromatografía en columna (sílice, acetato de etilo) proporcionó 1 un aceite amarillento (2.24 g, 18% de rendimiento).

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

20



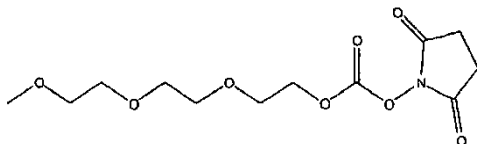
25

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

30

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

35



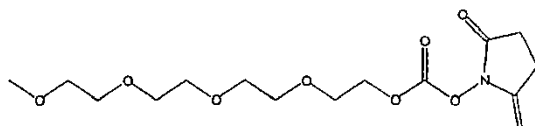
40

45 Se disolvieron trietilenglicol monometil éter (1.0 g, 6.1 mmol) y carbonato de N, N' -disuccinimidilo (1.87 g, 7.3 mmol) en acetonitrilo (10 mL). Después se añadió trietilamina (1.3 mL, 9.15 mmol) y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción en bruto se evaporó hasta que estuvo seca, se disolvió en NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) saturado, se lavó con etil acetato (2 x 50 mL), se secó con MgSO<sub>4</sub>, y se evaporó hasta que estuvo seca. La cromatografía en columna (sílice, acetato de etilo) proporcionó 1 de un aceite transparente (0.367 g, 20% de rendimiento).

45

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

50



55

60 Se disolvieron tetraetilen glicol monometil éter (1.0 g, 4.8 mmol) y carbonato de N, N' -disuccinimidilo (1.48 g, 5.8 mmol) en acetonitrilo (10 mL). Después se añadió trietilamina (1.0 mL, 7.2 mmol) y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción en bruto se evaporó hasta que estuvo seca, se disolvió en NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) saturado, se lavó con etil acetato (2 x 30 mL), se lavó con MgSO<sub>4</sub>, y se evaporó hasta que estuvo seca. La cromatografía en columna (sílice, acetato de etilo/MeOH, 20:1) proporcionó 1 de un aceite transparente (0.462 g, 28% de rendimiento).

60

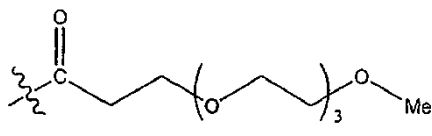
8.13 Síntesis de etil éster de ácido but-3-enoico

65



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

5



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

#### 9.1 Preparación y Análisis de Sólidos Tipo T

15 9.1.1 Intento de Preparación de Complejo de Zn tipo T de HIM 2 (2 g/L)

Una solución de HIM2 a aproximadamente 2 g/L se preparó con un pH final ~3 con HCl 10%. El ácido acético glacial se añadió a una alícuota de 10 mL (20 mg de proteína) de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Veinte (o cuarenta)  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{ZnCl}_2$  2% p/p se añadió a la muestra. El pH se ajustó a 5.1 (o 5.5) con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente (o  $+5^\circ\text{C}$ ) y luego se mantuvo durante un día a temperatura ambiente (o  $+5^\circ\text{C}$ ) para permitir la formación del sólido. No se formaron cristales o precipitación después de dejar que la reacción reposara un día a temperatura ambiente (o al  $+5^\circ\text{C}$ ). Véase el Ejemplo 2 de la patente de los Estados Unidos 5,504,188, titulada "Preparation of stable zinc insulin compound analog crystals."

25 9.1.2 Complejo de Zn tipo T de HIM2 (Concentración 10 g/L)

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/L con un pH final ~3 con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 10 mL (100 mg de proteína) de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Cuarenta  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{ZnCl}_2$  10% p/p se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 5.20 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó durante 15 minutos a  $+5^\circ\text{C}$  y luego se dejó reposar durante cinco días a  $+5^\circ\text{C}$  para permitir la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2000 RPM durante 10 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 mL de agua DI fría. Esta solución se centrifugó a 2000 RPM durante 10 minutos antes de que se decantara el agua y los sólidos se lavaron con otro 5 mL de agua DI fría. Una vez más, la muestra se centrifugó a aproximadamente 2000 rpm durante aproximadamente 10 minutos antes de que el  $\text{H}_2\text{O}$  se decantara. La muestra se lavó con 5 mL de EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2000 RPM durante 10 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se secó en un liofilizador para proporcionar un sólido blanco.

40 9.1.3 Complejo de Zn tipo T de HIM2 (Concentración 20 g/L)

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 20 g/L con un pH final ~3 con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 10 mL (200mg de proteína) de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Se añadieron ochenta  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{ZnCl}_2$  10% p/p a la muestra. El pH se ajustó a 5.37 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó durante 15 minutos a  $+5^\circ\text{C}$  y luego se dejó reposar durante cuatro días a  $+5^\circ\text{C}$  para permitir la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 mL de agua DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que se decantara el agua y los sólidos se lavaron con otros 5 mL de agua DI fría. Una vez más, la muestra se centrifugó a aproximadamente 2600 RPM durante aproximadamente 20 minutos antes de que el  $\text{H}_2\text{O}$  se decantara. La muestra se lavó con 5 mL de EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se secó en un liofilizador para proporcionar un sólido blanco.

55 9.1.4 Complejo de Zn tipo T de HIM2 (Concentración 30 g/L)

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 30 g/L con un pH final ~3 con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 50 mL (1.5g de proteína) de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Se añadieron seiscientos  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{ZnCl}_2$  10% p/p a la muestra.

El pH se ajustó a 5.34 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se dejó reposar a  $+5^\circ\text{C}$  durante cinco días para permitir la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó tres veces con 10 mL de agua DI fría, centrifugando y decantando el  $\text{H}_2\text{O}$  en cada lavado.

La muestra se lavó después tres veces con 10 mL de EtOH 200 proof frío. La muestra se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos y se decantó después de cada lavado. La muestra se secó en un liofilizador para proporcionar un sólido blanco.

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

#### 15 9.1.5 Complejo de Zn tipo-T de HIM2 (concentración 50 g/l)

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 50 g/l a un pH  $\sim$ 3 final con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 10 ml de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Doscientos  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{ZnCl}_2$  10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 5.23 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó a +5  $^\circ\text{C}$  durante 15 minutos y después se mantuvo a +5  $^\circ\text{C}$  durante cuatro días para permitir que ocurriera la formación del sólido.

20 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el  $\text{H}_2\text{O}$  se decantara y el sólido se lavara con otros 5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  DI fría. De nuevo, la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el  $\text{H}_2\text{O}$  se decantara. La muestra se lavó con 5 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se secó en un liofilizador durante tres días.

#### 30 9.1.6 Complejo de Zn tipo-T de HIM2 (escala 1 g)

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH  $\sim$ 3 final con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 50 ml (proteína 500 mg) de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Doscientos  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{ZnCl}_2$  10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 5.49 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó a +5  $^\circ\text{C}$  durante 15 minutos y después se mantuvo a +5  $^\circ\text{C}$  durante siete días para permitir que ocurriera la formación del sólido.

35 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el  $\text{H}_2\text{O}$  se decantara. Los lavados de agua se repitieron dos veces más. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador para secar durante cuatro días.

#### 45 9.1.7 Complejo de Zn tipo-T de HIM2 a pH neutro (escala 5 g)

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH  $\sim$ 3 final con HCl 10%. Dos mililitros de una solución de  $\text{ZnCl}_2$  10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 7.05 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó a temperatura ambiente toda la noche para permitir que ocurriera la formación del sólido.

50 La mezcla de reacción lechosa Zn-HIM2 (500 ml) se añadió, en partes, a un embudo de disco fritado fino (4.5-5  $\mu\text{m}$ ) de 350 ml (ChemGlass CG1402-28, diámetro de 90mm). El filtrado se recogió en un frasco de brazo lateral mientras se aplicaba vacío durante aproximadamente 4-6 horas. Como una opción, la torta se puede lavar con 100 ml de  $\text{ZnCl}_2$  1% frío y el filtrado se puede recoger por separado. La torta se lavó con 100 ml agua helada, y el filtrado se recogió de nuevo. La torta además se lavó con 100 ml adicionales de etanol 100% helado y el filtrado se recogió una vez más. El lavado final de la torta fue 100 ml de agua helada fresca y se recogió el filtrado final. La torta se secó bajo vacío y/o se secó al aire durante 12-18 horas. Después del secado, la torta se raspó del embudo, se pesó, y los contenidos de humedad/proteína se midieron a través de HPLC. Los filtrados recogidos a partir de las diversas etapas de lavado además se analizaron por medio del uso del HPLC para determinar la concentración del Zn-HIM2 perdido durante el proceso. La filtración produjo un 2.5% p/p de contenido de Zn con un rendimiento global de 98%.

#### 60 9.1.8 Complejo de Zn tipo-T de HIM2 a pH neutro (escala 500 mg)

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH  $\sim$ 3 final con HCl 10%. Doscientos  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{ZnCl}_2$  10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 7.06 con hidróxido de amonio concentrado. La



solución se agitó a +5 durante 15 minutos y después se mantuvo a +5 durante dos días para permitir que ocurriera la formación del sólido.

5 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 10 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. Los lavados de agua se repitieron dos veces más. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador para secar durante dos días.

10

#### 9.1.9 Resultados para composiciones sólidas tipo-T

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

#### 15 9.2 Preparación y análisis de sólidos tipo-R

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

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

25 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 3400 RPM durante 15 minutos. El sobrenadante se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de agua DI fría. Esta solución se centrifugó a 3200 RPM durante 15 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. La muestra se lavó después con 5 ml de EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 3200 RPM durante 15 minutos antes de que el EtOH se decantara. De nuevo la muestra se lavó con 5 ml de EtOH frío, sin embargo, no se centrifugó. El sólido se dejó sedimentar en el fondo del tubo y después se colocó en el vacío a velocidad para secar.

30

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

35 Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 20 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Sesenta y seis microlitros de fenol licuado se añadieron a una alícuota de 10 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 6.43 con hidróxido de amonio concentrado. Trescientos veinte µl de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente durante cuatro días para permitir que se formara más precipitado.

40 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara y el sólido se lavara con otros 5 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. De nuevo, la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. La muestra se lavó con 5 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se liofilizó durante tres días.

45

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

5 Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 30 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Noventa y nueve microlitros de fenol licuado se añadieron a una alícuota de 10 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 6.47 con hidróxido de amonio concentrado. Después, 480 µl de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente durante cuatro días para permitir que se formara más precipitado.

10 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara y el sólido se lavara con otros 5 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. De nuevo, la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. La muestra se lavó con 5 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se liofilizó durante tres días.

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

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

20 Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 50 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Ciento sesenta y cinco microlitros de fenol licuado se añadieron a una alícuota de 10 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 6.82 con hidróxido de amonio concentrado. Ochocientos µl de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente durante cuatro días para permitir que se formara más precipitado.

25 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó, y el sólido se lavó con 5 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara y el sólido se lavara con otros 5 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. De nuevo, la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. La muestra se lavó con 5 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se liofilizó durante tres días.

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

35 Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Ciento sesenta y cinco microlitros de fenol licuado se añadieron a una alícuota de 50 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 6.42 con hidróxido de amonio concentrado. Ochocientos µl de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente durante siete días para permitir que se formara más precipitado.

40 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 10 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. Dos lavados de agua más se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador durante cuatro días.

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

50 Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Ciento quince microlitros de fenol licuado se añadieron a 450 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 7.1 con hidróxido de amonio concentrado. Ciento dieciocho µl de una solución de 10% ZnCl<sub>2</sub> se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente toda la noche para permitir que se formara más precipitado.

55 La reacción que se realizó anteriormente se dividió en tres ensayos de filtración. En el ensayo uno, la mezcla de reacción se filtró a través de un embudo fritado fino y después se lavó con una solución de ZnCl<sub>2</sub> 1%. El material se secó toda la noche a través de filtración a vacío. El segundo ensayo se filtró sobre un filtro fritado medio que además contenía papel de filtro. La sustancia después se lavó con etanol y agua y se secó toda la noche a través de filtración al vacío. Por último, el tercer ensayo se filtró a través de un embudo fritado fino, se lavó con una solución de ZnCl<sub>2</sub> 1% y además se lavó con etanol y agua. Este material además se secó toda la noche bajo filtración al vacío.

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

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

5 Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Ciento sesenta y cinco microlitros de fenol licuado se añadieron a 50 ml de la solución anterior. Después, doscientos microlitros de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 7.18 con hidróxido de amonio concentrado. La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante dos días para permitir que el precipitado se formara.

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

9.2.8 Resultados para composiciones sólidas tipo-R

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

20

9.3 Preparación y análisis de sólidos de protamina

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

25

La protamina se añadió a una solución madre de HIM2 10 g/l que tenía un pH ~3 final con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 10 ml (proteína 100 mg) de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Doscientos microlitros de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó con hidróxido de amonio concentrado a un pH ~5. La solución se agitó a +5 °C durante 15 minutos y después se mantuvo a +5 °C  
30 durante dos días para permitir que ocurriera la formación del sólido.

30

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 10 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. Dos lavados más de H<sub>2</sub>O se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó  
35 después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador durante dos días.

35

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

40

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 30 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Un mililitro de ácido acético glacial se añadió a una alícuota de 50 ml (proteína 1.5 g) de la solución anterior. Seiscientos microlitros de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la reacción seguido por la adición de 225 miligramos de protamina. El pH se ajustó a 6.95 con hidróxido de amonio concentrado y la reacción se mantuvo durante dos días a +5 °C para permitir que ocurriera la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 10 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. Dos lavados más de H<sub>2</sub>O se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador durante tres días

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

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Se añadió fenol licuado (2.48 ml) a una alícuota de 150 ml (proteína 1.5 g) de la solución anterior. El pH de la reacción se ajustó con hidróxido de amonio concentrado a un pH ~ 6.57. Doce microlitros de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la reacción seguido por la adición de 225 miligramos de protamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de mantenerla durante dos días temperatura ambiente para permitir que ocurriera la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 50 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. Dos lavados más de H<sub>2</sub>O se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador durante dos días.

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

Se preparó una solución de HIM2 a aproximadamente 10 g/l a un pH ~3 final con HCl 10%. Se añadió fenol licuado (495 ml) a 150 ml de reacción. Después, 600 mililitros de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la reacción seguido por la adición de 75 mg de protamina. El pH se ajustó con hidróxido de amonio concentrado a un pH 7.01. La reacción se mantuvo durante tres días a temperatura ambiente para permitir la formación del sólido.

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 50 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. Dos lavados más de H<sub>2</sub>O se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 50 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2800 durante 15 minutos antes de que el EtOH se decantara. Dos lavados más de EtOH se llevaron a cabo de la misma manera antes de que la muestra se colocara en el liofilizador durante dos días.

### 9.3.5 Resultados para las composiciones sólidas de protamina

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

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

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

Un diconjugado de compuesto de insulina que tiene una porción modificadora -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>OCH<sub>3</sub> acoplado a B29 y A1 de la insulina humana (DICON-1) se añadió a la solución a aproximadamente 10 g/l y se preparó a un pH 3.15 final con HCl 10%. Se añadió ácido acético glacial a una alícuota de 3.75 ml de la solución anterior a una concentración final de 0.25 M. Después 15 µl de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 4.90 con

hidróxido de amonio concentrado. La solución se agitó durante 15 minutos a +5°C y después se mantuvo durante seis días a +5°C para permitir la formación del sólido (produjo un sólido blanco).

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

Se añadió DICON-1 a la solución a aproximadamente 10 g/l y se preparó a un pH 3.15 final con HCl 10%. Aproximadamente 12 µl de fenol licuado se añadieron a una alícuota de 3.75 ml de la solución anterior. El pH se ajustó a 5.75 con hidróxido de amonio concentrado. Sesenta µl de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la muestra. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se mantuvo a temperatura ambiente durante seis días para permitir que se formara más precipitado (produjo un sólido blanco).

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara y el sólido se lavara con otros 5 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. De nuevo, la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. La muestra se lavó con 5 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2600 RPM durante 20 minutos antes de que el EtOH se decantara. La muestra se liofilizó durante seis días.

#### 9.4.3 Diconjugado B1, B29 (10 mg/ml)

Se añadió DICON-1 a la solución a aproximadamente 10 g/l y se añadieron 33 µl de fenol licuado. El pH se ajustó a 5.34 con hidróxido de amonio concentrado. Después 160 µl de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la muestra. La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante dos semanas para permitir que ocurriera la formación del sólido (produjo un sólido blanco).

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó tres veces con 5 ml H<sub>2</sub>O DI fría. La solución se centrifugó durante 15 minutos a 2800 RPM y se decantó después de cada lavado. La muestra después se lavó tres veces con 5 ml de EtOH 200 proof frío. De nuevo la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 15 minutos y se decantó después de cada lavado. La muestra se liofilizó durante dos días.

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

Se añadió DICON-1 a la solución a aproximadamente 20 g/l y se añadieron 66 microlitros de fenol licuado. El pH se ajustó a 7.65 con hidróxido de amonio concentrado. Después 320 µl de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la muestra. La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante dos semanas para permitir que ocurriera la formación del sólido (produjo un sólido blanco).

La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó tres veces con 5 ml H<sub>2</sub>O DI fría. La solución se centrifugó durante 15 minutos a 2800 RPM y se decantó después de cada lavado. La muestra después se lavó tres veces con 5 ml de EtOH 200 proof frío. De nuevo la muestra se centrifugó a 2600 RPM durante 15 minutos y se decantó después de cada lavado. La muestra se liofilizó durante dos días.

### 9.5 Preparación y análisis de sólidos IN105 tipo-T

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

Una solución de IN105 a aproximadamente 10 g/l (100 mg) se preparó que tiene un pH ~3 final con HCl 10%. 50 µl de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% p/p se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 7.52 con hidróxido de amonio concentrado. La solución turbia se agitó y después se dejó reposar durante cinco días a temperatura ambiente para permitir la formación de sólido.

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

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

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

La mezcla de reacción se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado (fino) bajo vacío. El embudo de vidrio sinterizado con el material filtrado se colocó bajo vacío en un desecador de vidrio toda la noche para dar como resultado un polvo fino blanco (900 mg).

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

Una solución de IN105 a aproximadamente 10 g/l (5 g, lot#Nobex040706L) se preparó a un pH ~3 final con HCl 10%. Dos ml de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la muestra. El pH se ajustó a 7.4 con hidróxido de amonio concentrado. La solución turbia después se dejó reposar a temperatura ambiente toda la noche para permitir la formación del sólido antes de la filtración.

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

#### 9.5.4 Resultados para las composiciones sólidad IN105 tipo-T

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

#### 9.6 Preparación y análisis de sólidos IN105 tipo-R

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

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

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

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

Una solución de IN105 a aproximadamente 10 g/l (4.2 g, lot#Nobex040706L) se preparó a un pH ~3 final con HCl 10%. Fenol licuado 1.5 y 1.8 ml de la solución ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la solución anterior. El pH se ajustó a -7.4 con hidróxido de amonio concentrado. La solución turbia se mantuvo a temperatura ambiente toda la noche para permitir que se formara más precipitado.

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

##### 9.6.3 Resultados para las composiciones sólidad IN105 tipo-R

Reacción	Observaciones	Solubilidad (mg/ml)*	% p/p Zn	% p/p fenol
----------	---------------	----------------------	----------	-------------

Reacción	Observaciones	Solubilidad (mg/ml)*	% p/p Zn	% p/p fenol
9.6.1	Sólido blanco	ND	1.85	2.37
9.6.2	Sólido blanco	10-25	1.71	2.66

ND = Sin datos  
\*En un amortiguador fosfato de pH aproximadamente 7.4

## 9.7 Preparación y análisis de sólidos IN105 de protamina

### 5 9.7.1 Preparación del complejo de Zn tipo-R de IN105 monoconjugado con protamina a pH ácido

10 Una solución de IN105 a aproximadamente 10 g/l se preparó a pH ~ 3 final con HCl 10%. Se añadió fenol licuado (248 ul) a una alícuota de 15 ml (150 mg de proteína) de la solución anterior. El pH de la reacción se ajustó con hidróxido de amonio concentrado a un pH ~ 6.50. Un microlitro de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadió a la reacción seguido por la adición de 22.5 miligramos de protamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de mantenerla durante dos días temperatura ambiente para permitir que ocurriera la formación del sólido.

15 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. Dos lavados más de H<sub>2</sub>O se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 10 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el EtOH se decantara. Se llevaron a cabo dos lavados más de EtOH de la misma manera antes de que la muestra se seicara al vacío durante dos días.

### 20 9.7.2 Preparación del complejo de Zn tipo-R de IN105 conjugado con protamina a pH neutro

25 Una solución de IN105 a aproximadamente 10 g/l se preparó a pH ~ 3 final con HCl 10%. Se añadió fenol licuado (49.5 ul) a 15 ml de reacción. Después, 60 microlitros de una solución de ZnCl<sub>2</sub> 10% se añadieron a la reacción seguido por la adición de 7.5 mg de protamina. El pH se ajustó con hidróxido de amonio concentrado a un pH 7.00. La reacción se dejó reposar durante tres días a temperatura ambiente para permitir la formación del sólido.

30 La mezcla de reacción se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos. La solución se decantó y el sólido se lavó con 5.0 ml de H<sub>2</sub>O DI fría. Esta solución se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el H<sub>2</sub>O se decantara. Dos lavados más de H<sub>2</sub>O se produjeron de la misma manera. La muestra se lavó después con 50 ml EtOH 200 proof frío y se centrifugó a 2800 RPM durante 15 minutos antes de que el EtOH se decantara. Se llevaron a cabo dos lavados más de EtOH de la misma manera antes de que la muestra se seicara al vacío durante dos días.

### 35 9.7.3 Preparación del complejo de Zn cristalino tipo-R de IN105

40 Una solución cruda de IN105 15 mg/ml que contenía 25% orgánico se ajustó pH a 3.47 por medio del uso de HCl 1M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua a 40-60°C y se añadieron 0.218 ml al frasco de reacción. Después, 0.4 ml de la solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acuosa acidificada se añadieron a la reacción. El pH de la solución se ajustó con NaOH 1M a un pH 6.6 final. Mientras se ajustaba el pH, se sacaron alícuotas de 10 ml a los siguientes valores de pH: 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.4 y 6.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Cristales tipo aguja se observaron bajo el microscopio.

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

45 Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo MPEG<sub>3</sub> se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.81 con HCl 1M. Fenol licuado, 0.040 ml, y EtOH 95%, 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 0.400 ml de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.7 a 5.4 por medio del uso de NaOH 50% y se sacaron alícuotas de 1 ml a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.0, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 50 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja (véase la Figura 5) a partir del intervalo de pH 4.0 a 5.2.

### 55 9.7.5 Preparación del complejo de Zn cristalino tipo-R de IN105 en amortiguador acetato de amonio 100 mM (EtOH 30, 20 y 10%)

Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo MPEG<sub>3</sub> se preparó en amortiguador acetato de amonio 100 mM y el pH se ajustó a 2.8 con HCl 5M. Fenol licuado, 0.040 ml, y EtOH 95%, 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 0.400 ml de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la

solución se ajustó a partir de 2.9 a 5.6 por medio del uso de  $\text{NH}_4\text{OH}$  5M y se sacaron alícuotas de 0.5 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja a partir del intervalo de pH 4.4 a 4.8.

5

Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo  $\text{MPEG}_3$  se preparó en amortiguador acetato de amonio 100mM y el pH se ajustó a 2.8 con HCl 5M. Fenol licuado, 0.040 ml, y EtOH 95%, 2.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 0.400 ml de una solución  $\text{ZnCl}_2$  4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.9 a 5.6 por medio del uso de  $\text{NH}_4\text{OH}$  5M y se sacaron alícuotas de 0.5 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo círculo a partir del intervalo de pH 4.8 a 5.4.

10

Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo  $\text{MPEG}_3$  se preparó en amortiguador acetato de amonio 100mM y el pH se ajustó a 2.8 con HCl 5M. Fenol licuado, 0.040 ml, y EtOH 95%, 1.15 ml, se añadieron a la solución. Después, 0.400 ml de una solución  $\text{ZnCl}_2$  4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.8 a 5.6 por medio del uso de  $\text{NH}_4\text{OH}$  5M y se sacaron alícuotas de 0.5 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja a partir del intervalo de pH 5.0 a 5.6.

15

20

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

Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo  $\text{MPEG}_3$  se preparó en amortiguador acetato de amonio 100 mM y el pH se ajustó a 3.0 con HCl 5M. Fenol licuado, 0.010 ml, y EtOH 95%, 2.5 ml, se añadieron a la solución. Después, 0.400 ml de una solución  $\text{ZnCl}_2$  4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.2 a 5.6 por medio del uso de  $\text{NH}_4\text{OH}$  5M y se sacaron alícuotas de 0.5 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo círculo a partir del intervalo de pH 4.4 a 5.4.

25

30

Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo  $\text{MPEG}_3$  se preparó en amortiguador acetato de amonio 100 mM y el pH se ajustó a 3.0 con HCl 5M. Fenol licuado, 0.020 ml, y EtOH 95%, 2.5 ml, se añadieron a la solución. Después, 0.400 ml de una solución  $\text{ZnCl}_2$  4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.3 a 5.6 por medio del uso de  $\text{NH}_4\text{OH}$  5M y se sacaron alícuotas de 0.5 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo círculo a partir del intervalo de pH 4.4 a 5.2.

35

40

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

Una solución fresca de 15 mg/ml de compuesto de insulina propionilo  $\text{MPEG}_3$  se preparó en amortiguador acetato de amonio 250 mM y el pH se ajustó a 2.0 con HCl 5M. Fenol licuado, 2.13 ml, y EtOH 95%, 225 ml, se añadieron a la solución. Después, 21.3 ml de una solución  $\text{ZnCl}_2$  4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a 4.8 por medio del uso de  $\text{NH}_4\text{OH}$  5M. La solución se dejó asentar sin agitación durante 24 horas antes de que los cristales se recogieran. Se observaron cristales tipo-aguja en la foto del microscopio a  $T=0$ .

45

Los cristales se recogieron por separación de la mezcla de reacción en 6X250 ml tubos de centrifuga. Los tubos se centrifugaron a 10,000RPM durante 8 minutos a  $10^\circ\text{C}$  antes de que el sobrenadante se decantara. Después, a cada tubo, se le añadieron 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  fría antes de concentrar los 6 tubos en 2 tubos. El proceso de centrifuga se repitió una vez más con agua fría y dos veces más con EtOH frío. Los cristales después se secaron con un liofilizador de sobremesa durante 2 días. El procedimiento produjo 93% de rendimiento (p/p) relativo al material de partida.

50

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

Una solución fresca del compuesto de insulina propionilo  $\text{MPEG}_3$  (IN105) se preparó por disolución de 1.52 g de IN105 sólido en 100 ml de acetato de amonio 250 mM pH 7.5. La solución se ajustó a 2.8 por medio del uso de HCl 5M/ $\text{NH}_4\text{OH}$  5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente  $40-60^\circ\text{C}$ . Se añadieron al frasco de reacción 400  $\mu\text{l}$  fenol fundido y 42.5 ml de EtOH 95%. Después 4 ml de  $\text{ZnCl}_2$  4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. La solución resultante después se ajustó a pH 4.8 por medio del uso de  $\text{NH}_4\text{OH}$  5M. La reacción después se dejó asentar sin agitación durante 48 horas antes de que los cristales se recogieran. Se observó la formación de cristales tipo aguja después de 21 horas a través del microscopio.

55

60

Los cristales se recogieron por separación de la suspensión acuosa de reacción entre 4 x 50 ml tubos de centrifuga. Los tubos se centrifugaron inicialmente a 1000 RPM durante 8 min. El sobrenadante después se decantó. Los cristales en

65



cada tubo se lavaron con 1 x 5 ml alícuota de H<sub>2</sub>O helada después se centrifugaron a 3000 RPM durante 8 min. El sobrenadante después se decantó. Se repitió el procedimiento de lavado/centrifugado con 1 x 5 ml alícuota de H<sub>2</sub>O helada después con 1 x 5 ml alícuota de EtOH helado. Los cristales después se secaron en un desecador de vacío toda la noche. El procedimiento produjo 73% de rendimiento (p/p) relativo al material de partida.

5

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

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

10

15

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

20

25

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

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

30

35

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

40

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

Una solución fresca del compuesto de insulina propionilo MPEG3 (IN105) se preparó por disolución de 10.06 g de IN105 sólido en 670 ml de acetato de amonio 250 mM pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.6 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 2.7 ml fenol fundido y 285 ml de EtOH 95%. Después 27 ml de ZnCl<sub>2</sub> 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. La solución resultante después se ajustó a pH 4.8 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M. La reacción después se dejó asentar sin agitación durante 21 horas antes de que los cristales se recogieran. La mezcla de reacción parecía ser completamente cristalina después de 2.5 horas a través del microscopio.

50

Los cristales se recogieron por separación de la suspensión acuosa de reacción entre 6 x 250 ml tubos de centrifuga. Los tubos se centrifugaron inicialmente a 10°C, 10,000 RPM durante 8 min. El sobrenadante después se decantó. Los cristales en cada tubo se lavaron con 1 x 10 ml alícuota de H<sub>2</sub>O helada, y se concentraron en 2 x 250 ml tubos de centrifuga después se centrifugaron a 10°C, 10,000 RPM durante 8 min. El sobrenadante después se decantó, se repitió el procedimiento de lavado/centrifugado con 1 x 30 ml alícuota de H<sub>2</sub>O helada después con 2 x 30 ml alícuotas de EtOH helado y una alícuota final 1 x 30 ml de H<sub>2</sub>O helada. Los cristales después se secaron en un desecador de vacío toda la noche. El procedimiento produjo 89% de rendimiento (p/p) relativo al material de partida.

55

60

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

#### 9.8.1 Preparación del complejo de Zn tipo-R de HIM2

- 5 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.95 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 3.5 ml, se añadieron a la solución. Después, 600ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.14 a 6.0 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4 (véase la Figura 6A), 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 (véase la Figura 6B), 5.6, 5.8, 6.0. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja a pH 4.4. El intervalo de pH a partir de 4.6- 6.0 mostró sólidos tipo cristalinos grandes de diversas formas y tamaños.
- 10 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.95 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 3.5 ml, se añadieron a la solución. Después, 400ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.22 a 6.0 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2 (véase la Figura 7A), 5.4, 5.6, 5.8, 6.0. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron sólidos tipo cristalinos a partir de pH 4.2-6.0 de diversas formas y tamaños.
- 20 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.95 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 3.5 ml, se añadieron a la solución. Después, 200ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.19 a 6.0 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 (véase la Figura 7B), 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron sólidos tipo cristalinos a partir de pH 4.4-4.6 de diversas formas y tamaños. El intervalo de pH 4.8-5.2 mostró cristales tipo aguja más uniformes.
- 25 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.95 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 2.6 ml, se añadieron a la solución. Después, 600ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.04 a 6.0 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 (véase la Figura 8A), 5.6, 5.8, 6.0. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo copo de nieve plano a partir de pH 4.6-5.4.
- 30 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.95 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 2.6 ml, se añadieron a la solución. Después, 400ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.05 a 6.0 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 (véase la Figura 8B), 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja a pH 5.0, sólidos tipo cristales a pH 5.2 y cristales tipo copo de nieve planos a pH 5.4.
- 40 *Rxn 6* Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.95 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95%, 2.6 ml, se añadieron a la solución. Después, 200ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.09 a 6.0 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 (véase la Figura 9A), 5.6, 5.8, 6.0. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja y sólido tipo cristal a pH 4.8-5.6.
- 45 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 250ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.97 a 5.8 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron precipitación tipo cristal a partir de pH 4.6-5.8
- 50 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95%, 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 200 ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.06 a 5.8 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 (véase la Figura 9B), 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron precipitación tipo cristal a partir de pH 4.6-5.6
- 55 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95% , 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 150ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.09 a 5.8 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8,
- 60

5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales de diversos tamaños y formas a partir de pH 5.0-5.2.

5 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 40ul, y EtOH 95%, 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 100ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.09 a 5.8 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 (véase la Figura 10A), 5.2, 5.4 (véase la Figura 10B), 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja a pH 5.0 y diversas formas y tamaños del material cristalino a partir de pH 5.2-5.6.

15 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 20ul, y EtOH 95% , 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 250ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.08 a 5.8 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron precipitación tipo cristal a partir de pH 4.8-5.8

20 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 20ul, y EtOH 95%, 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 200ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.05 a 5.8 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron muy pocos sólidos tipo cristal.

25 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 20ul, y EtOH 95% , 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 200ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.05 a 5.8 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron muy pocos sólidos tipo cristal.

35 Una solución fresca 15 mg/ml de HIM2 se preparó en amortiguador acetato de amonio 250mM y el pH se ajustó a 2.76 con HCl 5M. Fenol licuado, 20ul, y EtOH 95% , 4.25 ml, se añadieron a la solución. Después, 100ul de una solución ZnCl<sub>2</sub> 4% acidificada se añadieron a la mezcla de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.06 a 5.8 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 500ul en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 24 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron muy pocos sólidos tipo cristal.

#### 40 9.9 Co-cristalización de HIM2 e IN105 con zinc

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

##### 45 9.9.2 50:50 (HIM2:IN105)

50 Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó por disolución de 37.3 mg de HIM2 y 36.4 mg de IN105 en 4 ml de acetato de amonio 250mM, pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.84 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60 °C. Se añadieron al frasco de reacción 16μl de fenol fundido y 1.75 ml de EtOH 95%. Después, 80μl de ZnCl<sub>2</sub> 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.19 a 5.60 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.500 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 4 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 4 horas mostraron diversos tamaños y formas de los cristales a partir del intervalo de pH 4.4 a 5.6.

55 Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó por disolución de 37.1 mg de HIM2 y 35.9 mg de IN105 en 4 ml de acetato de amonio 250 mM, pH 7.5. La solución se ajustó a pH 3.03 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 16μl fenol fundido y 1.75 ml de EtOH 95% . Después, 40ul de ZnCl<sub>2</sub> 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. El pH de la solución después se ajustó a partir de 3.38 a 5.60 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.500 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 (véase la Figura 11A), 5.2 (véase la Figura 11B), 5.4 y 5.6 (véase la Figura 12A). Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 4 horas. Las fotos del microscopio tomadas después de 4 horas mostraron cristales tipo aguja, en su mayoría cortos a partir del intervalo de pH 4.6 a 5.6.

##### 60 9.9.3 70:30 (HIM2:IN105)

65

5 Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó por disolución de 53.4 mg de HIM2 y 23.2 mg de IN105 en 4 ml de acetato de amonio 250 mM, pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.62 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 16µl fenol fundido y 1.75 ml de EtOH 95% . Después, 80ul de ZnCl<sub>2</sub> 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.02 a 5.60 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.500 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2 (véase la Figura 12B), 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 1 hora. Las fotos del microscopio tomadas después de 1 hora mostraron diversos tamaños y formas de precipitación tipo cristal a partir del intervalo de pH 4.4 a 5.6.

10 Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó por disolución de 53.6 mg de HIM2 y 24.5 mg de IN105 en 4 ml de acetato de amonio 250 mM, pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.89 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 16µl de fenol fundido y 1.75 ml de EtOH 95% . Después, 40ul de ZnCl<sub>2</sub> 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.28 a 5.60 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.500 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2 (véase la Figura 13A), 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 1 hora. Las fotos del microscopio tomadas después de 1 hora mostraron en su mayoría diversos tamaños y formas de precipitación tipo cristal a partir del intervalo de pH 4.6 a 4.8 y muchos, cristales tipo aguja cortas a partir del intervalo de pH 5.0 a 5.4.

20 9.9.4 30:70 (HIM2:IN105)

25 Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó por disolución de 23.3 mg de HIM2 y 54.7 mg de IN105 en 4 ml de acetato de amonio 250 mM, pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.84 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 16µl fenol fundido y 1.75 ml de EtOH 95% . Después, 80µl de ZnCl<sub>2</sub> 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.27 a 5.60 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.500 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 1 hora. Las fotos del microscopio tomadas después de 1 hora mostraron en su mayoría diversos tamaños y formas de precipitación tipo cristal a partir del intervalo de pH 4.4 a 5.0 y pocos cristales tipo aguja a partir del intervalo de pH 5.2 a 5.6.

35 Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó por disolución de 24.8 mg de HIM2 y 54.9 mg de IN105 en 4 ml de acetato de amonio 250 mM, pH 7.5. La solución se ajustó a pH 3.09 por medio del uso de HCl 5M. El fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40-60° C. Se añadieron al frasco de reacción 16µl fenol fundido y 1.75 ml de EtOH 95% . Después, 40µl de ZnCl<sub>2</sub> 4% acuoso acidificado se añadieron al frasco de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 3.47 a 5.60 por medio del uso de NH<sub>4</sub>OH 5M y se sacaron alícuotas de 0.500 ml en cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 y 5.6 (véase la Figura 13B). Las muestras se dejaron asentar sin agitación durante 1 hora. Las fotos del microscopio tomadas después de 1 hora mostraron en su mayoría diversos tamaños de precipitación tipo cristal circular a partir del intervalo de 4.4 a 5.0 y cristales de diversas formas y tamaños a partir de del intervalo de pH 5.2 a 5.6.

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

45 9.9.6 50:50 (HIM2:IN105)

50 Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó al disolver 37.4mg de HIM2 y 35.9mg de IN105 en 4 mL de 250 mM acetato amónico pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.60 usando HCl 5M. Fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40 a 60° C. 16µL de fenol fundido y 1.75mL de EtOH 95% se añadieron al matraz de reacción. Después, 40uL de ZnCl<sub>2</sub> acuoso acidificado al 4% se añadió al matraz de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.15 a 5.60 mediante el uso de 5M NH<sub>4</sub>OH y extrayendo alícuotas de 0.500mL a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6,4.8, 5.0, 5.2, 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron reposar sin agitación durante 24 horas. Las imágenes del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron sólidos de cristal de varias formas y tamaños desde pH=4.6-5.6.

55 9.9.7 70:30 (HIM2:IN105)

60 Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó al disolver 57.0mg de HIM2 y 24.5mg de IN105 en 4 mL de 250 mM acetato amónico pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.43 usando HCl 5M. Fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40 a 60° C. 16µL de fenol fundido y 1.75mL de EtOH 95% se añadieron al matraz de reacción. Después, 40uL de ZnCl<sub>2</sub> acuoso acidificado al 4% se añadió al matraz de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.92 a 5.60 mediante el uso de 5M NH<sub>4</sub>OH y extrayendo alícuotas de 0.500mL a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6 (véase Figura 14A), 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron reposar sin agitación durante 24 horas. Las imágenes del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja desde pH 5.0-5.2.

65 9.9.8 30:70 (HIM2:IN105)

Una solución fresca de HIM2 e IN105 se preparó al disolver 24.1mg de HIM2 y 53.8mg de IN105 en 4 mL de 250 mM acetato amónico pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.35 usando HCl 5M. Fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40 a 60° C. 16µL de fenol fundido y 1.75mL de EtOH 95% se añadieron al matraz de reacción. Después, 40µL de ZnCl<sub>2</sub> acuoso acidificado al 4% se añadió al matraz de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.60 a 5.60 mediante el uso de 5M NH<sub>4</sub>OH y extrayendo alícuotas de 0.500mL a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0 (véase Figura 14B), 5.2, 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron reposar sin agitación durante 24 horas. Las imágenes del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo aguja desde pH 5.0-5.2.

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

##### 9.9.10 50:50 (IHM2:Insulina)

Una solución fresca de HIM2 e insulina se preparó al disolver 39.2mg de HIM2 y 36.7mg de insulina en 4 mL de 250 mM acetato amónico pH 7.5. La solución se ajustó a pH 2.53 usando HCl 5M. Fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40 a 60° C. 16µL de fenol fundido y 1.75mL de EtOH 95% se añadieron al matraz de reacción. Después, 40µL de ZnCl<sub>2</sub> acuoso acidificado al 4% se añadió al matraz de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.82 a 5.60 mediante el uso de 5M NH<sub>4</sub>OH y extrayendo alícuotas de 0.500mL a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2 (véase Figura 15A), 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron reposar sin agitación durante 24 horas. Las imágenes del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron varias formas y tamaños de sólido tipo cristal desde pH 5.2 y 5.4. Se observaron muchos cristales diminutos, en forma de aguja a pH 5.6.

##### 9.9.11 70:30 (IHM2:Insulina)

Una solución fresca de HIM2 e insulina se preparó al disolver 56.5mg de HIM2 y 20.2mg de insulina en 4 mL de 250 mM acetato amónico pH 7.5. La solución se ajustó a pH 3.23 usando HCl 5M. Fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40 a 60° C. 16µL de fenol fundido y 1.75mL de EtOH 95% se añadieron al matraz de reacción. Después, 40µL de ZnCl<sub>2</sub> acuoso acidificado al 4% se añadió al matraz de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.82 a 5.60 mediante el uso de 5M NH<sub>4</sub>OH y extrayendo alícuotas de 0.500mL a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 y 5.6. Las muestras se dejaron reposar sin agitación durante 24 horas. Las imágenes del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron varias formas y tamaños de sólido tipo cristal desde pH 5.2 and 5.6.

##### 9.9.12 30:70 (IHM2:Insulina)

Una solución fresca de HIM2 e insulina se preparó al disolver 21.8mg de HIM2 y 49.2mg de insulina en 4 mL de 250 mM acetato amónico pH 7.5. La solución se ajustó a pH 3.23 usando HCl 5M. Fenol sólido se fundió en un baño de agua caliente 40 a 60° C. 16µL de fenol fundido y 1.75mL de EtOH 95% se añadieron al matraz de reacción. Después, 40µL de ZnCl<sub>2</sub> acuoso acidificado al 4% se añadió al matraz de reacción. El pH de la solución se ajustó a partir de 2.93 a 5.60 mediante el uso de 5M NH<sub>4</sub>OH y extrayendo alícuotas de 0.500mL a cada uno de los siguientes pH deseados: 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4 (véase Figura 15B) y 5.6. Las muestras se dejaron reposar sin agitación durante 24 horas. Las imágenes del microscopio tomadas después de 24 horas mostraron cristales tipo copo de nieve, planos a pH 4.8. A pH 5.0, hubo una mezcla de cristales tipo agujas y copo de nieve. A partir de pH 5.2-5.6 se observaron muchos cristales pequeños, similares a agujas.

#### 10 Solubilidad acuosa de los complejos de Zn

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

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

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

Los conjugados de compuestos de insulina (IN105) se proporcionaron en 10 mM de regulador de fosfato sódico (a pH de aproximadamente 7.4) y sus concentraciones se determinaron por HPLC (las soluciones se diluyen con amortiguador

- de manera que las comparaciones equimolares pueden realizarse entre parentales and conjugados ~0.6 mg/mL). La enzima quimotripsina liofilizada se resuspendió en HCl 1 mM a una concentración de ~7.53 U/mL. Una alícuota de 1.53 mL de cada muestra se añadió a tubos de muestra y 0.850 mL en tubos de control. Las muestras se probaron por duplicado junto con cuatro tubos de control por muestra. Las alícuotas se incubaron a 37°C en un termomezclador por 15 minutos. Después 17 µL de enzima quimotripsina se añadió a cada tubo de muestra. Cinco µL de HCl 1 mM se añadió a cada tubo de control. Inmediatamente después de las adiciones, se eliminaron 200 µL de la muestra y los tubos de control y se colocaron en 50 µL de TFA al 1% previamente en alícuotas en los tubos de centrifuga. Esta muestra sirve como T=0.
- 10 El procedimiento de muestreo para el compuesto de insulina (libre de Zn), IN105 (libre de Zn) y compuesto de insulina (compuesto de insulina regular) se repitió en los siguientes intervalos: 0, 2, 5, 8, 12, 15, y 30 minutos. El procedimiento de control se repitió en los siguientes intervalos: 0, 8, 15, 30 minutos. Para las muestras de tipo T y tipo R, el procedimiento se repitió en los siguientes intervalos: 0, 5, 8, 12, 30, 40 y 60 minutos. El procedimiento de control para los complejos de Zn se repitió en los siguientes intervalos: 0, 12, 40 y 60 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el análisis que puede ocurrir a través de HPLC. HPLC se llevó a cabo para determinar el porcentaje degradación relativo a la T= 0 minuto respectiva para cada digestión. El logaritmo natural del porcentaje restante se graficó contra el tiempo y se ejecutó una regresión lineal para cada digestión. La media vida se calculó mediante el uso de la ecuación:  $t_{1/2} = -0.693/\text{pendiente}$ .
- 15
- 20 Resultados a 0.6 mg/ml proteína:

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

- 12 Ejemplos de Formulación
- 25 12.1 Ejemplos de Formulación líquida
- 12.1.1 Solución amortiguadora para el estudio del amortiguador Zn-HIM2 tipo R6

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

- 30 12.1.2 Preparación de la formulación líquida oral diluyente de ácido cáprico/ácido láurico

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

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

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

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

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

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

Se prepararon muestras líquidas orales que contenían 1 mg/mL de proteína equivalente de Zn HIM2 tipo R (ZnHIM2-R). El ZnHIM2-R se eliminó del congelador (-20 °C), se colocó en un desecador y se dejó llegar a temperatura ambiente. Un 1 mg/mL de proteína equivalente de ZnHIM2-R se preparó en solución diluyente líquida oral como sigue. Se pesaron 6.4 mg de ZnHIM2-R. Después, 5.0 mL de diluyente líquido oral se transfirió en el contenedor y se agitó suavemente para mezclar. La solución demoró aproximadamente 45 minutos en disolverse. La solución resultante fue una suspensión (aparición turbia). Antes de la dosificación, la solución se agitó suavemente por 60 segundos para asegurar que la

solución fuera una solución homogénea. Para ZnHIM2-R, el contenido de proteína fue 78.6%, 1 mg/mL de proteína equivalente, cantidad = 5 mL. Cantidad de ZnHIM2-R =  $(1 \text{ mg/mL}) / (0.786) \times (5.0 \text{ mL}) = 6.4 \text{ mg}$ . concentración de ZnHIM2-R =  $(6.4 \text{ mg}) / (5.0 \text{ mL}) = 1.28 \text{ mg/mL}$  (equivalente para 1 mg/mL ajustado al contenido de proteína).

5 12.1.4 Preparación de formulaciones líquidas de ácido cáprico

10 Se transfirieron aproximadamente 60% del volumen requerido de agua estéril en un contenedor adecuado. Se añadió la cantidad adecuada (como se indica en la tabla más abajo) de trometamina, trolamina, ácido cítrico anhidro, y bolitas de hidróxido sódico al contenedor y se mezcló bien hasta disolverse. Se ajustó la temperatura a 21 - 25° C (o temperatura ambiente) y se midió el pH del líquido. Se ajustó el pH a 7.7 - 7.9 según fuera necesario mediante el uso de hidróxido sódico 1N o ácido clorhídrico 1N. Después, se ajustó la temperatura a 45 - 50° C por calentamiento sobre una placa calefactora y se mantiene esta temperatura. A continuación, se añadió el ácido cáprico a la solución caliente y se mezcló hasta que el ácido cáprico se disolvió. Se ajustó la temperatura a 21 - 25° C (o temperatura ambiente) y se midió el pH del líquido. Según fuera necesario, se ajustó el pH a 7.7 - 7.9 mediante el uso de hidróxido sódico 1N o ácido clorhídrico 1N. Después se mezcló la solución por 5 minutos. Se añadió una cantidad adecuada de agua estéril a igual a 15 100% del volumen requerido y se mezcló bien.

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

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

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

25 Preparación de 100 mM de amortiguador de fosfato sódico, pH 7.8 o 8.2. Se transfirieron 1.17 gramos de fosfato monosódico monohidrato a un matraz de 1-L. Aproximadamente 500 mL de agua estéril se añadieron y se mezcló bien hasta que se disolvió. Después se añadieron 24.58 gramos de fosfato dibásico sódico heptahidrato y se mezcló bien hasta que se disolvió. Se diluyó hasta volumen con agua estéril y se mezcló bien. Se filtró a través de un filtro de 0.22 30 µm. Se ajustó el pH a 7.8 o 8.2 con HCl 1N o NaOH 1N.

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

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

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

Componente	% p/p
Caprato de sodio	1.94
Laurato de sodio	2.22



Componente	% p/p
100 mM amortiguador de fosfato sódico, pH 7.8	Csp para 100%

12.1.6 Formulación líquida con arginina o trolamina

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

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

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

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

12.1.7 Formulación líquida con ácido caprílico

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

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

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

12.1.8 Formulación líquida con ácido linoleico

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

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

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

### 12.1.9 Preparación de formulaciones líquidas de ácido cáprico y ácido láurico

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

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

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

### 12.2 Ejemplos de formulación de dosificación sólida

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

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

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

ES 2 618 028 T3

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

5 La prueba de disolución se llevó a cabo mediante el uso de una unidad de disolución del aparato USP 2. El medio era agua, velocidad de la paleta 50 rpm, y el volumen del medio fue 500 mL. Las muestras de disolución se analizaron por HPLC mediante el uso de un sistema gradiente. Las fases móviles fueron agua con 0.TFA al 1% (fase móvil A) y acetonitrilo con 0.TFA al 1% (fase móvil B). El gradiente utilizado fue: 0 minutos 100% fase móvil A, 11 minutos 65% fase móvil A, 15 minutos 20% fase móvil A, 16 minutos 20% fase móvil A, 17 minutos 100% fase móvil A. La longitud de onda fue 214 nm y la columna fue una C18 (150 × 2 mm). Las siguientes tablas y gráficos resumen los datos de disolución obtenidos para la prueba de disolución de la formulación de tabletas Nobex-Zn-IN105 [854] que contienen 6 mg de Zn-IN105 (proteína), 286 mg de manitol, 58 mg de caprato de sodio, 57 mg de laurato de sodio, y 30 mg de glicolato sódico de almidón (Explotab):

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

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

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

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

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

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

## ES 2 618 028 T3

Tiempo de muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto	Recipiente 2 (%) Disuelto	Promedio (%) Disuelto
60	91	90	91

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

Preparación de la formulación Nobex-IN105-[856]

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

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

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

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

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

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

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

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

## ES 2 618 028 T3

Tiempo de muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto	Recipiente 2 (%) Disuelto	Promedio (%) Disuelto
30	105	103	104
45	105	103	104
60	105	104	105

5

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

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

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

10

Preparación de la formulación Nobex-IN105-[859]

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

15

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

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

20

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

25

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

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

Tiempo de muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
45	88	88	88
60	87	89	88

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

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

5

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

Preparación de la formulación Nobex-IN105-[860]

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

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

15

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

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

25

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

Tiempo de la muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	28	19	24
10	53	44	49
15	70	68	69
30	92	90	91
45	92	92	92

## ES 2 618 028 T3

Tiempo de la muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
60	92	93	93

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

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

### 5 12.2.5 Forma de dosificación sólida (Tableta) Preparación de la Formulación 100 mg de caprato por Tableta

Preparación de la formulación Nobex-IN105-[861]

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

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

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

15 La prueba de disolución se llevó a cabo mediante el uso de una unidad de disolución del aparato USP 2. El medio era agua; velocidad de la paleta 50 rpm, y el volumen del medio fue 500 mL. Las muestras de disolución se analizaron por HPLC mediante el uso de un sistema gradiente. Las fases móviles fueron agua con 0.1% TFA al 1% (fase móvil A) y acetonitrilo con 0.1% TFA (fase móvil B). El gradiente utilizado fue: 0 minutos 100% fase móvil A, 11 minutos 65% fase móvil A, 15 minutos 20% fase móvil A, 16 minutos 20% fase móvil A, 17 minutos 100% fase móvil A. La longitud de onda fue 214 nm y la columna fue una C18 (150 × 2 mm). Las siguientes tablas y gráficos resumen los datos de disolución obtenidos para la prueba de disolución de la formulación de tabletas Nobex-Zn-IN105 que contienen 6 mg Zn-IN105 (proteína), 150 mg de manitol, 100 mg de caprato de sodio, y 25 mg de glicolato sódico de almidón (Explotab):

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

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

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

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

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

5 Preparación de la formulación Nobex-IN105-[862]

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

10

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

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

15

La prueba de disolución se llevó a cabo mediante el uso de una unidad de disolución del aparato USP 2. El medio era agua, velocidad de la paleta 50 rpm, y el volumen del medio fue 500 mL. Las muestras de disolución se analizaron por HPLC mediante el uso de un sistema gradiente. Las fases móviles fueron agua con 0.1% TFA al 1% (fase móvil A) y acetonitrilo con 0.1% TFA al 1% (fase móvil B). El gradiente utilizado fue: 0 minutos 100% fase móvil A, 11 minutos 65% fase móvil A, 15 minutos 20% fase móvil A, 16 minutos 20% fase móvil A, 17 minutos 100% fase móvil A. La longitud de onda fue 214 nm y la columna fue una C18 (150 x 2 mm). Las siguientes tablas y gráficos resumen los datos de disolución obtenidos para la prueba de disolución de la formulación de tabletas Nobex-Zn-IN105 que contienen 6 mg Zn-IN105 (proteína), 150 mg de manitol, 150 mg de caprato de sodio, y 25 mg de croscarmelosa de sodio (Explotab):.

20

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

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

25

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

Tempo de la muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
5	84	51	68



Tempo de la muestra (minutos)	Recipiente 1 (%) Disuelto)	Recipiente 2 (%) Disuelto)	Promedio (%) Disuelto)
10	98	88	93
15	98	97	98
30	98	98	98
45	98	98	98
60	98	98	98

13 Ejemplos *in vitro* de resistencia a enzimas

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

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

25 Resultados a 0.6 mg/ml proteína

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

Resultados a 0.3 mg/mL proteína

Muestra	T media	Contenido de Zinc	Contenido de fenol
Insulina (libre de zinc)	4-5 mins	--	--
HIM2 (libre de zinc)	7-9 mins	--	--
Insulina, USP (compuesto de insulina regular)	7-8 mins	0.4 a 1% p/p	---
HIM2 (complejo de zinc tipo R)	19-21 mins	1.1% p/p	0.1 a 0.25% p/p

Muestra	T media	Contenido de Zinc	Contenido de fenol
HIM2 (complejo de zinc tipo T)	12-15 mins	0.55 % p/p	---

#### 14 Ejemplos In vivo

##### 5 14.1 Ensayo extendido de glucosa en sangre en ratón (MBGA)

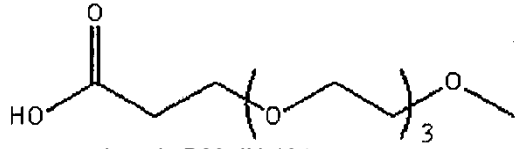
10 Seis grupos de dosis pareadas 5 ratones CF-1macho (Charles River Laboratories; 25-30 g) recibieron inyecciones subcutáneas del conjugado de compuesto de insulina (artículo de prueba) o ser insulina humana recombinante. El artículo de prueba se reconstituyó con amortiguador de fosfato (0.01M, a pH de aproximadamente 7.4) que contiene 0.1% p/p de albúmina sérica bovina y se dosificó a 100, 66.6, 43.3, 30, 20, y 13.3 µg/kg. La insulina se reconstituyó con amortiguador de fosfato (0.01 M, a pH of aproximadamente 7.4) que contiene 0.1% p/p albúmina sérica bovina y se dosificó a, 33.3, 21.7, 15, 10, y 6.7 µg/kg. Después de recibir una dosis subcutánea en la 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.

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

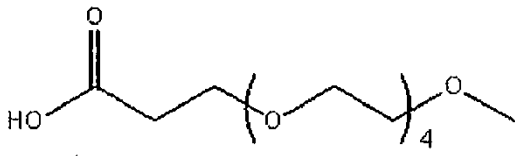
25 Los resultados se muestran en las Figuras 16-20. La Figura 16 muestra los perfiles de la biopotencia de MBGA para HIM2. La Figura 17 muestra los perfiles de la biopotencia de MBGA para el producto del compuesto de insulina Zn-HIM2 tipo R. La Figura 18 muestra los perfiles de la biopotencia de MBGA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

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

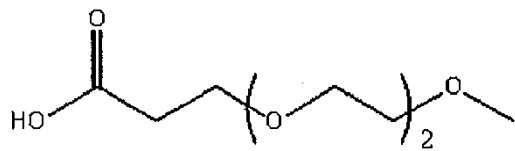
monoconjugado B1, IN-186:



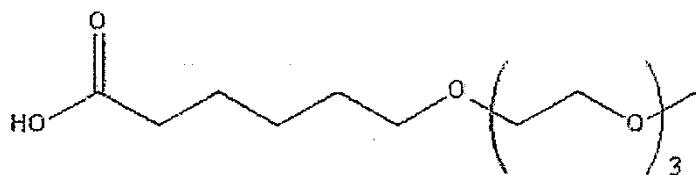
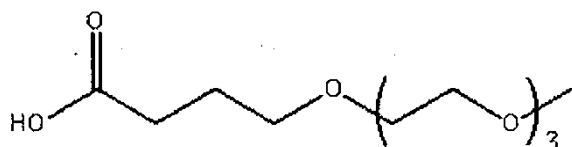
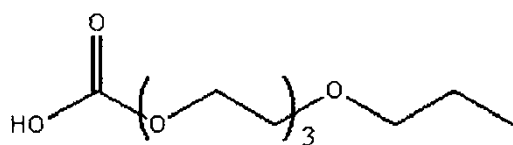
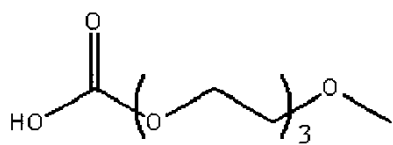
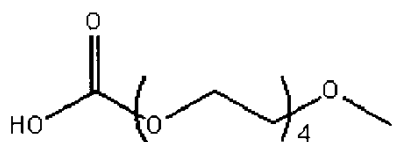
monoconjugado B29, IN-194:



monoconjugado B29, IN-197:



monoconjugado B29, IN-178:

monoconjugado B29, IN-190:monoconjugado B29, IN-196:monoconjugado B29, IN-191:monoconjugado B29, IN-189:

## 14.2 Estudios de pinzamiento en perros

### 5 14.2.1 Estudios de HIM2 iniciales

Perros (n=3 o 6) se prepararon quirúrgicamente (anestesia de isoflurano) mediante la colocación de un catéter en una arteria femoral. A los animales se les permitió recuperarse por 16-17 días después de lo cual se mantuvieron en ayunas durante la noche y estudiados en el estado consciente. Después de un periodo de equilibrio de 60 min, hubo un periodo de control de 20 min después de lo cual el fármaco se administra por vía oral. El compuesto de insulina Zn<sup>++</sup>-HIM2 tipo R se probó en solución amortiguadora, preparada como se muestra en el Ejemplo **Error! Origen de referencia no encontrado**. Además, los complejos de tipo R y de tipo NPH se ensayaron en formulación líquida oral que contiene caprato ácido y laurato ácido preparada como se muestra en el Ejemplo **Error! Origen de referencia no encontrado**.

15 Las 3 muestras de prueba se probaron en un solo nivel de dosis (los niveles de dosis se identificaron sobre la base de los resultados experimentales anteriores). El nivel de glucosa en plasma se fijó después en un valor euglicémico por infusión de D-20 a través de la vena de la pata por 4 h. muestras de sangre (4 ml) se tomaron a -20, 0, 5, 10, 20, 30, 45, 90, 120, 180 y 240 min para la medición de glucosa, compuesto de insulina y C-péptido. Las muestras de sangre de las arterias se obtuvieron según se requirió para fijar el nivel de glucosa en plasma. Un total de 72 ml de sangre se tomó en cada experimento.

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

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

Las Figuras 25 y 26 muestran los resultados.

#### 14.2.2 Estudios IN105 iniciales

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

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

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

La euglicemia se mantuvo por infusión de glucosa. La tasa de infusión de glucosa requerida para mantener la euglicemia como la mayor en los animales con mayor aumento de insulina arterial (Figuras 27 y 28). El área bajo la curva de la tasa de infusión de glucosa promedio (AUC<sub>0-240</sub>) fue  $578.5 \pm 144.5 \text{ mg/kg/min}$  ( $669.4 \pm 137.7 \text{ mg/kg/min}$ , n=5).

#### 14.2.3 Formulaciones sólidas

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

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

Inicialmente, los experimentos se llevaron a cabo para simplificar y perfeccionar la formulación líquida optimizada (referencia 2) a una formulación líquida que se convertiría más fácilmente a una forma de dosificación sólida. Esto se llevó a cabo mediante la sustitución del ácido graso libre con la sal de sodio correspondiente (por ejemplo, ácido cáprico reemplazado con caprato de sodio) así como también la eliminación de los componentes amortiguadores (ácido cítrico,

trolamina, trometamina, hidróxido sódico) que se consideraban ya no eran necesarios. Adicionalmente, el efecto de otros ácidos grasos tales como ácidos linoléico, caprílico and mirístico y el aminoácido, arginina, se examinaron para sus efectos en la absorción de IN105.

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

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

#### Resultados

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

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

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

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

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

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

60 Durante los estudios finales, en los cuales se utilizaron conjuntos de 6 perros, un perro (perro #3) experimentó menos respuesta con todas las dosificaciones líquidas y sólidas. Para representar con mayor precisión los resultados, los datos se presentan con y sin resultados del perro # 3. Los datos de los perros que no recibieron la dosis completa (mala alimentación forzada, vómitos, etc) o tenían insulina endógena se omitieron.

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

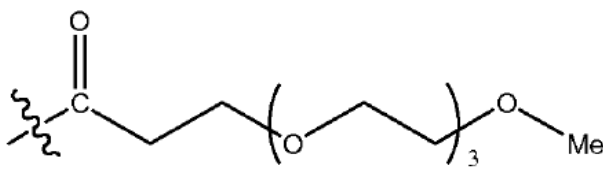
## Discusión

- 5 Estos estudios demostraron que la tableta prototipo IN105 que contenía sales sódicas caprato o caprato y laurato con manitol y el glicolato sódico de almidón desintegrante y que contiene 6mg IN105 (aproximadamente 0.25 mg/kg) administra por vía oral resultó en una elevación significativa y consistente de la insulina plasmática de la arteria que la infusión de glucosa requerida para preservar la euglicemia.
- 10 Estos comprimidos prototipos resultaron en niveles de IN105 y tasas de GIR al menos tan buenas y probablemente mejores que las formulaciones líquidas que contienen niveles comparables de caprato o laurato. Las forma de tabletas prototipo mantienen el perfil de absorción de la formulación líquida oral. La bio-eficacia oral relativa de las formulaciones de tableta prototipo seleccionadas (por ejemplo, tabletas que contienen 280mg y 150mg de caprato, n=6, AUC para GIR= 496±117 y 500±275) parece tener mejores formulaciones líquidas (por ejemplo, 3% p/v de formulación líquida de ácido cáprico, n=5, AUC para GIR =182±92 y 198 ±119).
- 15 Los datos sugieren que las tabletas que contienen caprato de sodio como el único ácido graso junto con manitol y el desintegrante, glicolato sódico de almidón serían útiles en el desarrollo posterior de las formas de dosificación sólidas para usar en estudios clínicos. Los datos sugieren además que los niveles de insulina después de la administración oral de IN105 en las formas de tabletas de caprato prototipo seleccionadas (caprato de sodio a 150mg o 286mg) alcanzaron su pico de forma constante con una T<sub>máx</sub> típica en post-dosis alrededor de 20 minutos y una C<sub>máx</sub> de aproximadamente 59.0 ± 20.1 y 62.9. ± 25,4 μUnidades/ml, en ambas dosis. Los niveles de insulina en plasma permanecieron elevados cerca del nivel C<sub>máx</sub> durante 10-15 minutos y por encima de los niveles basales a lo largo de 20 25 120 min después de cada dosis. El GIR requerido para mantener la euglicemia usando estas tabletas alcanzó una T<sub>máx</sub> en o alrededor de 30 a 40 min en ambas dosis y GIR C<sub>máx</sub> alcanzó un promedio de 8,4 ± 1,99 y 7,41 ± 2,18 mg/kg/min. Las formas de dosificación de las tabletas requirieron un GIR C<sub>máx</sub> superior (7.4-8.4 vs. 4.5-5.4) y requirió una infusión de glucosa por una duración más larga (100-120 mins vs. 60-90min) para mantener la euglicemia y entonces la formulación líquida optimizada.
- 30 En comparación con los niveles de insulina plasmática de la arteria de SQ historico e insulina inhalada, parece que estas tabletas prototipo proporcionan niveles de insulina máximos similares a SQ y el suministro inhalado y asemeja un perfil de insulina comparable con el de la insulina inhalada (Figuras 34-37).
- 35 Los experimentos de tableta prototipo sugieren que las tabletas prototipo seleccionadas son adecuadas como formulaciones de dosificación sólidas para la evaluación posterior de IN105 con desarrollo futuro para enfocar en la producción de una formulación clínica que puede producirse mediante el uso de una prensa para tabletas.
- 40 Esta descripción se divide en secciones con temas para facilitar la referencia solamente. Los encabezamientos de las secciones y temas no pretenden limitar el alcance de la invención. Las realizaciones descritas en la presente descripción tienen el propósito de ilustrar los distintos aspectos y atributos de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéutica sólida formulada para administración oral por ingestión, que comprende:

- 5 de aproximadamente 40 a aproximadamente 60% p/p de componente de ácido graso, donde el componente de ácido graso comprende sales de ácidos grasos  $C_{4-12}$  saturados o insaturados; y un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico es insulina humana acoplada en Lys B29 a una porción modificadora que tiene una estructura:



10

2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 que comprende un diluyente seleccionado del grupo que consiste de aglutinantes, desintegrantes, agentes de relleno, diluyentes, lubricantes, deslizantes, mejoradores de flujo, auxiliares de compresión, colores, endulzantes, conservantes, agentes de suspensión, agentes dispersantes, formadores de película, recubrimientos, sabores, celulosas, azúcares, manitoles, lactosas, potenciadores de la disolución y cruces cruzadas croscarmalosa.

15

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2 preparada en una forma seleccionada del grupo que consiste de tabletas, minitabledas, polvos, cápsulas de gelatina dura, o cápsulas de gelatina blanda.

20

4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el componente de ácido graso es sales de ácido cáprico y/o ácido láurico.

5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende una sal amortiguadora seleccionada del grupo que consiste de amortiguador de fosfato, fosfato sódico, amortiguador tris, amortiguador de ácido cítrico, amortiguador de etanolamina y amortiguador de trietilamina.

25

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, que comprende una sal amortiguadora seleccionada para conseguir una capacidad amortiguadora en el sitio de absorción para mantener un pH local de aproximadamente 4.8 a aproximadamente 9.5, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

30

7. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en donde el componente de ácido graso es caprato sódico.

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, que comprende además manitol.

35



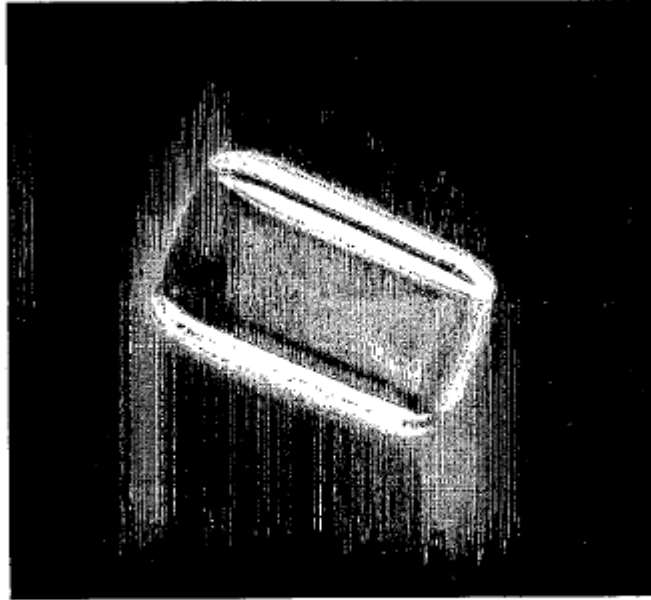


Figura 1

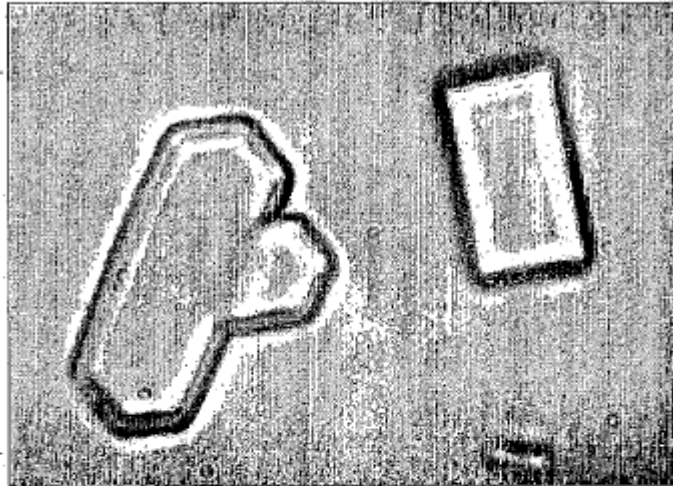


Figura 2

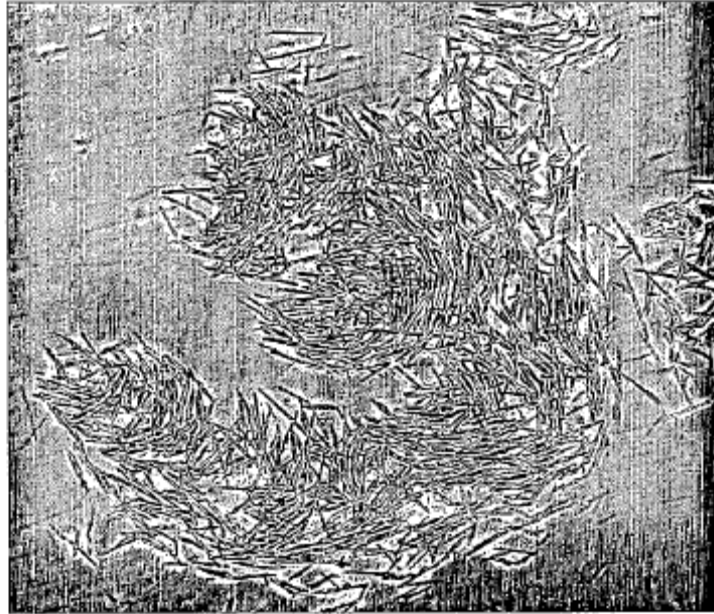


Figura 3

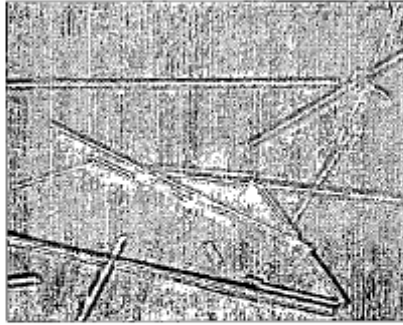


Figura 4

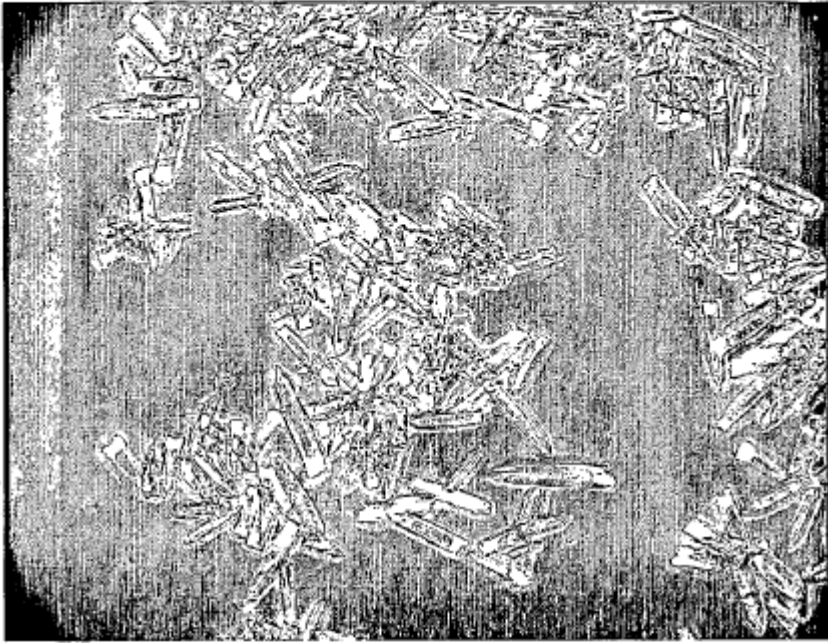
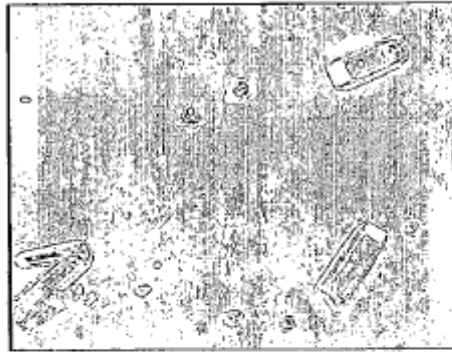


Figura 5

Reacción 1 pH 4.4

**A**



Reacción 1 pH 5.4

**B**

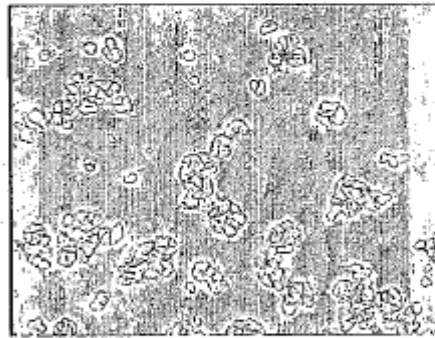


Figura 6

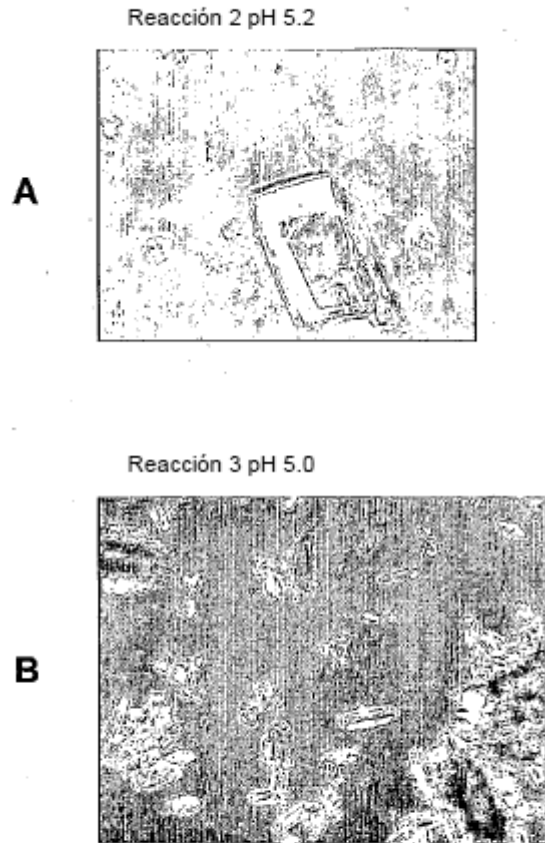
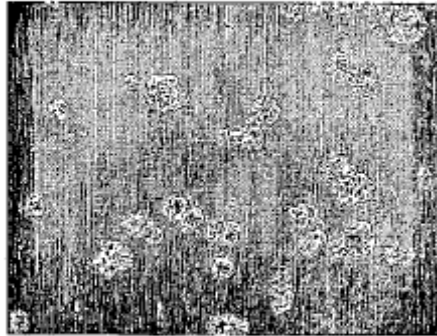


Figura 7

Reacción 4 pH 5.4

**A**



Reacción 5 pH 5.0

**B**

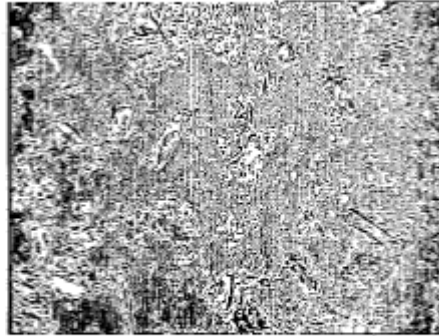


Figura 8



Reacción 6 pH 4.8

**A**



Reacción 8 pH = 5.4

**B**

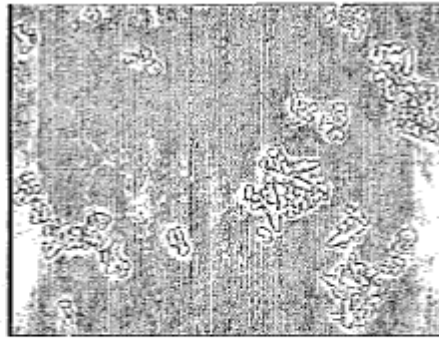


Figura 9

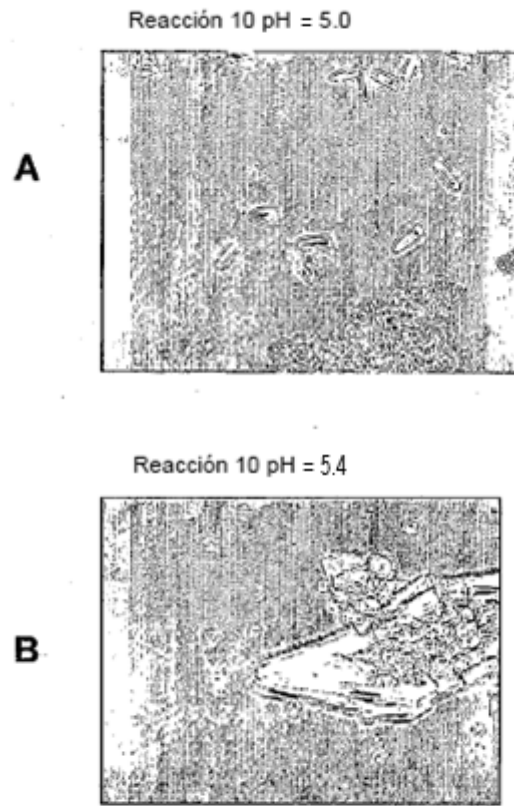


Figura 10

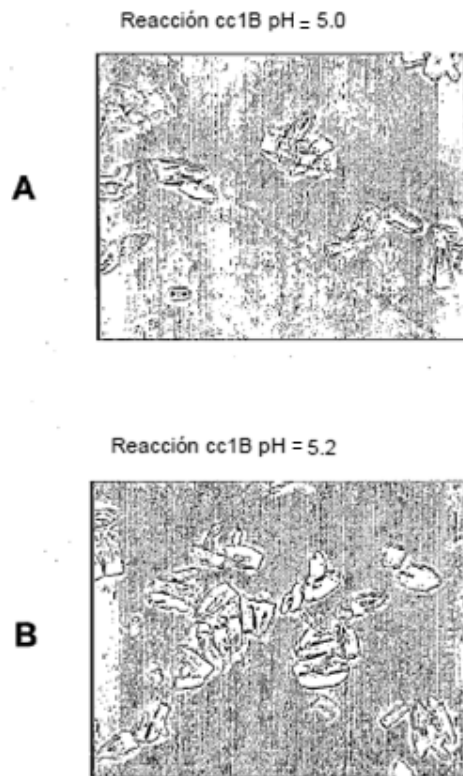


Figura 11

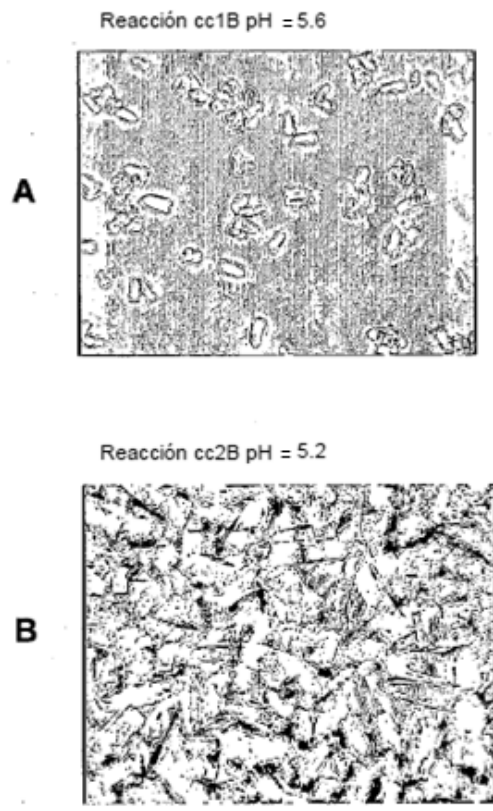


Figura 12

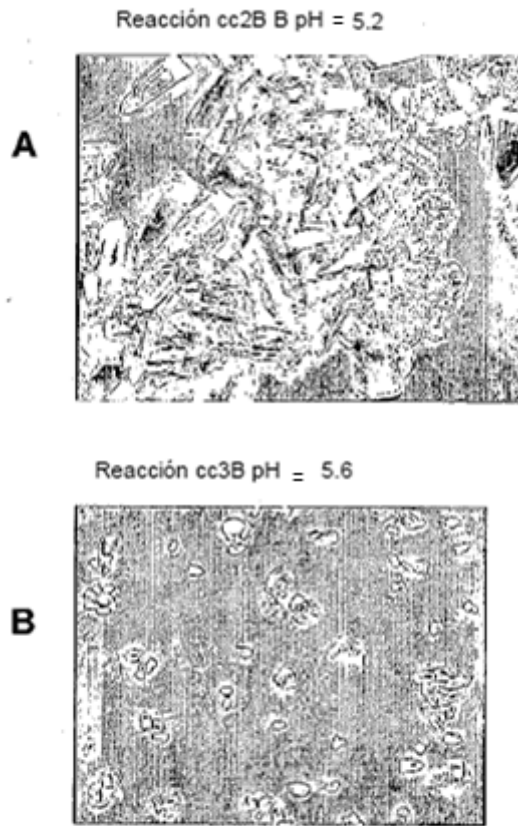


Figura 13

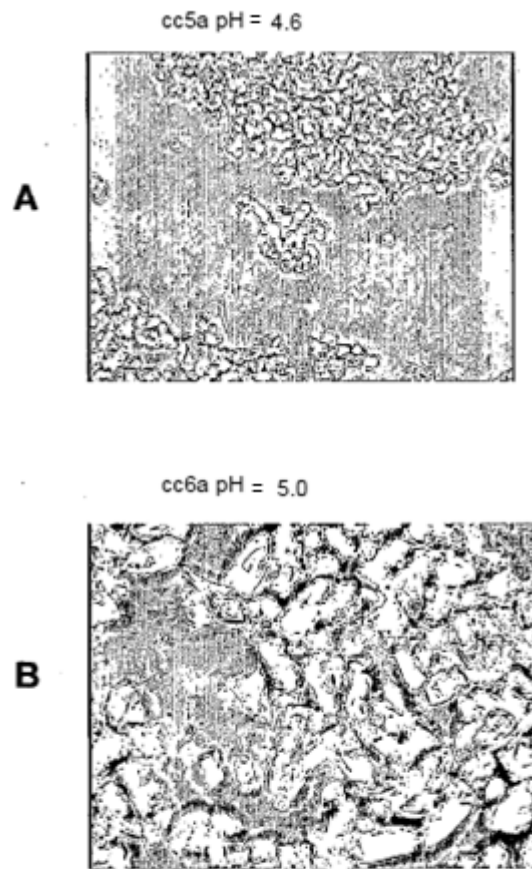


Figura 14

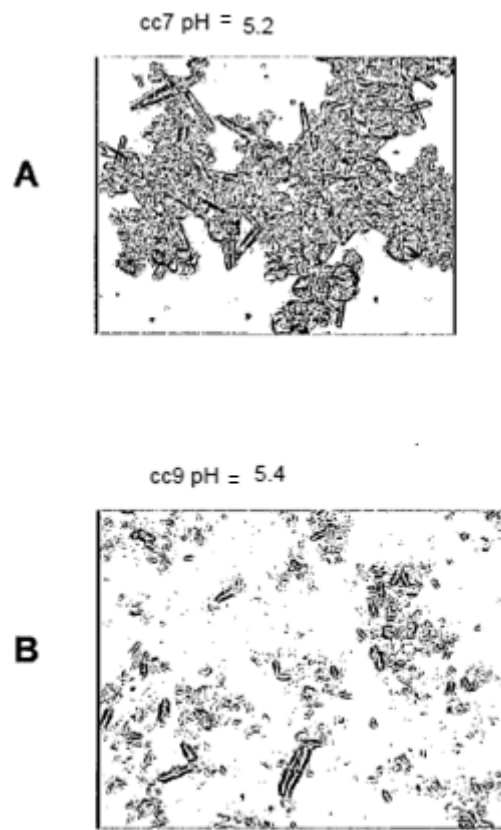


Figura 15

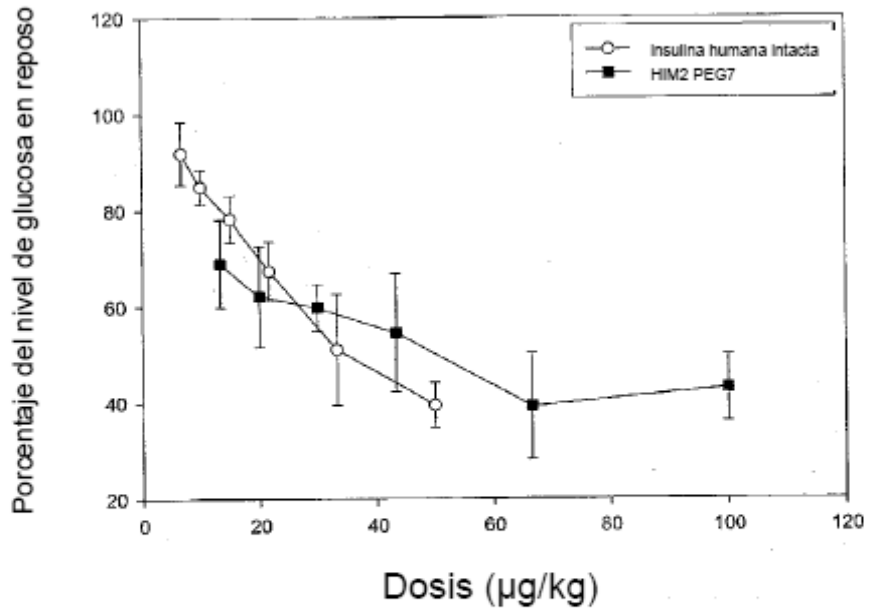


Figura 16



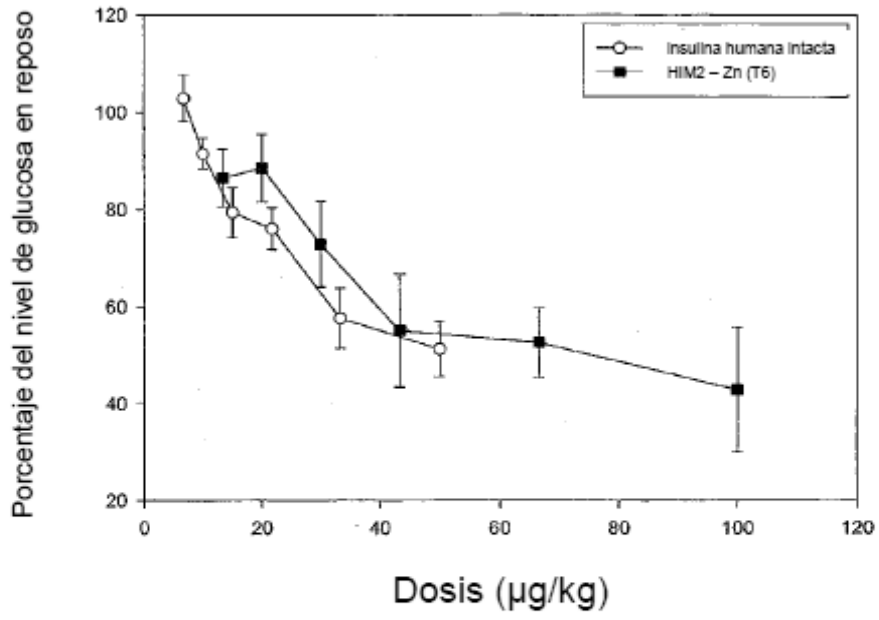


Figura 17

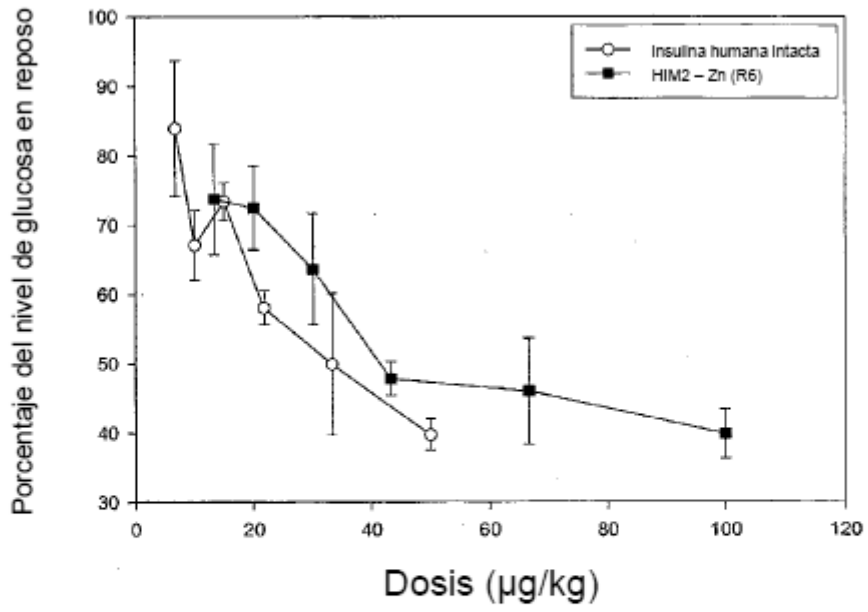


Figura 18

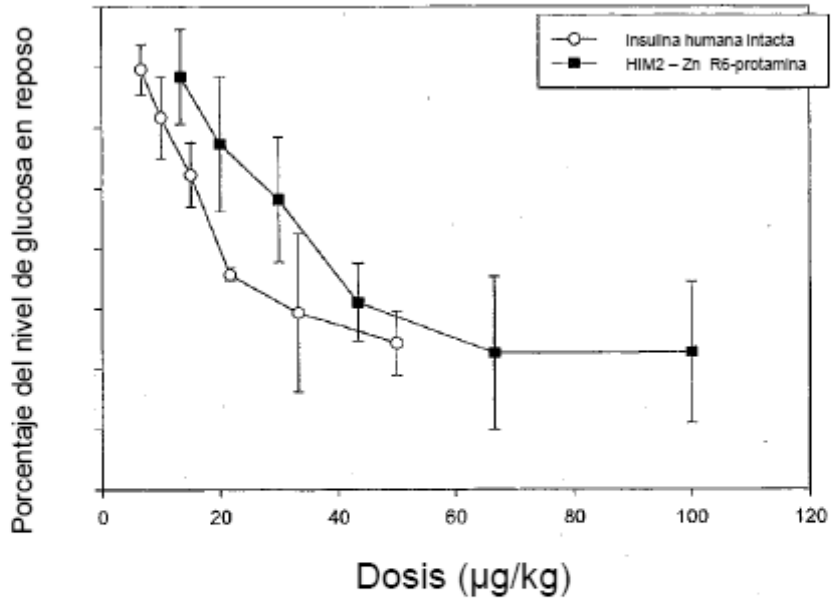


Figura 19

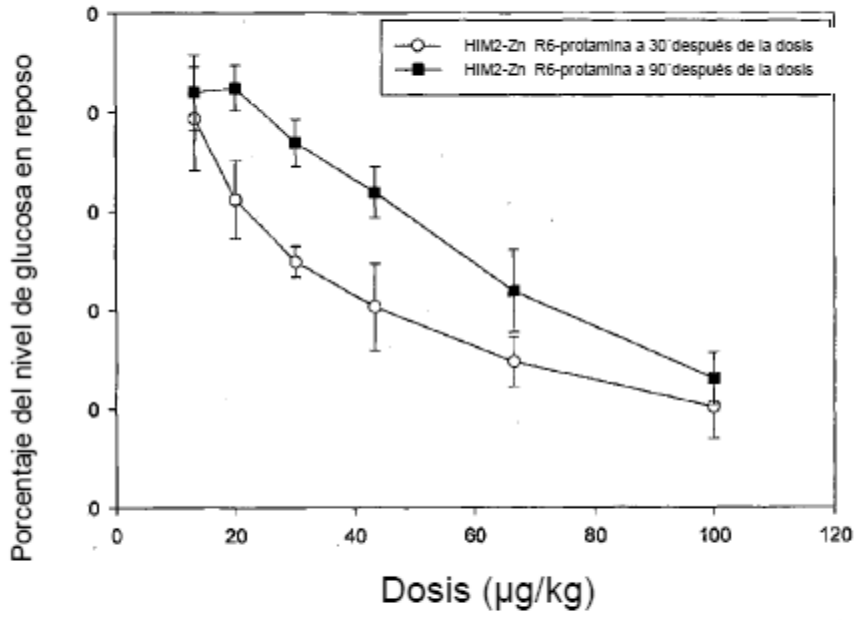


Figura 20

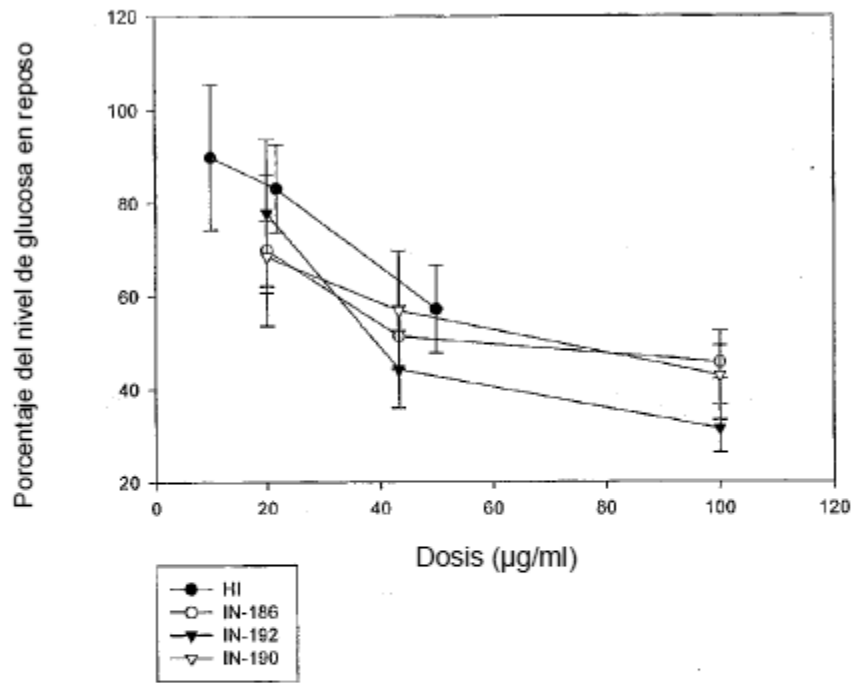


Figura 21

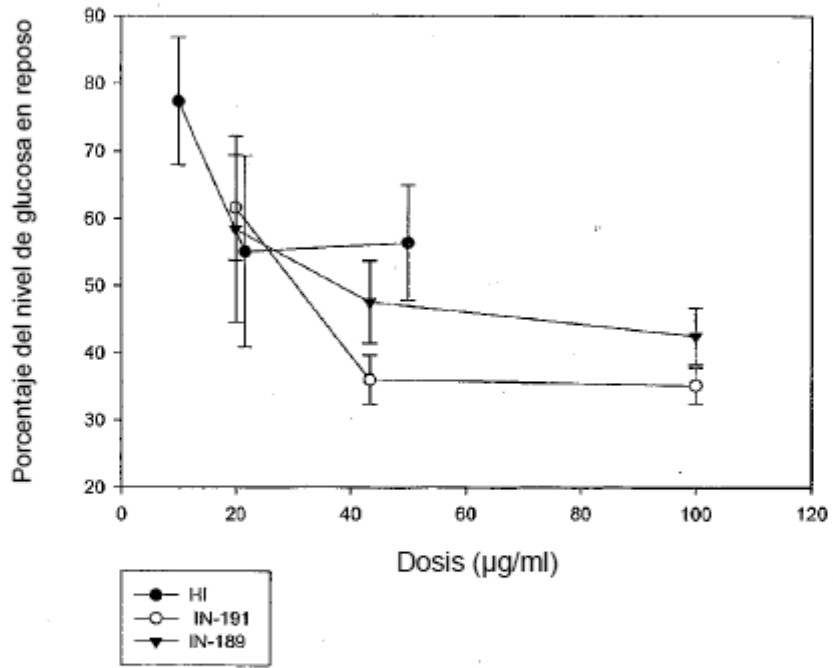


Figura 22

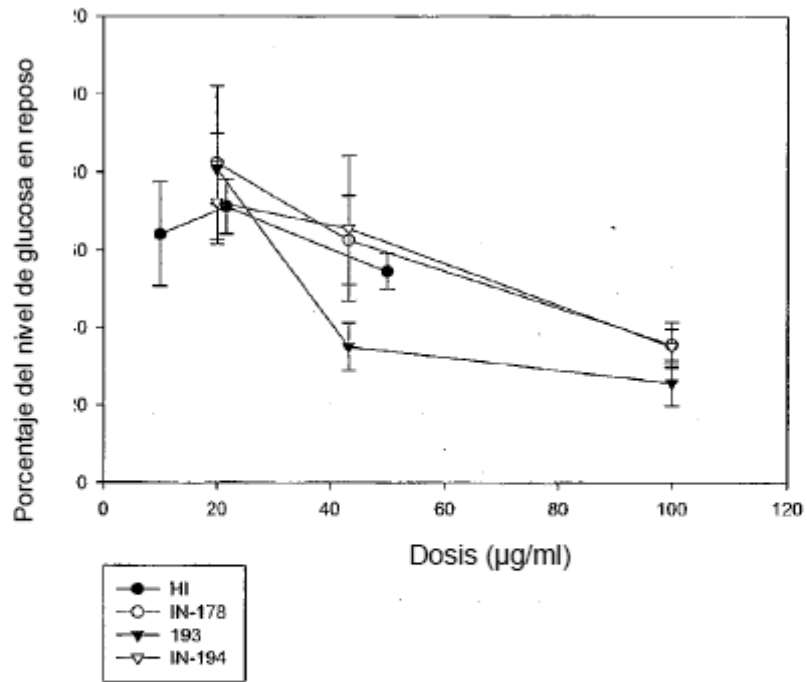


Figura 23

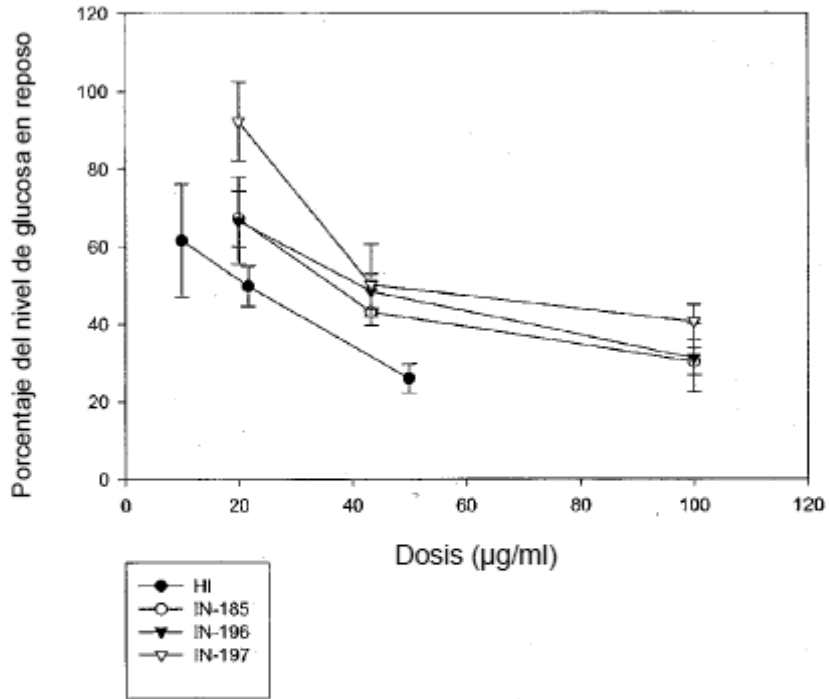


Figura 24



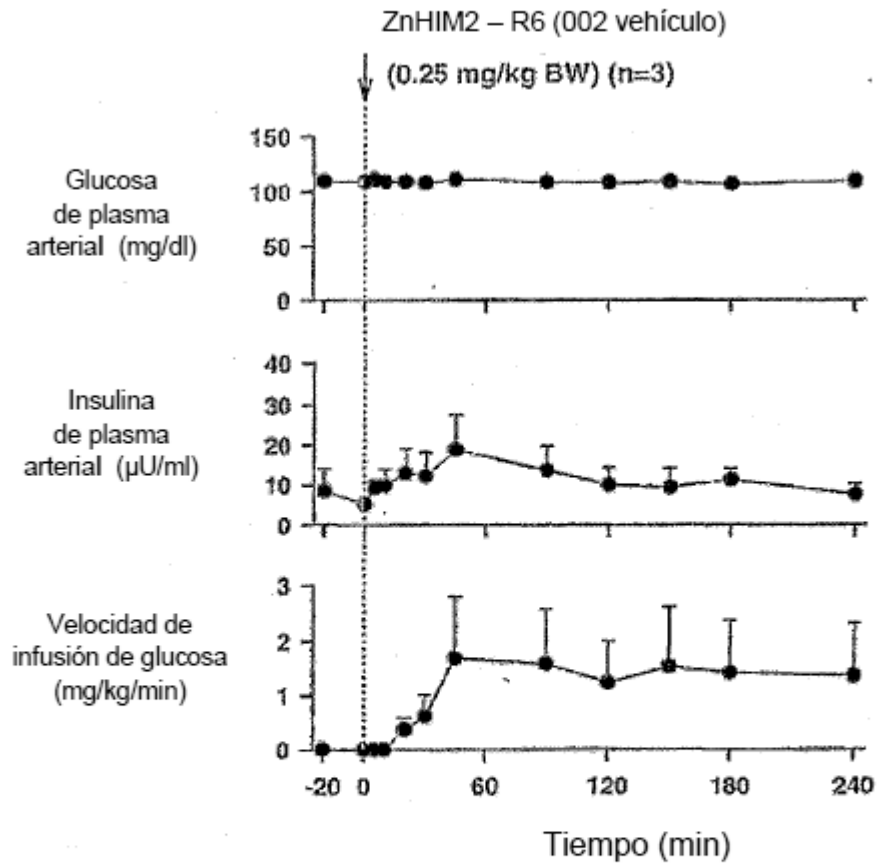


Figura 25

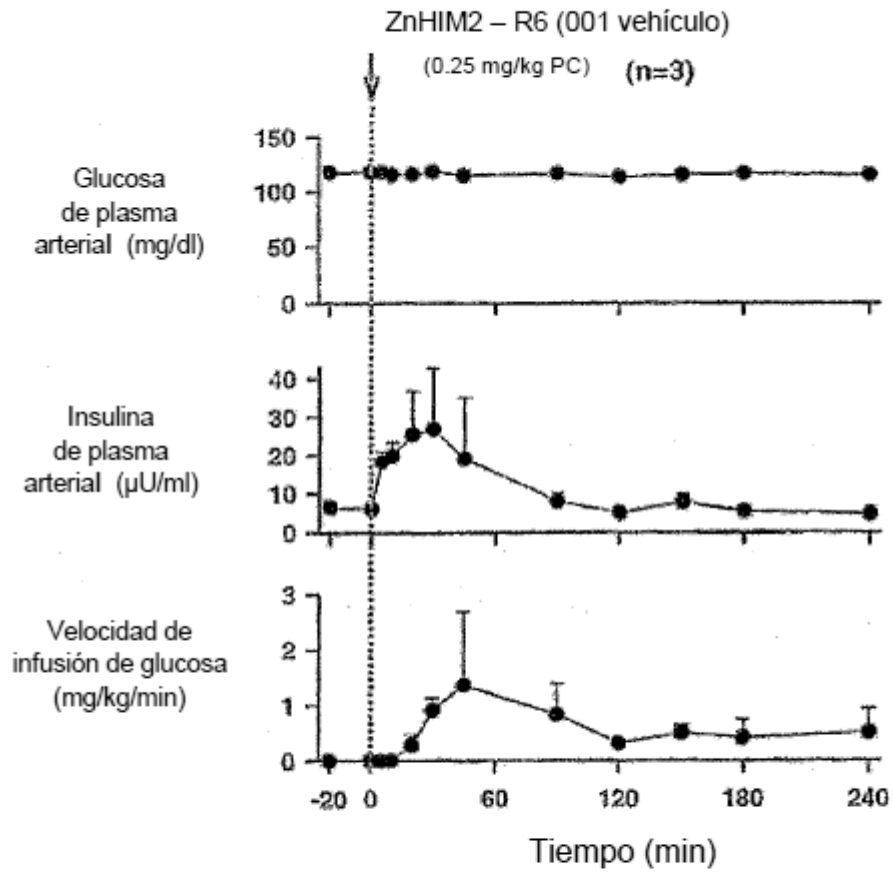


Figura 26

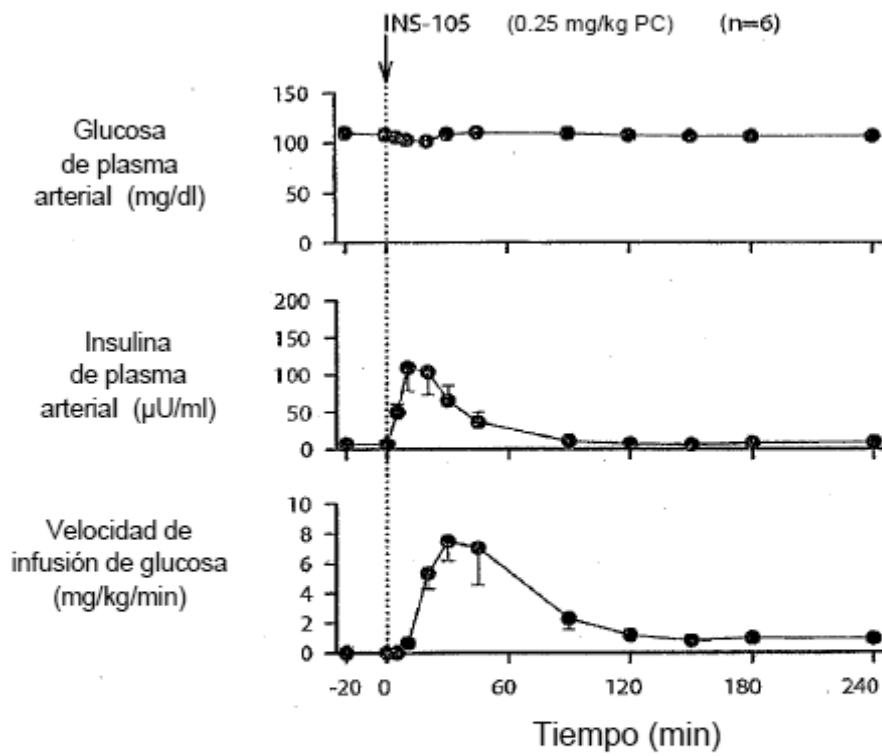


Figura 27

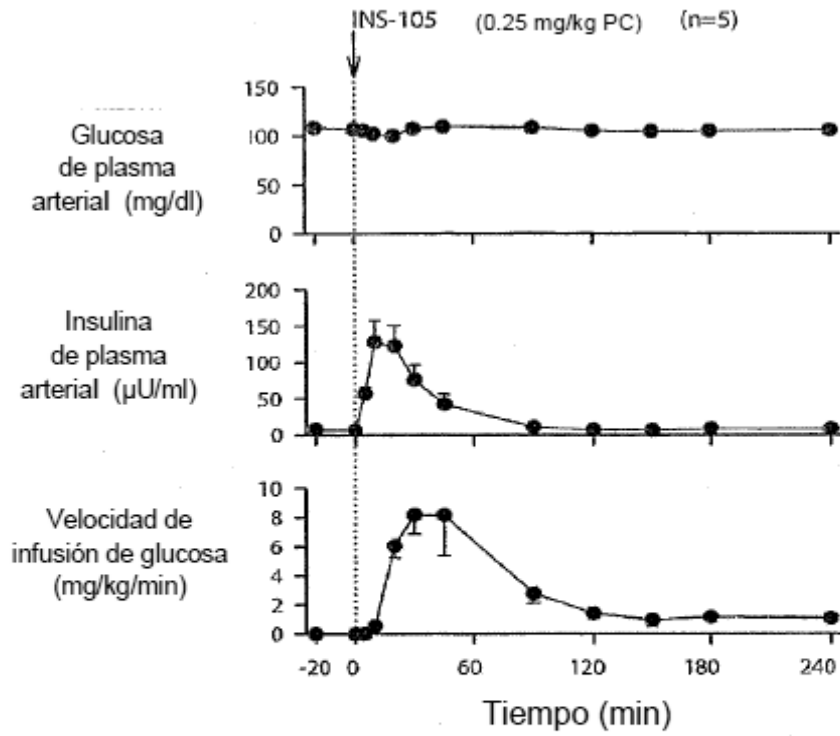


Figura 28

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

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

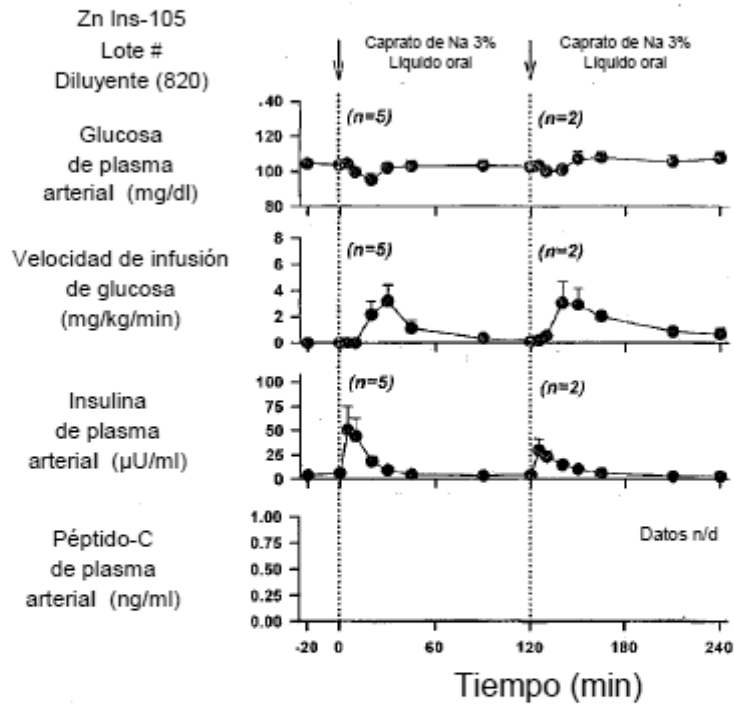


Figura 29

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

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

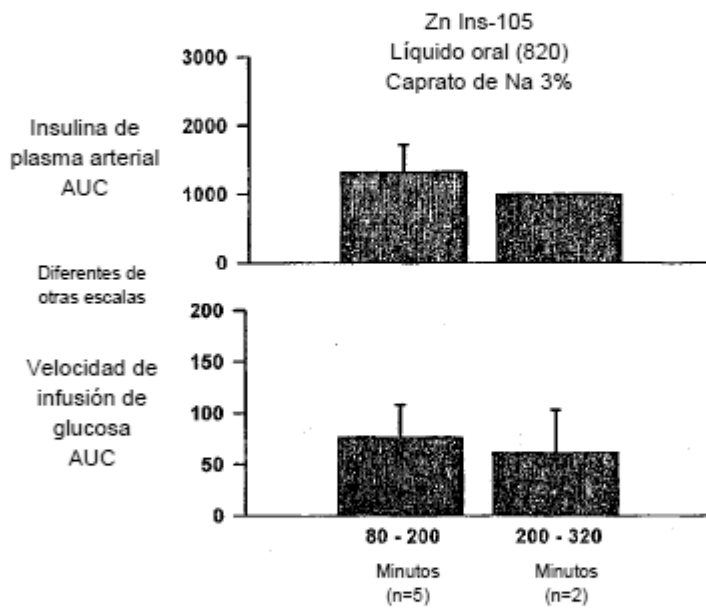


Figura 30

Formulación en tableta [856]

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

Dosis oral 0.25 mg/kg

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

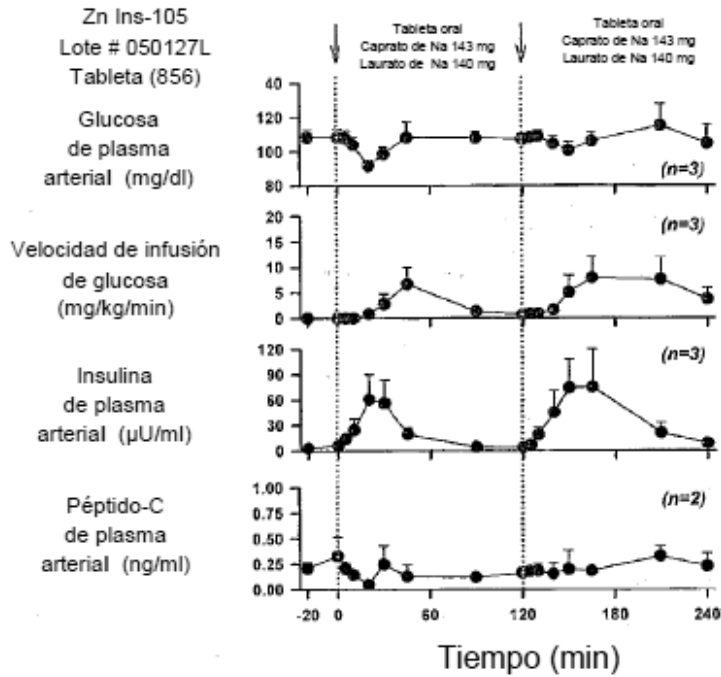


Figura 31

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

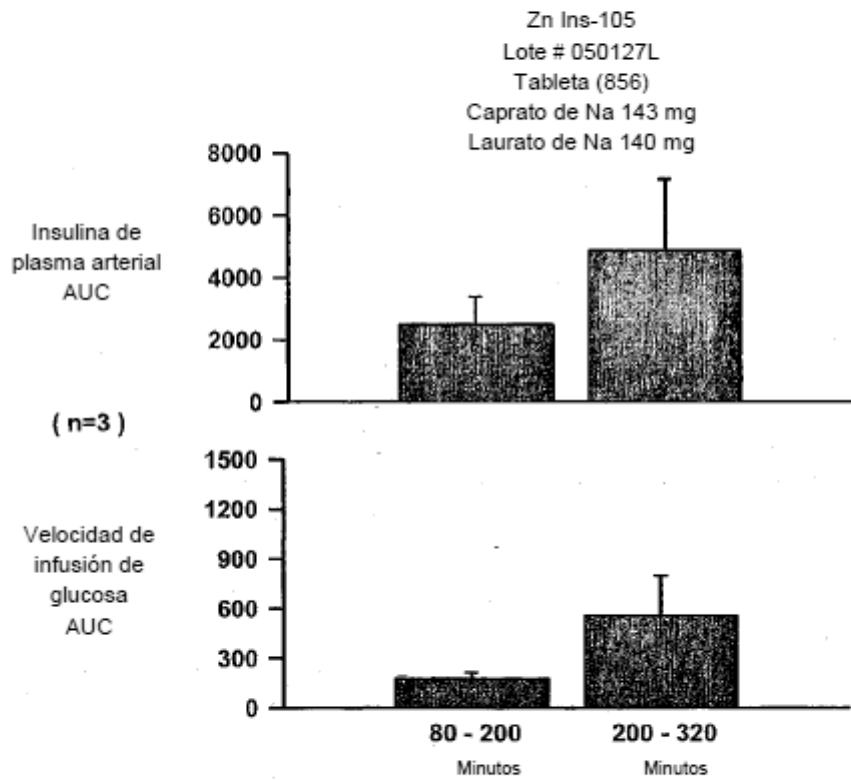


Figura 32



Forma de dosificación sólida (tabletas) formulación (854)

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

Dosis oral 0.25 mg/kg

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

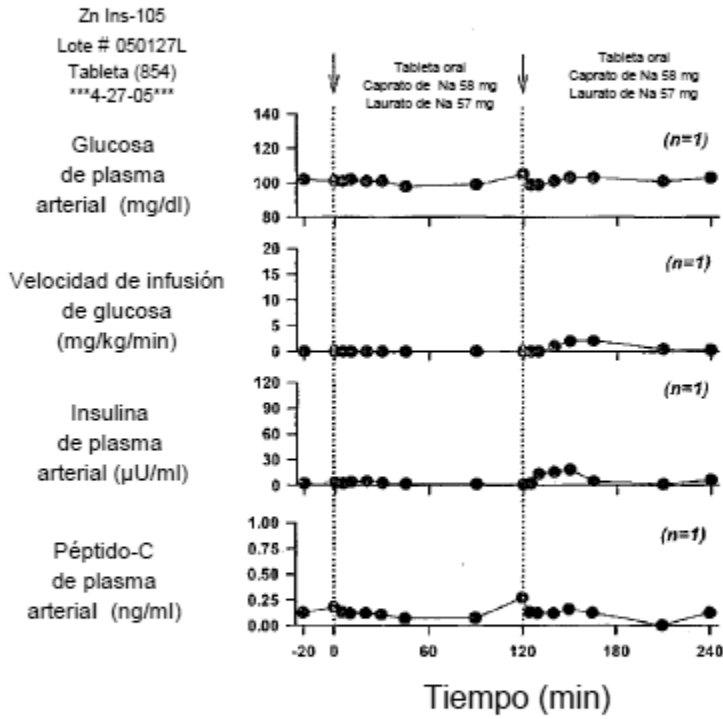
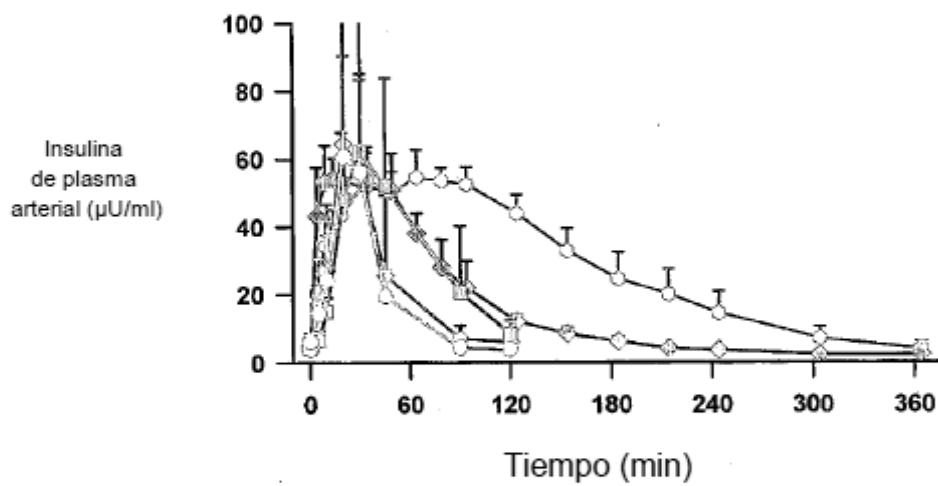


Figura 33

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

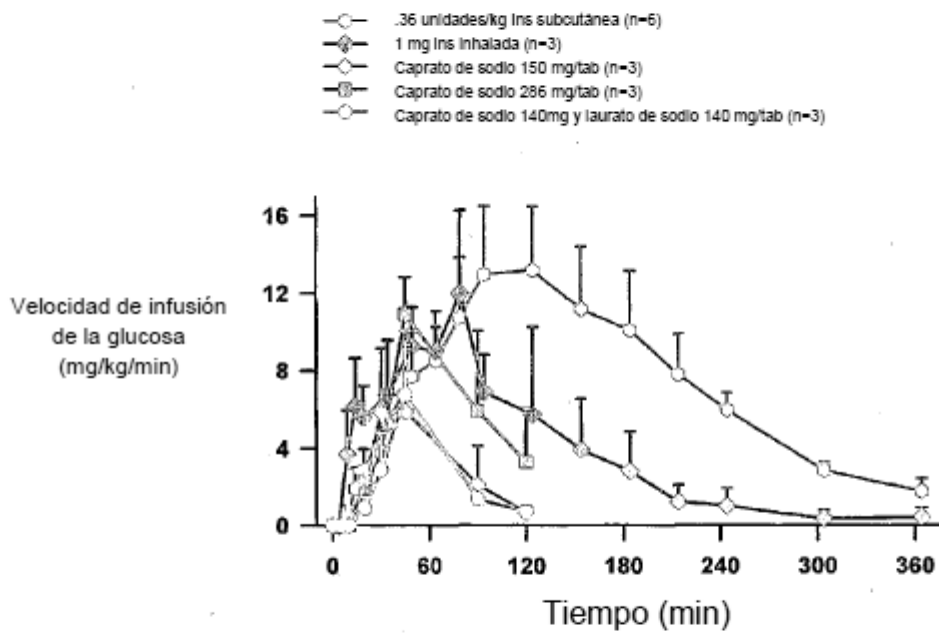
- .36 unidades/kg de insulina subcutánea (n=6)
- ◇ 1 mg insulina inhalada (n=3)
- Caprato de sodio 150 mg/tab (n=3)
- Caprato de sodio 286 mg/tab (n=3)
- Caprato de sodio 140mg y laurato de sodio 140 mg/tab (n=3)



\* Dato histórico del mismo modelo de perro

Figura 34

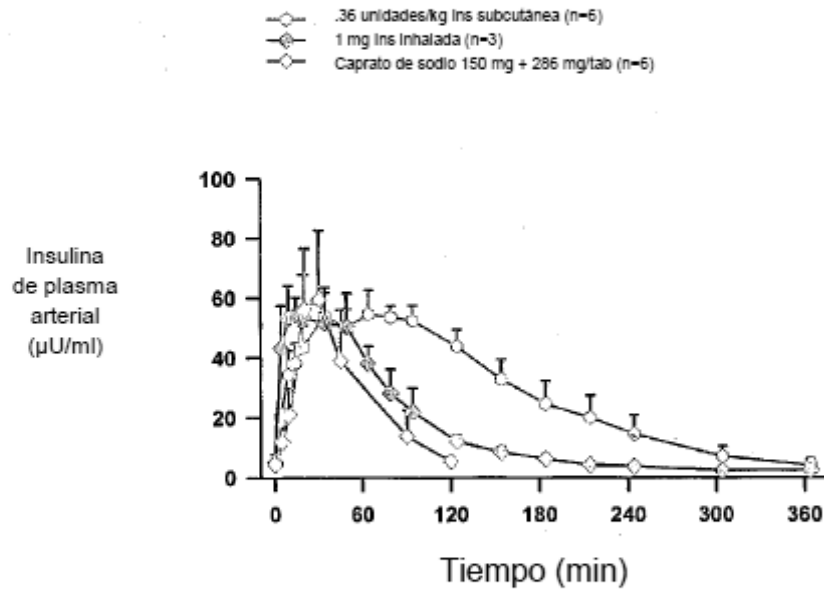
Velocidad de infusión de la glucosa después de dosificación de tabletas prototipo de Zn IN-105 (dosis de 6 mg o 0.25 mg/kg) y comparación con dosificación SQ\* y por inhalación\* de insulina regular



\* Dato histórico del mismo modelo de perro

Figura 35

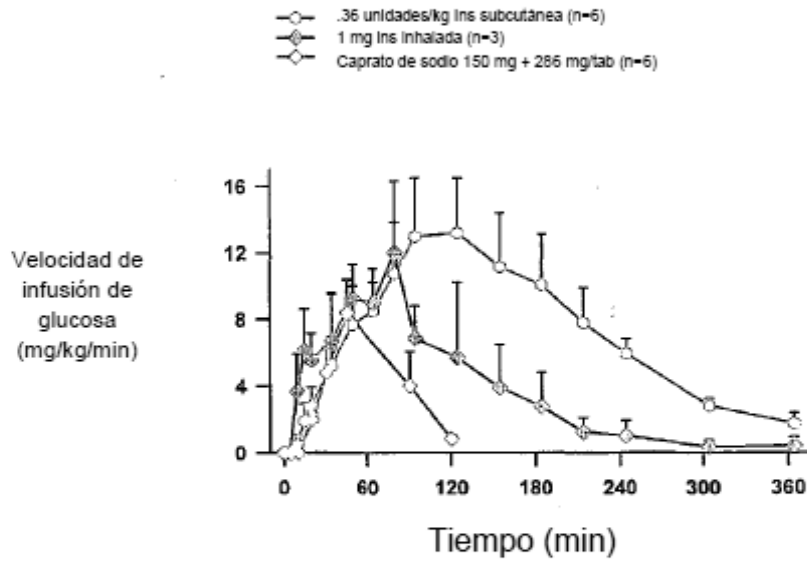
Niveles de insulina de plasma arterial después de dosificación de tabletas prototipo de Zn IN-105 y comparación con dosificación SQ\* y por inhalación\* de insulina regular, la formulación contiene 150 mg y 286 mg de caprato por tableta  
 Dosis oral 0.25 mg/kg



\* Dato histórico del mismo modelo de perro

Figura 36

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



\* Dato histórico del mismo modelo de perro

Figura 37

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

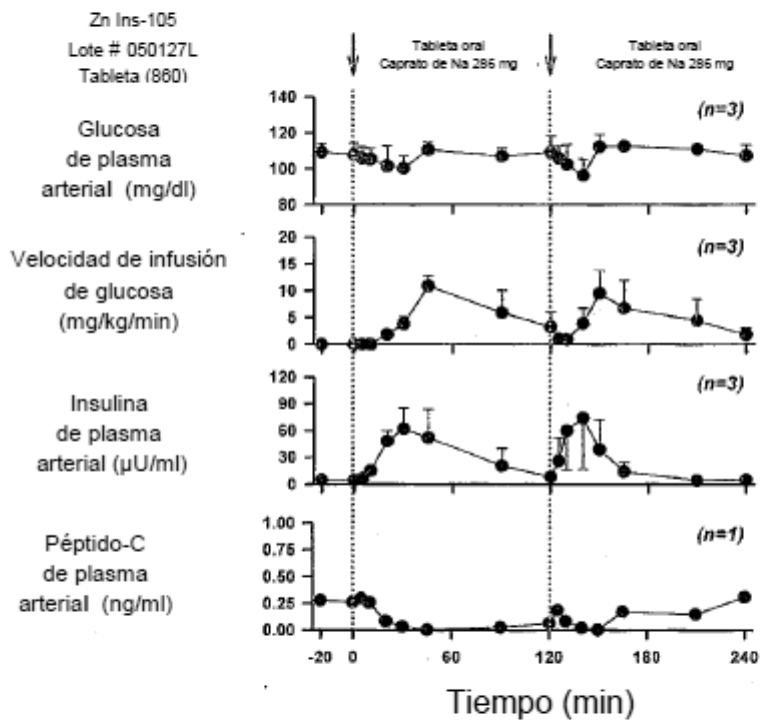


Figura 38

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

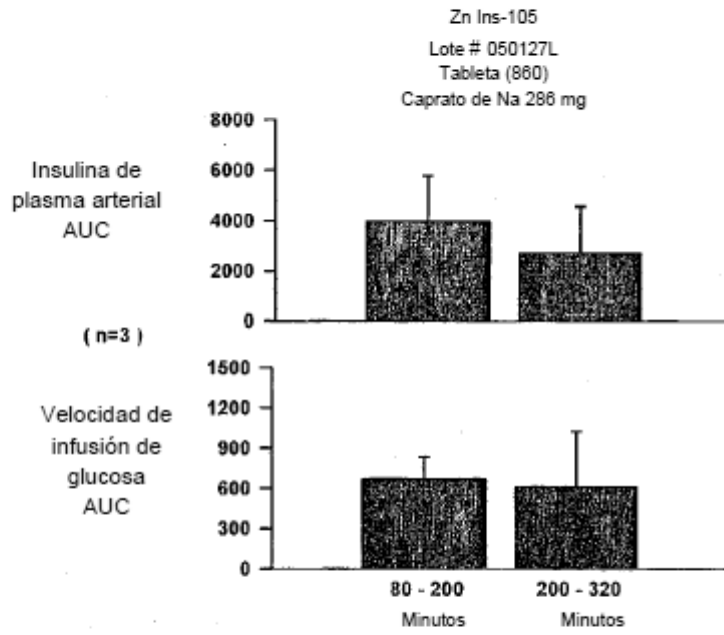


Figura 39

Formulación de tableta (862)/(859)  
 La formulación contiene Caprato 150 mg por tableta  
 Dosis oral 0.25 mg/kg  
 Niveles de glucosa de plasma arterial, velocidad de infusión de glucosa, insulina de plasma arterial y péptido-C

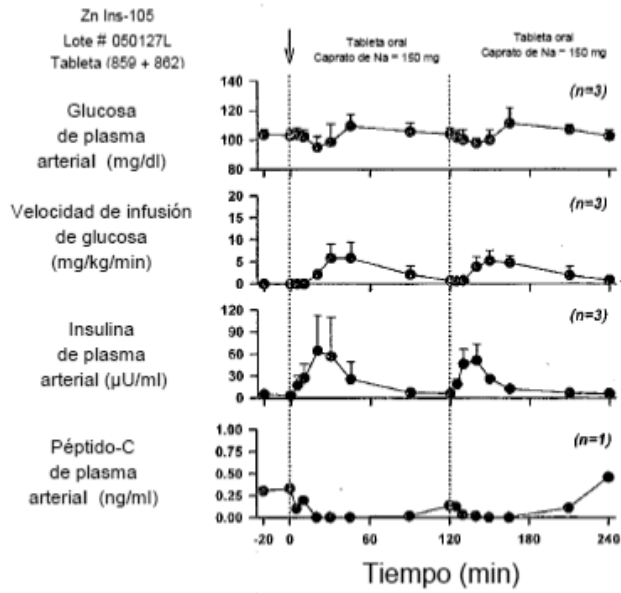


Figura 40



Formulación de tableta (862) y (859)  
La formulación contiene Caprato ≈ 150 mg por tableta  
Dosis oral 0.25 mg/kg

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

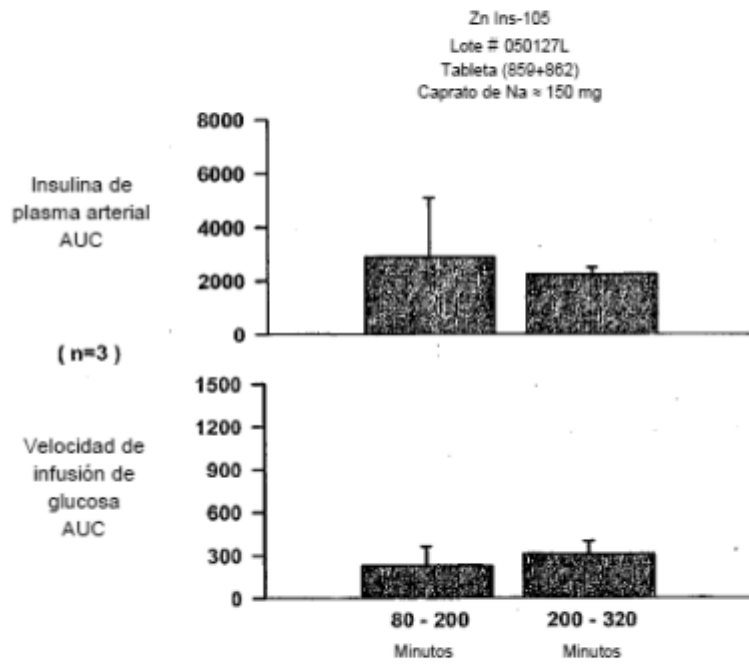


Figura 41

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

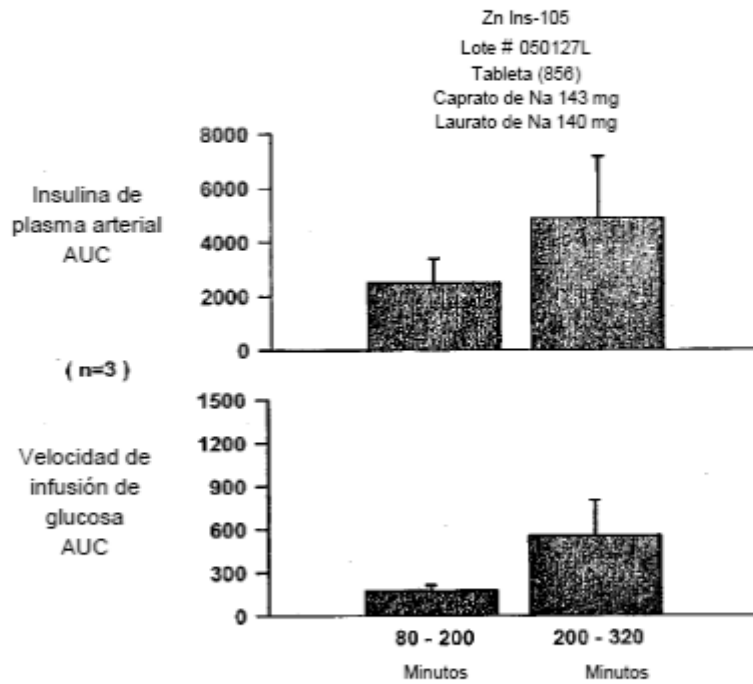


Figura 42