

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 741**

51 Int. Cl.:

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2010 PCT/EP2010/061160**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11012719**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10736745 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2459171**

54 Título: **Composición de insulina de acción prolongada**

30 Prioridad:

31.07.2009 EP 09167017

15.12.2009 EP 09179337

18.12.2009 EP 09179827

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

09.10.2017

73 Titular/es:

SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

(100.0%)

Brüningstrasse 50

65929 Frankfurt am Main, DE

72 Inventor/es:

SPROGØE, KENNETT;

CLEEMANN, FELIX;

HERSEL, ULRICH;

KADEN-VAGT, SILVIA;

LESSMANN, TORBEN;

RAU, HARALD y

WEGGE, THOMAS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 636 741 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

Composición de insulina de acción prolongada.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina, al uso de la composición, un método de tratamiento, un kit de piezas, así como al tratamiento de combinación con un compuesto GLP-1, tal como un agonista de GLP-1. La composición farmacéutica se puede administrar con menos frecuencia que las insulinas de actuación prolongada actuales y se caracteriza por la liberación de insulina estructuralmente intacta a lo largo del periodo de tiempo completo entre administraciones, sin sustancialmente aumento brusco del compuesto de insulina. Este tratamiento puede ayudar a los pacientes a reducir la frecuencia de las inyecciones, mientras que puede mantener el control óptimo de los niveles plasmáticos de insulina y por consiguiente de la glucosa en la sangre.

Antecedentes

15 El tratamiento de insulina se caracteriza por una alta necesidad para mantener la liberación del fármaco de insulina dentro de niveles muy estrictos ya que la ventana terapéutica es estrecha, y los efectos adversos de hiperinsulinemia pueden ser potencialmente mortales. Se han comercializado numerosas preparaciones de insulina, con diferentes perfiles de acción para adecuarse a las necesidades específicas de la población diabética. Los análogos de insulina de acción rápida se administran justo antes de comidas, con el fin de controlar el pico de glucosa plasmática después de ingestión de alimento, mientras que los análogos de insulina de acción prolongada se dan típicamente una o dos veces al día para proporcionar un nivel de insulina basal estable.

20 Desarrollos recientes también han incluido la insulina oral e insulina inhalada. Sin embargo, debido a que la insulina es una proteína, cuando se toma por vía oral es digerida fácilmente por el estómago y el sistema gastrointestinal. Alternativamente, la insulina inhalable suministrada a través de un inhalador a los pulmones estuvo disponible en el mercado durante un periodo limitado (Exubera®, Pfizer interrumpido en 2007). Esta formulación proporcionaba insulina durante un periodo de horas, pero requería que los pacientes continuaran inyectándose una insulina basal de acción prolongada. Desventajas adicionales de la insulina inhalable incluían las dificultades de fabricación que daban como resultado un sistema de suministro prohibitivamente caro. Como resultado, todas las formulaciones de insulina disponibles en el mercado deben administrarse bien por inyección subcutánea o intravenosa.

25 El perfil plasmático de las diferentes insulinas disponibles se caracteriza por tener diferentes perfiles plasmáticos. Dichos perfiles plasmáticos se pueden describir como que tienen una concentración plasmática máxima y una mínima que depende de la formulación y el tipo de insulina usada. Es muy importante obtener un perfil plasmático que sea tanto reproducible de un paciente a otro como en el mismo paciente con el fin de poder predecir el efecto de disminución de la glucosa plasmática de la insulina administrada. Además, en el caso de administraciones múltiples de insulina basal, es deseable tener tan poca diferencia como sea posible entre la concentración plasmática máxima y la concentración plasmática mínima. Esto conducirá a una concentración plasmática más constante de insulina, y por lo tanto un efecto de disminución de la glucosa más uniforme a lo largo del intervalo de dosificación entero.

35 Los tratamientos de insulina basal estándar actuales consisten en administraciones diarias o dos veces al día de insulinas basales de acción prolongada tal como insulina NPH, insulina glargina o insulina detemir. Aunque el desarrollo de análogos de insulina más nuevos se ha dirigido a reducir la variabilidad de los efectos insulíntrópicos, el efecto de disminución de la glucosa de estas formulaciones de acción prolongada se caracteriza todavía por variaciones grandes entre sujetos e intrasujetos, como describen Heise et al. (*Diabetes*, 2004 (53), 1614-1620). En este estudio la insulina detemir presentaba la menor variación farmacocinética, con un coeficiente de variación de 15 comparado con el CV de insulina NPH e insulina glargina de 26 y 34, respectivamente. Esta variabilidad bastante grande es un obstáculo principal para obtener el control óptimo de la glucosa, ya que es difícil predecir la exposición a las moléculas de insulina.

45 El mismo estudio investigaba la variación farmacodinámica evaluada por las tasas de infusión de glucosa (GIR). Esta evaluación también demostraba que la insulina detemir tenía menor variabilidad dentro de un sujeto que tanto la insulina NPH como la insulina glargina, con respecto al marcador farmacodinámico GIR. Además, este estudio demostraba que el efecto de la insulina en las tasas de infusión de glucosa no duraba todo el periodo de dosificación completo de 24 horas, demostrando claramente la necesidad de una insulina de acción prolongada, que ofrezca acción de disminución de la glucosa completa para toda la duración entre dosis. Para superar este problema de las insulinas basales diarias que no duran un periodo de 24 horas entero, algunos pacientes dividen su dosis de insulina basal en dos inyecciones diarias, con el fin de obtener mejor control de la glucosa a lo largo del día.

Por lo tanto, hay una clara necesidad de nuevas preparaciones de acción prolongada de insulina, que liberen continuamente insulina a lo largo del periodo entero entre administraciones.

55 Además, incluso si los pacientes pueden gestionar su glucosa en la sangre con las inyecciones diarias de insulina basal, el inicio del tratamiento de insulina encuentra resistencia debido al régimen de inyección diario. Esto no es deseable, ya que la Asociación de Diabetes Americana (ADA) y la Asociación Europea para el Estudio de la

Diabetes (EASD) reconocen que la insulina como el tratamiento de primera línea después de la metformina oral, ofrece el mejor resultado de tratamiento (DM Nathan et al., *Diabetologica* (2008) 51:8-11).

5 Si se pudiera reducir la frecuencia de inyección del tratamiento de insulina, es probable que la barrera psicológica de inicio de tratamiento de insulina se redujera, permitiendo así que los pacientes iniciaran el tratamiento de insulina en una etapa anterior, mejorando mucho su estado de salud.

Un reto en el desarrollo de formulaciones de insulina basales de acción prolongada está en el estrecho intervalo terapéutico para la insulina, y deben evitarse en cualquier circunstancia grandes variaciones de pico a valle en la farmacocinética de la insulina así como efectos de aumento brusco.

10 Se han propuesto varios procedimientos para reducir la frecuencia de administración, mientras que todavía se retiene la liberación de insulina dentro de límites estrechos, pero no han conseguido prolongar la duración de los efectos de disminución de la glucosa más allá de un par de días, aunque todavía se caracterizan por tener una relación pequeña entre la concentración plasmática máxima y la concentración plasmática mínima.

15 El documento WO 06003014 describe un hidrogel capaz de liberar insulina con la posibilidad de menor frecuencia de administración comparado con las inyecciones de insulina basal diarias estándar. Sin embargo, la insulina es liberada a una velocidad demasiado rápida para asegurar el control insulínico estricto para periodos que se prolongan 2 días. De hecho, la insulina es liberada con una semivida de aproximadamente 30 horas, lo que significa que el profármaco debe administrarse al menos cada 30 horas con el fin de que la relación de pico a valle sea inferior a 2 en el estado estacionario.

20 El concepto de preparar un conjugado polimérico reversible de insulina ha sido explorado por Shechter et al. y se ha descrito en artículos científicos y solicitudes de patente (p. ej. (*European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008(70), 19-28) y WO 2004/089280). La insulina se conjuga con un polímero de PEG de 40 kDa a través de una molécula espaciadora de 9-hidroximetil-7-(amino-3-maleimidopropionato)-fluoreno-N-hidroxisucinimida. La hidrólisis de dicha molécula espaciadora libera insulina con una semivida de 30 horas, lo que significa que el profármaco debe administrarse al menos cada 30 horas con el fin de que la relación de pico a valle sea inferior a 2 en el estado estacionario.

25 Se han hecho otros intentos de reducir la frecuencia de administración de insulina. Hinds et al (*Journal of Controlled Release*, 2005 (104), 447-460) describen un método de producción de una insulina una vez a la semana, primero por PEGilación permanente de la molécula de insulina y después posteriormente microencapsulación de la insulina PEGilada en micropartículas de PLGA. La encapsulación en PLGA de proteínas se ha mostrado que causa reacciones secundarias de los ésteres de polímero con grupos amino de péptido o proteína. Se han observado productos de acilación de ácido láctico después de exposición de las formulaciones a disoluciones tamponadas a pH neutro. (*Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 52-57; *Pharm. Res.* 11 (1994) 865-868; *Pharm. Res.* 19 (2002) 175-181).

Específicamente para la insulina, se han demostrado efectos perjudiciales de las formulaciones de polímero (*Pharm. Dev. Technol.* 4 (1999) 633-642; *Pharm. Dev. Technol.* 5 (2000) 1-9).

35 En el caso mencionado antes, la insulina ha sufrido una modificación estructural sustancial a través de la modificación permanente por una entidad de polímero de alto peso molecular, ya que la PEGilación de insulina aparentemente sirve para proteger el péptido frente al deterioro en la formulación de polímero de PLGA.

40 Desgraciadamente, dichas insulinas modificadas de alto peso molecular pueden presentar menor eficacia por menor unión al receptor y también pueden presentar reacciones en el sitio de inyección tales como lipodistrofia debida a la presencia prolongada de concentraciones altas de insulina de alto peso molecular en el tejido subcutáneo. Además, dichas insulinas PEGiladas presentarán un menor volumen de distribución, que es una desventaja particular en el tratamiento de la diabetes.

45 Además, el perfil farmacocinético del conjugado de insulina liberado se caracteriza por una liberación de tipo aumento brusco inicial inmediatamente después de la administración, al que le sigue una disminución de la concentración plasmática del conjugado de insulina, seguido de un aumento de la concentración plasmática del conjugado de insulina a lo largo de los siguientes días. Este perfil farmacocinético es típico de formulaciones de fármacos microencapsuladas y puede conducir a una respuesta de glucosa impredecible en sujetos tratados con dicha formulación.

50 Por lo tanto, el reto sigue siendo desarrollar insulina de acción prolongada sin comprometer los efectos farmacodinámicos de la insulina por unión permanente a una entidad de alto peso molecular.

55 La situación se complica además por el hecho de que se sabe que la insulina sufre rápidamente reacciones secundarias que están relacionadas con la presencia de tres puentes disulfuro en la molécula. Por ejemplo, la insulina se puede dividir en cadenas A y B por escisión de enlace disulfuro o se pueden formar dímeros y oligómeros debido a las reacciones de intercambio de disulfuro. Dicha reorganización de disulfuros es particularmente probable, si las moléculas de insulina son forzadas a estar en contacto próximo de una forma aleatoria ("Stability of insulin: studies on the physical and chemical stability of insulin in pharmaceutical formulation", Jens Brange, Springer, 1994).

Esta labilidad intrínseca de la molécula de insulina ha dificultado significativamente el progreso del desarrollo de depósitos de acción prolongada y ha prevenido el uso de otras formulaciones de polímero donde la insulina es encapsulada de una forma similar a un precipitado amorfo, que se sabe que da lugar a varios productos de degradación que provienen del intercambio de disulfuro extenso.

- 5 En la tasa de reacciones secundarias influye además la concentración de insulina, siendo la tasa mayor cuando la insulina está presente en concentración alta. Por lo tanto es un reto formular formulaciones de insulina de acción prolongada de concentración alta, en las que la insulina no sufre reacciones secundarias indeseables.

10 Por lo tanto, hay una clara necesidad de nuevas preparaciones de insulina de acción prolongada que liberen continuamente insulina estructuralmente intacta a lo largo de todo el periodo entre administraciones, que al mismo tiempo retengan una relación pequeña entre la concentración plasmática de insulina más alta y la más baja con el fin de evitar concentraciones de insulina demasiado altas o demasiado bajas, que puedan ser potencialmente dañinas para un paciente.

15 El requisito de insulina para los diabéticos es en gran medida individual, dependiendo la dosis de varios factores fisiológicos, que incluyen la función de las células beta pancreáticas, sensibilidad a la insulina, peso corporal e ingesta dietética. No es infrecuente que los pacientes requieran 40 UI de insulina o más al día. Esto es equivalente a 280 UI/semana que corresponde a 12,6 mg de insulina humana por semana. Con el fin de minimizar la incomodidad para los pacientes, esta debería formularse en un volumen pequeño, por ejemplo, un mililitro. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación de insulina en la que la concentración de insulina sea al menos 10 mg/ml, mientras que todavía libere insulina estructuralmente intacta y presente un perfil farmacocinético sustancialmente sin aumentos bruscos. Además, como consecuencia, un objeto de la presente invención es que se pueda administrar una sola dosis de la insulina de acción prolongada como una sola inyección de la formulación, que contenga 10 mg de compuesto de insulina.

20 El documento US2007/0207210 A1 describe un método de preparación de micropartículas amorfas de proteínas de alto peso molecular, y en particular anticuerpos. La insulina se menciona en un ejemplo como que se formula en hasta 400 mg/ml de acuerdo con la descripción. Sin embargo, el objeto de la invención es proporcionar una formulación con perfil farmacocinético similar a la proteína natural, por lo tanto, no proporcionar una liberación sostenida. El documento US2007/0207210 A1, por lo tanto, no ofrece una solución a la reducción de la frecuencia de la dosis de insulina.

Definiciones

- 30 Algunas definiciones relevantes para entender la presente invención se explican a continuación en la presente memoria.

35 Como se usa en la presente memoria, la expresión “no hay sustancialmente aumento brusco” o “sustancialmente sin aumento brusco” (ambas expresiones se usan de forma intercambiable en la presente descripción) se pretende indicar que tras la administración de un compuesto de insulina, que puede ser un profármaco o un compuesto de insulina activo, la relación de la concentración máxima de un compuesto de insulina detectable en el plasma sanguíneo durante las primeras 48 horas después de la administración, tal como subcutánea o intramuscular, a la concentración más baja de un compuesto de insulina detectable en el plasma sanguíneo después de la concentración máxima durante las primeras 48 horas después de la administración es menor de 2 (sustancialmente no hay aumento brusco detectable), preferido menor de 1,5 (no hay aumento brusco detectable).

40 Como se usa en la presente memoria, la expresión “aumento brusco” se pretende que indique que tras la administración de un compuesto de insulina, que puede ser un profármaco o un compuesto de insulina activo, la relación de la concentración máxima de un compuesto de insulina detectable en el plasma sanguíneo durante las primeras 48 horas después de la administración, tal como subcutánea o intramuscular, a la concentración más baja de un compuesto de insulina detectable en el plasma sanguíneo después de la concentración máxima durante las primeras 48 horas después de la administración es 2 o mayor.

Con respecto a la detección de un compuesto de insulina en el plasma sanguíneo, dicho compuesto de insulina puede ser la forma estructural intacta del compuesto de insulina administrado o en el caso de que el compuesto de insulina sea un profármaco, el compuesto de insulina detectable será el compuesto de insulina intacto liberado del profármaco, tal como insulina humana, análogos de insulina, derivados de insulina, y fragmentos de los mismos.

50 Como se usa en la presente memoria, la expresión “un compuesto GLP-1” se pretende que indique cualquier compuesto GLP-1, tal como GLP-1(7-37), GLP-1(7-36)NH₂, un análogo de GLP-1, incluyendo un agonista de GLP-1. Los ejemplos de agonistas de GLP-1 usados en la presente memoria son agonistas de GLP-1, exendina-3 o exendina-4, incluyendo, pero no limitado a:

55 (i) análogos de exendina-4 y análogos de exendina-4 amidados, en los que se han sustituido secuencias de uno o más restos de aminoácidos por restos de aminoácidos diferentes, incluyendo modificaciones N-terminales,

(ii) exendina-4 truncada y formas truncadas que están amidadas,

(iii) exendina-4 truncada y formas truncadas que están amidadas, en las que se han sustituido secuencias de uno o más restos de aminoácidos por restos de aminoácidos diferentes,

(iv) GLP-1 y GLP-1 amidado,

5 (v) análogos de GLP-1 y análogos de GLP-1 amidados, en los que se han sustituido secuencias de uno o más restos de aminoácidos por restos de aminoácidos diferentes, incluyendo modificaciones N-terminales,

(vi) GLP-1 truncado y formas truncadas que están amidadas,

(vii) GLP-1 truncado y formas truncadas que están amidadas, en los que se han sustituido secuencias de uno o más restos de aminoácidos por restos de aminoácidos diferentes,

10 (viii) las sustancias ya conocidas AVE-0010 (ZP-10) (Sanofi-Aventis Zealand Pharma), BAY-73-7977 (Bayer), TH-0318, BIM-51077 (Ipsen, Tejin, Roche), NN-2211 (Novo Nordisk), LY315902.

15 Los agonistas de GLP-1 imitan las actividades del GLP-1 natural uniéndose al o a los receptores en los que GLP-1 ejerce sus acciones que son beneficiosas como insulínico y en el tratamiento de la diabetes mellitus, o imitando los efectos de la exendina en el flujo de orina, ralentizando el vaciado gástrico, induciendo saciedad, aumentando la excreción de sodio en la orina y/o disminuyendo la concentración de potasio en la orina, uniéndose al o a los receptores donde la exendina causa estos efectos.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “relación de pico a valle” se pretende que indique la relación entre la concentración plasmática más alta y la concentración plasmática más baja de un compuesto de insulina, tal como insulina humana, dentro de un periodo dado entre administraciones.

20 Como se usa en la presente memoria, la expresión “compuesto de insulina estructuralmente intacto” se pretende que indique insulina intacta que consiste en dos péptidos llamados cadena A y cadena B que están conectados por dos puentes disulfuro. Además, la cadena A contiene un puente disulfuro intramolecular. La pérdida de los puentes disulfuro intra o intermoleculares o reorganizaciones de las dos cadenas, como homodímeros A-A o B-B producen la inactivación de la insulina. La integridad estructural se mide por digestión de la insulina con una endoproteasa adecuada, como, por ejemplo, endo-gluC, y analizando los fragmentos resultantes por espectrometría de masas. La ausencia de señales resultantes de las cadenas de insulina individuales indica insulina intacta. Como se usa en la presente memoria, el término “profármaco” se pretende que indique un compuesto de insulina que sufre biotransformación antes de presentar sus efectos farmacológicos. Los profármacos pueden verse, por lo tanto, como restos biológicamente activos que contienen grupos protectores no tóxicos especializados, usados de una forma transitoria para alterar o eliminar propiedades indeseables en la molécula original. Por ejemplo, el profármaco puede ser una amida biohidrolizable y éster biohidrolizable y también abarca a) compuestos en los que está abarcada en el compuesto la funcionalidad biohidrolizable en dicho profármaco, y b) compuestos que se pueden oxidar o reducir biológicamente en un grupo funcional dado. Los profármacos típicos pueden ser un profármaco unido a vehículo que contiene una unión temporal de una sustancia activa con un grupo vehículo transitorio que produce mejores propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas y que puede ser eliminado in vivo fácilmente, normalmente por escisión hidrolítica; un profármaco de cascada en el que la escisión del grupo vehículo se hace efectiva solo después de desenmascarar un grupo activante.

35 Para potenciar las propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas de un fármaco, tal como insulina, in vivo, dicho fármaco se puede conjugar con un vehículo. Si el fármaco está transitoriamente unido a un vehículo y/o un conector, dichos sistemas se asignan habitualmente como profármacos unidos a vehículo. De acuerdo con las definiciones proporcionadas por la IUPAC (dadas en <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac.medchem>, accedido el 22 de julio, 2009), un profármaco unido a vehículo es un profármaco que contiene una unión temporal de una sustancia activa dada con un grupo vehículo transitorio que produce mejores propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas y que se puede separar fácilmente in vivo, normalmente por escisión hidrolítica.

40 Los conectores usados en dichos profármacos unidos a vehículo son transitorios, lo que significa que son degradables por hidrólisis no enzimática (escindibles) en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37°C) con semividas en el intervalo, por ejemplo, de una hora a 3 meses.

45 Los vehículos adecuados son polímeros y se pueden conjugar directamente al conector o por un espaciador no escindible. El “profármaco de insulina-hidrogel” se refiere a un profármaco, en el que la insulina está unida transitoriamente a un vehículo de hidrogel. Las expresiones “profármaco de hidrogel” y “profármaco unido a hidrogel” se refieren a profármacos de agentes biológicamente activos transitoriamente unidos a un hidrogel y se usan de forma sinónima.

50 Los términos “fármaco”, “molécula biológicamente activa”, “resto biológicamente activo”, “agente biológicamente activo”, “agente activo”, y similares, significa cualquier sustancia que puede afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un organismo biológico, incluyendo, pero no limitado a virus, bacterias, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, como se usa en la presente memoria, las moléculas biológicamente activas incluyen cualquier sustancia dirigida al diagnóstico, cura, mitigado, tratamiento o prevención de enfermedad en seres

humanos u otros animales, o de otra forma a potenciar el bienestar físico o mental de seres humanos o animales.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de insulina como se usa en la presente memoria, significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones químicas de una enfermedad dada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como “cantidad terapéuticamente eficaz”. Las cantidades eficaces para dicho fin dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como del peso y estado general del sujeto. Se entenderá que la determinación de una dosis adecuada se puede lograr usando experimentación rutinaria, construyendo una matriz de valores y ensayando diferentes puntos de la matriz, que está dentro de las habilidades ordinarias del médico experto.

“Estable” y “estabilidad” significa que dentro del tiempo de almacenamiento indicado, los conjugados de hidrogel permanecen conjugados y no se hidrolizan en una extensión sustancial y presentan un perfil de impurezas aceptable en relación con la insulina. Para que se considere estable, la composición contiene menos de 5% del fármaco en su forma libre.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “éster biohidrolizable” es un éster de un compuesto que a) no interfiere con la actividad biológica de la sustancia original pero confiere a esa sustancia propiedades ventajosas in vivo tales como duración de la acción, inicio de la acción, y similares, o b) es biológicamente inactiva, pero es convertida fácilmente in vivo por el sujeto en el principio biológicamente activo.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “amida biohidrolizable” es una amida de un compuesto que a) no interfiere con la actividad biológica de la sustancia original pero confiere a esa sustancia propiedades ventajosas in vivo tales como duración de la acción, inicio de la acción, y similares, o b) es biológicamente inactiva, pero es convertida fácilmente in vivo por el sujeto en el principio biológicamente activo.

Como se usa en la presente memoria, el término “un hidrogel” se pretende que indica una red polimérica hidrófila o anfifílica, tridimensional, capaz de absorber cantidades grandes de agua. Las redes están compuestas de homopolímeros o copolímeros, son insolubles debido a la presencia de reticulaciones físicas o químicas covalentes (iónicas, interacciones hidrófobas, enredados). Las reticulaciones proporcionan la estructura de red y la integridad física. Los hidrogeles presentan una compatibilidad termodinámica con el agua que les permite hincharse en medio acuoso. Las cadenas de la red están conectadas de modo que existen poros y que una fracción sustancial de estos poros es de dimensiones entre 1 nm y 1000 nm.

El término “gel” se refiere a una solución de polímero de tipo jalea, no reticulada.

Como se usa en la presente memoria, el término “un depósito” se pretende que indique un sistema de liberación de fármaco, típicamente inyectado como una inyección subcutánea o intramuscular, de un compuesto de insulina, capaz de liberar de manera uniforme el compuesto activo a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “una concentración máxima” se pretende que indique la concentración más alta obtenida después de administración de un compuesto de insulina.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “un compuesto de insulina” se pretende que indique cualquier insulina de origen de mamífero, tal como insulina humana, insulina porcina o insulina bovina con puentes disulfuro entre las CysA7 y CysB7 y entre las CysA20 y CysB19 y un puente disulfuro interno entre las CysA6 y CysA11, insulina de mamífero recombinante, tal como insulina humana recombinante, análogos de insulina, derivados de insulina y fragmentos de los mismos, son ejemplos típicos la insulina rh, insulina glargina, insulina detemir, insulina glulisina, insulina aspart, insulina lispro, insulina conjugada con PEG de bajo peso molecular, en donde el PEG de bajo peso molecular tiene un peso molecular menor de 10 kDa. El compuesto de insulina puede estar en forma de un profármaco, en cuyo caso el compuesto que se va a liberar en el plasma es la insulina activa que se forma después de administración del profármaco.

Por “análogo de insulina” como se usa en la presente memoria, se entiende un polipéptido que tiene una estructura molecular que formalmente puede derivar de la estructura de una insulina que se encuentra de forma natural, por ejemplo, la de la insulina humana, eliminando y/o intercambiando al menos un resto de aminoácido que se encuentra en la insulina natural y/o añadiendo al menos un resto de aminoácido. Los restos de aminoácidos añadidos y/o intercambiados pueden ser restos de aminoácidos codificables u otros restos que se encuentran de forma natural o restos de aminoácidos puramente sintéticos.

Los análogos de insulina pueden ser aquellos en los que la posición 28 de la cadena B se puede modificar del resto de Pro natural a uno de Asp, Lys o lie. En otro aspecto, la Lys en la posición B29 se modifica a Pro. También, la Asn en la posición A21 se puede modificar a Ala, Gln, Glu, Gly, His, lie, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular a Gly, Ala, Ser o Thr y preferiblemente a Gly. Además, la Asn en la posición B3 se puede modificar a Lys o Asp. Ejemplos adicionales de análogos de insulina son insulina humana des(B30); des(B30); análogos de insulina humana des(B30); análogos de insulina en donde se ha eliminado PheB1; análogos de insulina en donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión N-terminal y análogos de insulina en donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión C-terminal. Por lo tanto, se pueden añadir una o dos Arg en la posición B1.

Por "insulina desB30" o "insulina humana desB30" se entiende una insulina natural o un análogo de la misma que carece del resto de aminoácido B30. De forma similar, "insulina desB29desB30" o "insulina humana desB29desB30" significa una insulina natural o un análogo de la misma que carece de los restos de aminoácidos B29 y B30.

- 5 Por "B1", "A1" etc., se entiende el resto de aminoácido en la posición 1 en la cadena B de la insulina (contado desde el extremo N-terminal) y el resto de aminoácido en la posición 1 en la cadena A de la insulina (contado desde el extremo N-terminal), respectivamente. El resto de aminoácido en una posición específica también se puede indicar, p. ej., como PheB1 que significa que el resto de aminoácido en la posición B1 es un resto de fenilalanina.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "conector no activo" significa un conector que no muestra los efectos farmacológicos del fármaco derivado del agente biológicamente activo.

- 10 Como se usa en la presente memoria, el término "alquilo" significa una cadena de carbonos lineal o ramificada. Cada hidrógeno de un carbono del alquilo se puede sustituir por un sustituyente.

- 15 Como se usa en la presente memoria, la expresión "alquilo C₁₋₄" significa una cadena de alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono, p. ej., si está presente en el extremo de una molécula: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo; terc-butilo, o p. ej. -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono del alquilo C₁₋₄ se puede sustituir por un sustituyente.

- 20 Como se usa en la presente memoria, la expresión "alquilo C₁₋₆" significa una cadena de alquilo que tiene 1-6 átomos de carbono, p. ej., si está presente en el extremo de una molécula: alquilo C₁₋₄, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo; terc-butilo, n-pentilo; n-hexilo, o p. ej. -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono del alquilo C₁₋₆ se puede sustituir por un sustituyente.

Por consiguiente, "alquilo C₁₋₁₈" significa una cadena de alquilo que tiene de 1 a 18 átomos de carbono, y "alquilo C₈₋₁₈" significa una cadena de alquilo que tiene de 8 a 18 átomos de carbono. Por consiguiente, "alquilo C₁₋₅₀" significa una cadena de alquilo que tiene de 1 a 50 átomos de carbono.

- 25 Como se usa en la presente memoria, la expresión "alqueno C₂₋₅₀" significa una cadena de alqueno ramificada o no ramificada que tiene de 2 a 50 átomos de carbono, p. ej., si está presente en el extremo de una molécula: -CH=CH₂, -CH=CH-CH₃, -CH₂-CH=CH₂, -CH=CH-CH₂-CH₃, -CH=CH-CH=CH₂, o p. ej. -CH=CH-, cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alqueno. Cada hidrógeno de un carbono del alqueno C₂₋₅₀ se puede sustituir por un sustituyente como se especifica adicionalmente. Por consiguiente, el término "alqueno" se refiere a una cadena de carbonos con al menos un doble enlace carbono-carbono. Opcionalmente, puede haber uno o más triples enlaces.

- 35 Como se usa en la presente memoria, la expresión "alquino C₂₋₅₀" significa una cadena de alquino ramificada o no ramificada que tiene de 2 a 50 átomos de carbono, p. ej., si está presente en el extremo de una molécula: -C≡CH, -CH₂-C≡CH, CH₂-CH₂-C≡CH, CH₂-C≡C-CH₃, o p. ej. -C≡C- cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquino. Cada hidrógeno de un carbono del alquino C₂₋₅₀ se puede sustituir por un sustituyente como se especifica adicionalmente. Por consiguiente, el término "alquino" se refiere a una cadena de carbonos con al menos un triple enlace carbono-carbono. Opcionalmente, puede haber uno o más dobles enlaces.

- 40 Como se usa en la presente memoria, la expresión "cicloalquilo C₃₋₇" o "anillo de cicloalquilo C₃₋₇" significa una cadena de alquilo cíclica que tiene de 3 a 7 átomos de carbono, que puede tener dobles enlaces carbono-carbono que están al menos parcialmente saturados, p. ej. ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo. Cada hidrógeno de un carbono del cicloalquilo se puede sustituir por un sustituyente. La expresión "cicloalquilo C₃₋₇" o "anillo de cicloalquilo C₃₋₇" también incluye bicíclo con puente tales como norbornano o norborneno. Por consiguiente, "cicloalquilo C₃₋₅" significa un cicloalquilo que tiene de 3 a 5 átomos de carbono.

- 45 Por consiguiente, "cicloalquilo C₃₋₁₀" significa un alquilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, p. ej., cicloalquilo C₃₋₇, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclodecilo. El término "cicloalquilo C₃₋₁₀" también incluye carbamono y bicíclo parcialmente saturados.

Como se usa en la presente memoria, el término "halógeno" significa fluoro, cloro, bromo o yodo. Se prefiere en general que el halógeno sea fluoro o cloro.

- 50 Como se usa en la presente memoria, la expresión "heterociclilo de 4 a 7 miembros" o "heterociclo de 4 a 7 miembros" significa un anillo con 4, 5, 6 o 7 átomos en el anillo, que puede contener hasta el número máximo de dobles enlaces (anillo aromático o no aromático que está totalmente, parcialmente o no saturado) en donde al menos un átomo del anillo hasta 4 átomos del anillo se sustituyen por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (que incluye -S(O)-, -S(O)₂-), oxígeno (que incluye =N(O)-) y en donde el anillo está unido al resto de la molécula por un átomo de carbono o nitrógeno. Los ejemplos para un heterociclo de 4 a 7 miembros son azetidina, oxetano, tietano, furano, tiofeno, pirrol, pirrolina, imidazol, imidazolina, pirazol, pirazolina, oxazol, oxazolina, isoxazol, isoxazolina, tiazol, tiazolina, isotiazol, isotiazolina, tiadiazol, tiadiazolina, tetrahidrofurano,

tetrahidrotiofeno, pirrolidina, imidazolidina, pirazolidina, oxazolidina, isoxazolidina, tiazolidina, isotiazolidina, tiadiazolidina, sulfolano, pirano, dihidropirano, tetrahidropirano, imidazolidina, piridina, piridazina, pirazina, pirimidina, piperazina, piperidina, morfolina, tetrazol, triazol, triazolidina, tetrazolidina, diazepane, azepina o homopiperazina.

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión “heterobicielo de 9 a 11 miembros” o “heterobiciclo de 9 a 11 miembros” significa un sistema heterocíclico de dos anillos con 9 a 11 átomos en el anillo, en donde al menos un átomo del anillo es compartido por ambos anillos y que puede contener hasta el número máximo de dobles enlaces (anillo aromático o no aromático que está totalmente, parcialmente o no saturado) en donde al menos un átomo del anillo hasta 6 átomos del anillo se sustituyen por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (que incluye -S(O)-, -S(O)₂-), oxígeno y nitrógeno (que incluye =N(O)-) y en donde el anillo está unido al resto de la molécula por un átomo de carbono o nitrógeno. Los ejemplos para un heterobiciclo de 9 a 11 miembros son indol, indolina, benzofurano, benzotiofeno, benzoxazol, bencisoxazol, benzotiazol, bencisotiazol, bencimidazol, bencimidazolina, quinolina, quinazolina, dihidroquinazolina, quinolina, dihidroquinolina, tetrahidroquinolina, decahidroquinolina, isoquinolina, decahidroisoquinolina, tetrahidroisoquinolina, dihidroisoquinolina, benzazepina, purina o pteridina. La expresión heterobiciclo de 9 a 11 miembros también incluye estructuras espiránicas de dos anillos como 1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decano o heterobiciclos con puente como 8-aza-biciclo[3.2.1]octano.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora tal como la EMEA (Europa) y/o la FDA (EE.UU.) y/o cualquier otra agencia reguladora nacional para uso en animales, preferiblemente en seres humanos.

20 Como se usa en la presente memoria, la expresión “composición farmacéutica” o “composición” significa uno o más ingredientes activos, y uno o más ingredientes inertes, así como cualquier producto que sea resultado, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de cualesquiera dos o más de los ingredientes o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualquier composición hecha mezclando un compuesto de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable (vehículo farmacéuticamente aceptable).

La “forma libre” de un fármaco se refiere al fármaco en su forma farmacológicamente activa, no modificada, tal como después de ser liberado de un conjugado de polímero.

30 “Composición seca” significa que la composición de profármaco de hidrogel de insulina se proporciona en una forma seca en un recipiente. Métodos adecuados para el secado son el secado por atomización y la liofilización (congelación-secado). Dicha composición seca de profármaco de hidrogel de insulina tiene un contenido de agua residual de un máximo de 10%, preferiblemente menos de 5% y más preferiblemente menos de 2% (determinado de acuerdo con Karl Fischer). El método preferido de secado es la liofilización. “Composición liofilizada” significa que la composición de profármaco de polímero de hidrogel de insulina primero se ha congelado y posteriormente se ha sometido a reducción de agua por medio de presión reducida. Esta terminología no excluye etapas de secado adicionales que ocurren en el procedimiento de fabricación antes de cargar la composición en el recipiente final.

La “liofilización” (congelación-secado) es un procedimiento de deshidratación caracterizado por la congelación de una composición y después reducción de la presión que la rodea y, opcionalmente adición de calor para permitir que el agua congelada en la composición sublime directamente de la fase sólida a la gaseosa. Típicamente, el agua sublimada se recoge por desublimación.

40 “Reconstitución” significa la adición de un líquido para devolver la forma original de la composición.

“Solución de reconstitución” se refiere al líquido usado para reconstituir la composición seca de un profármaco de hidrogel de insulina antes de la administración a un paciente que lo necesite.

“Recipiente” significa cualquier recipiente en el que está comprendida la composición de profármaco de hidrogel de insulina y se puede almacenar hasta la reconstitución.

45 Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto de insulina como se usa en la presente memoria, significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como la “cantidad terapéuticamente eficaz”. Las cantidades eficaces para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión así como del peso y estado general del sujeto. Se entenderá que determinar una dosis adecuada se puede lograr usando experimentación rutinaria, construyendo una matriz de valores y probando diferentes puntos de la matriz, lo cual está dentro de las habilidades ordinarias del médico o veterinario experto.

55 “Tampón” o “agente de tamponamiento” se refiere a compuestos químicos que mantienen el pH en un intervalo deseado. Los tampones fisiológicamente tolerados son, por ejemplo, fosfato sódico, succinato, histidina, bicarbonato, citrato y acetato, sulfato, nitrato, cloruro, piruvato. También se pueden usar antiácidos tales como Mg(OH)₂ o ZnCO₃. La capacidad de tamponamiento se puede ajustar para que se corresponda con las condiciones más sensibles a la estabilidad del pH.

“Excipientes” se refieren a compuestos administrados junto con el agente terapéutico, por ejemplo, agentes de tamponamiento, modificadores de la isotonicidad, conservantes, estabilizantes, agentes antiadsorción, agentes protectores de la oxidación u otros agentes auxiliares. Sin embargo, en algunos casos, un excipiente puede tener función doble o triple.

- 5 Un “lioprotector” es una molécula que cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína tras secado en general y en especial durante la liofilización y posterior almacenamiento. Los ejemplos de lioprotectores incluyen azúcares, tales como sacarosa o trehalosa; aminoácidos tales como glutamato monosódico o histidina; metilaminas tales como betaína; sales liotrópicas tales como sulfato magnésico; polioles tales como alcoholes de azúcar trihídrico o superiores; p. ej. glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, y manitol; etilenglicol; propilenglicol; polietilenglicol; plurónicos; hidroxialquil-almidones, p. ej. hidroxietil-almidón (HES), y combinaciones de los mismos.

“Tensioactivo” se refiere a agentes humectantes que disminuyen la tensión superficial de un líquido.

“Modificadores de la isotonicidad” se refieren a compuestos que minimizan el dolor que puede producirse por el daño a la célula debido a diferencias de presión osmótica en el depósito de inyección.

- 15 El término “estabilizantes” se refiere a compuestos usados para estabilizar el profármaco polimérico. La estabilización se logra fortaleciendo las fuerzas estabilizadoras de la proteína, desestabilizando el estado desnaturalizado o por unión directa de excipientes a la proteína.

- 20 “Agentes antiadsorción” se refiere a tensioactivos principalmente iónicos o no iónicos u otras proteínas o polímeros solubles usados para recubrir o adsorberse de forma competitiva en la superficie interior del recipiente de la composición. La concentración y tipo de excipiente elegido depende del efecto que se va a evitar, pero típicamente se forma una monocapa de tensioactivo en la interfase justo por encima del valor de CMC.

“Agentes de protección frente a la oxidación” se refiere a antioxidantes tales como ácido ascórbico, ectoína, metionina, glutatión, monotioglicerol, morina, polietilenimina (PEI), galato de propilo, vitamina E, agentes quelantes tales como ácido cítrico, EDTA, hexafosfato, ácido tioglicólico.

- 25 “Antimicrobiano” se refiere a una sustancia química que mata o inhibe el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, hongos, levaduras, protozoos y/o destruye virus.

“Sellado de un recipiente” se refiere a que el recipiente se cierra de forma que es estanco al aire, no permitiendo el intercambio de gases entre el exterior y el interior y manteniendo el contenido estéril.

- 30 “Farmacéuticamente aceptable” se entiende que abarca cualquier excipiente y/o aditivo, que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el hospedante al que se le administra.

El término “reactivo” se refiere a un material intermedio o de partida usado en el proceso de ensamblado que conduce a un profármaco de la presente invención.

- 35 La expresión “grupo funcional químico” se refiere a ácido carboxílico y derivados activados, amino, maleimida, tiol y derivados, ácido sulfónico y derivados, carbonato y derivados, carbamato y derivados, hidroxilo, aldehído, cetona, hidrazina, isocianato, isotiocianato, ácido fosfórico y derivados, ácidos fosfónico y derivados halogenoacetilo, haluros de alquilo, acrililo y otros aceptores de Michael alfa,beta-insaturados, agentes de arilación como fluoruros de arilo, hidroxilamina, disulfuros, como disulfuro de piridilo, vinilsulfona, vinilcetona, diazolalcanos, compuestos de diazoacetilo, oxirano y aziridina.

- 40 Si un grupo funcional químico se acopla a otro grupo funcional químico, la estructura química resultante se denomina un “enlace”. Por ejemplo, la reacción de un grupo amina con un grupo carboxilo da como resultado un enlace amida.

“Grupos funcionales reactivos” son grupos funcionales químicos del resto de cadena principal, que están conectados al resto hiper-ramificado.

- 45 “Grupo funcional” es el término colectivo usado para “grupo funcional reactivo”, “grupo funcional interconectado degradable” o “grupo funcional conjugado”.

- 50 Un “grupo funcional interconectado degradable” es una unión que comprende un enlace biodegradable que en un lado está conectado a un resto espaciador conectado a un resto de cadena principal y en el otro lado está conectado al resto de reticulación. Las expresiones “grupo funcional interconectado degradable”, “grupo funcional interconectado biodegradable”, “grupo funcional biodegradable interconectado” y “grupo funcional interconectado” se usan de forma sinónima.

Las expresiones “grupo bloqueante” o “grupo de remate” se usan de forma sinónima y se refieren a restos que están conectados de forma irreversible a grupos funcionales reactivos para hacerlos incapaces de reaccionar con, por ejemplo, grupos funcionales químicos.

Las expresiones “grupo de protección” o “grupo protector” se refiere a un resto que está conectado de forma reversible a grupos funcionales reactivos para hacerlos incapaces de reaccionar con, por ejemplo, grupos funcionales químicos.

5 La expresión “grupo funcional interconectable” se refiere a grupos funcionales químicos, que participan en una reacción de polimerización por radicales y son parte del reactivo de reticulación o del reactivo de la cadena principal.

La expresión “grupo funcional polimerizable” se refiere a grupos funcionales químicos que participan en una reacción de polimerización de tipo ligado y son parte del reactivo de reticulación y del reactivo de la cadena principal.

10 Para los grupos funcionales interconectados, la expresión “degradable por hidrólisis” se refiere en el contexto de la presente invención a uniones que son degradables por hidrólisis de forma no enzimática en condiciones fisiológicas (tampón acuoso de pH 7,4, 37°C) con semividas en el intervalo de una hora a tres meses, e incluyen, pero no se limitan a aconitilos, acetales, anhídridos carboxílicos, ésteres, iminas, hidrazonas, amidas del ácido maleámico, ortoésteres, fosfamidias, fosfoésteres, ésteres de fosfosililo, ésteres de sililo, ésteres sulfónicos, carbamatos aromáticos, combinaciones de los mismos, y similares. Las uniones biodegradables preferidas son ésteres carboxílicos, carbonatos, fosfoésteres y ésteres de ácido sulfónico y las más preferidas son ésteres carboxílicos o carbonatos. Se entiende que para condiciones aceleradas de estudios in vitro, como por ejemplo pH 9, 37°C, se puede usar tampón acuoso para fines prácticos.

Un resto de cadena principal puede comprender un resto espaciador que en un extremo está conectado al resto de la cadena principal y en el otro lado al resto de reticulación.

20 El término “derivados” se refiere a grupos funcionales químicos adecuadamente sustituidos con grupos protectores y/o activantes, o a formas activadas de un grupo funcional químico correspondiente, que son conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, las formas activadas de los grupos carboxilo incluyen, pero no se limitan a ésteres activos, tales como éster de succinimidilo, éster de benzotriazilo, éster de nitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, éster de azabenzotriazilo, halogenuros de acilo, anhídridos mixtos o simétricos, acil-imidazoles.

25 La expresión “conector escindible de forma no enzimática” se refiere a conectores que son degradables por hidrólisis en condiciones fisiológicas sin actividad enzimática.

“Conector no activo biológicamente” significa un conector que no muestra los efectos farmacológicos del fármaco (D-H) derivado del resto biológicamente activo.

30 Los términos “espaciador”, “grupo espaciador”, “molécula espaciadora” y “resto espaciador” se usan de forma intercambiable y si se usan para describir un resto presente en el vehículo de hidrogel de la invención, se refieren a cualquier resto adecuado para conector dos restos, tales como alquilo C₁₋₅₀, alqueno C₂₋₅₀ o alquino C₂₋₅₀, cuyo fragmento está opcionalmente interrumpido por uno o más grupos seleccionados de -NH-, -N(alquilo C₁₋₄)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)N(alquilo C₁₋₄)-, -O-C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂-, heterocicliilo de 4 a 7, fenilo o naftilo.

35 Los términos “terminal”, “extremo” o “extremo distal” se refieren a la posición de un grupo funcional o unión dentro de una molécula o resto, de modo que dicho grupo funcional puede ser un grupo funcional químico y la unión puede ser una unión degradable o permanente, caracterizado por estar situado adyacente a o en una unión entre dos restos o en el extremo de una cadena oligómera o polímera.

40 Las frases “en forma unida” o “resto” se refieren a subestructuras que son parte de una molécula más grande. La frase “en forma unida” se usa para simplificar la referencia a restos nombrando o citando reactivos, materiales de partida o materiales de partida hipotéticos bien conocidos en la técnica, y de esta forma “en forma unida” significa, por ejemplo, que uno o más radicales hidrógeno (-H), o uno o más grupos activantes o protectores presentes en los reactivos o materiales de partida no están presentes en el resto.

45 Se entiende que todos los reactivos y restos que comprenden los restos poliméricos se refieren a entidades macromoleculares que se sabe que presentan variabilidades con respecto al peso molecular, longitudes de cadena o grado de polimerización, o el número de grupos funcionales. Las estructuras mostradas para los reactivos de cadena principal, restos de cadena principal, reactivos de reticulación y restos de reticulación son, por lo tanto, solo ejemplos representativos.

Un reactivo o resto puede ser lineal o ramificado. Si el reactivo o resto tiene dos grupos terminales, se refiere a un reactivo o resto lineal. Si el reactivo o resto tiene más de dos grupos terminales, se considera que es un reactivo o resto ramificado o multifuncional.

50 La expresión “cadena polimérica basada en polietilenglicol” o “cadena basada en PEG” se refiere a una cadena molecular oligomérica o polimérica.

Preferiblemente, dicha cadena polimérica basada en polietilenglicol está conectada a un centro que se ramifica, es una cadena de polietilenglicol lineal, de la cual uno de los extremos está conectado al centro que se ramifica y el otro a un resto dendrítico hiper-ramificado. Se entiende que una cadena basada en PEG puede terminar o estar

interrumpida por grupos alquilo o arilo opcionalmente sustituidos con heteroátomos y grupos funcionales químicos.

Si la expresión "cadena polimérica basada en polietilenglicol" se usa en referencia a un reactivo de reticulación, se refiere a un resto o cadena de reticulación que comprende al menos 20% en peso de restos de etilenglicol.

5 Como se usa en la presente memoria, los términos "un", "una" y "el" y "la" y referencias similares deben considerarse que cubren tanto el singular como el plural salvo que se indique otra cosa en la presente memoria o el contexto lo contradiga claramente.

Descripción

10 La presente invención se refiere a una preparación de insulina de acción prolongada para cubrir la insulina basal. Las insulinas basales son formulaciones de acción prolongada de insulina o análogos de insulina diseñadas para imitar el resultado de la insulina basal de las células beta pancreáticas. De forma óptima la glucosa en la sangre es controlada así eficazmente de una forma sostenida durante todo el intervalo de administración.

15 Los autores de la presente invención han descubierto que un compuesto de insulina puede ser liberado de un depósito inyectable, tal como por vía subcutánea, continuamente de forma estructuralmente intacta entre administraciones sin verse ningún efecto de aumento brusco. La integridad estructural del compuesto de insulina liberado se proporciona mediante una matriz de polímero bien hidratada que minimiza el contacto intermolecular de moléculas de insulina. Además, evitando un aumento brusco de insulina se reduce el riesgo de efectos secundarios dañinos en un paciente.

20 La presente invención reduce el riesgo de hipoglucemia después de administración debido a que carece de liberación de insulina de tipo aumento brusco, reduce el riesgo de hiperglucemia al final del periodo de dosificación, reduce la frecuencia de inyección y proporciona niveles de insulina predecibles en el plasma sanguíneo en un paciente.

25 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una nueva insulina basal que requiere menor frecuencia de inyección que los regímenes de insulina basales diarios actuales y proporciona un nivel alto de seguridad liberando insulina estructuralmente intacta a lo largo del intervalo de tiempo completo entre inyecciones, y típicamente con una relación de pico a valle menor de 2.

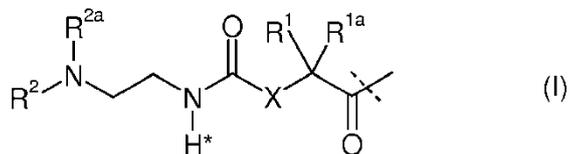
Las ventajas adicionales serán evidentes con la lectura de la presente descripción.

30 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina en una concentración de al menos 10 mg/ml, caracterizada por tener un perfil farmacocinético in vivo sustancialmente sin aumento brusco del compuesto de insulina, y en donde el compuesto de insulina está completamente contenido en un depósito, y en donde el compuesto de insulina está unido covalentemente en el depósito,

en donde el compuesto de insulina es un profármaco o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, que es un conjugado de insulina-conector D-L, en donde

D representa el resto de insulina; y

35 -L es un resto conector biológicamente no activo -L1 representado por la fórmula (I),



en donde la línea de trazos indica la unión a uno de los grupos amino de la insulina por formación de un enlace amida;

X es C(R3R3a); o N(R3);

40 R1a, R3a se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, NH(R2b), N(R2b)C(O)R4 y alquilo C1-4;

R1, R2 R2a, R2b, R3, R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C1-4, en donde L1 está sustituido con un L2-Z y opcionalmente sustituido adicionalmente, con la condición de que el hidrógeno marcado con un asterisco en la fórmula (I) no se sustituya por ningún sustituyente, y en donde

L2 es un enlace químico simple o un espaciador; y

45 Z es un hidrogel.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina en una concentración de al menos 11 mg/ml para administrar en una sola dosis de al menos 10 mg de compuesto de insulina.

5 Como se usa en la presente memoria, una sola dosis de compuesto de insulina se da en mg y la concentración de un compuesto de insulina en una composición farmacéutica se da en mg/ml. Si el compuesto de insulina es un profármaco, la concentración se basa en la liberación cuantitativa de insulina libre del profármaco. Mediante métodos bien conocidos en la técnica, partes alícuotas de una composición se someten a condiciones de liberación de insulina (tampón acuoso a pH 7,4, 37°C, o condiciones aceleradas a pH elevado) hasta que no se observa un aumento significativo de la concentración de insulina y se determina la cantidad total de insulina liberada. Se entiende que en el caso de vehículos solubles, la liberación cuantitativa es sinónima de hidrólisis cuantitativa.

En una realización de la presente invención, la concentración del compuesto de insulina es al menos 11 mg/ml, tal como de 11 mg/ml a 35 mg/ml, más preferido de 15 mg/ml a 25 mg/ml, incluso más preferido aproximadamente 20 mg/ml, e incluso más preferido aproximadamente 24 mg/ml.

15 El volumen que se va a administrar con el fin de administrar una dosis eficaz, por ejemplo, mediante una jeringa, a un sujeto, tal como un sujeto humano, es preferiblemente menor de 1,5 ml, típicamente 1,0 ml o menos.

En una realización adicional la dosis única del compuesto de insulina es al menos 5 mg, tal como de 5 mg a 100 mg, más preferido de 5 mg a 50 mg, y más preferido de 5 mg a 25 mg.

20 En una realización adicional, la relación de la concentración máxima de un compuesto de insulina en el plasma sanguíneo durante las primeras 48 horas después de la administración, tal como subcutánea o intramuscular, a la concentración más baja de un compuesto de insulina en el plasma sanguíneo después de la concentración máxima durante las primeras 48 horas después de la administración es menor de 2, típicamente menor de 1,5.

25 Las realizaciones anteriores, así como las realizaciones descritas en lo sucesivo, deben verse como que se refieren a uno cualquiera de los aspectos descritos en la presente memoria, así como también a una cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, salvo que se especifique que una realización se refiere a un determinado aspecto o aspectos de la presente invención.

La composición farmacéutica típicamente es un sistema de suministro controlado que comprende un compuesto de insulina y se caracteriza por el suministro del compuesto de insulina en el plasma sanguíneo de un mamífero, de una forma que esencialmente no experimente aumento brusco.

30 En una realización adicional más, se mide el perfil farmacocinético en el plasma sanguíneo de un mamífero, tal como el plasma sanguíneo humano. Las concentraciones de insulina en el plasma se pueden medir con kits de ELISA disponibles en el mercado, relacionando los resultados de una curva de calibración obtenida a partir de un patrón de insulina. Para la significación estadística, el experimento se lleva a cabo con un número adecuado de repeticiones biológicas y técnicas, y se calculan los valores medios y medianas para el ajuste por la variabilidad biológica y técnica.

35 En una realización adicional, la composición se caracteriza porque presenta una relación de pico a valle menor de 2, típicamente menor de 1,75, preferiblemente menor de 1,5, o incluso menor de 1,25.

En una realización adicional más, la composición se caracteriza por una liberación continua de un compuesto de insulina estructuralmente intacto a lo largo del periodo de tiempo completo entre administraciones.

“Liberación continua” se refiere a una liberación de insulina no interrumpida.

40 En una realización adicional, el periodo de tiempo completo entre administraciones es al menos aproximadamente 80 horas, tal como aproximadamente 110 horas, típicamente al menos una semana, tal como 1-2 semanas o incluso más prolongado.

En una realización adicional más, el compuesto de insulina es un profármaco.

En una realización adicional, el compuesto de insulina es un profármaco unido a vehículo.

45 En una realización adicional más, el compuesto de insulina es un profármaco de cascada.

El profármaco se puede administrar como un líquido, tal como una solución o gel, o puede estar contenido en un depósito, o incluso integrado en un depósito, de modo que el depósito funciona como un profármaco.

En una realización adicional, el compuesto de insulina está totalmente contenido en un depósito.

50 La expresión “totalmente contenido” se refiere a un depósito, en el que menos de 10% del fármaco, es decir, insulina, está presente en la fracción de agua después de añadir 1 ml de agua a 1 ml de depósito, mezclar y separar el depósito del agua.

En una realización adicional más, el depósito es un gel polimérico, tal como un hidrogel.

En una realización adicional, el depósito es una matriz de polímero bien hidratada.

5 El compuesto de insulina puede estar contenido en el depósito de varias formas, por ejemplo, el compuesto de insulina puede estar unido de una forma no covalente o el compuesto de insulina puede estar unido de forma covalente al depósito, cuyo depósito se selecciona, sin limitación, de un gel de polímero, un hidrogel o una matriz de polímero bien hidratada. Los ejemplos no limitantes de polímeros adecuados son polímeros que son capaces de formar redes moleculares bien hidratadas tridimensionales casi infinitas. Dichos hidrogeles son polímeros basados en polialquiloxi funcionalizados o no funcionalizados, química o físicamente reticulados como poli(propilenglicol) o poli(etilenglicol), dextrano, chitosán, ácido hialurónico y derivados, alginato, xilano, manano, carragenano, agarosa, 10 celulosa, almidón, hidroxietil-almidón (HES) y otros polímeros basados en hidratos de carbono, poli(alcoholes vinílicos), poli(oxazolinas), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(carbonatos), poli(uretanos), poli(ácidos acrílicos), poli(acrilamidas) tales como poli(hidroxi propilmetacrilamida) (HMPA), poli(acrilatos), poli(metacrilatos) como poli(hidroxietilmetacrilato), poli(organofosfazenos), poli(siloxanos), poli(vinilpirrolidona), poli(cianoacrilatos), poli(ésteres) tales como poli(ácido láctico) o poli(ácidos glicólicos), poli(iminocarbonatos), poli(aminoácidos) tales como poli(ácido glutámico) o polilisina, colágeno, gelatina, copolímeros, copolímeros de injerto, polímeros reticulados, hidrogeles y copolímeros de bloques de los polímeros citados antes. Estos polímeros pueden servir como restos de cadena principal o restos de reticulación y son posibles combinaciones de diferentes polímeros como copolímeros, que proporcionen un alto nivel de hidratación de la red molecular. Además de los restos de reticulación oligoméricos o poliméricos de los tipos de polímeros citados antes, se pueden usar restos de reticulación de bajo peso molecular, en especial cuando se usan restos de cadena principal de alto peso molecular hidrófilos para la formación de los vehiculos de los profármacos de hidrogel.

20 Una forma de minimizar el contacto entre insulinas a nivel molecular es mediante el espaciado de las moléculas de insulina homogéneamente en la matriz de polímero bien hidratada. El espaciado homogéneo se puede lograr mediante la unión covalente de la insulina al polímero y usando conectores que se escinden en un entorno acuoso a pH neutro, y se asegura una liberación lenta de la insulina estructuralmente intacta.

25 Se prefiere un profármaco de insulina unida a polímero que no tenga esencialmente bioactividad, haciendo esta propiedad que toda la actividad insulínica sea atribuible a la insulina liberada. Por lo tanto, mediante el diseño de las propiedades de liberación del profármaco, se puede lograr un grado alto de control sobre los niveles plasmáticos de insulina.

30 La insulina se puede unir por cualquier grupo funcional relevante proporcionado por la molécula, y dichos grupos funcionales preferidos proporcionados por aminoácidos biogénicos, se seleccionan típicamente de guanidino, imidazol, indol, carboxi, carboxamida, hidroxilo primario y secundario, fenol, y amino primario. Por ejemplo, la insulina humana tiene los siguientes grupos funcionales relevantes: carboxi, carboxiamida, hidroxilo primario y secundario, fenol, imidazol, y amino primario.

35 En una realización adicional, el compuesto de insulina está unido a un profármaco vehículo sea por unión covalente a cualquiera de los restos de lisina sea/o al extremo N de cualquiera/o de la cadena A o la cadena B del compuesto de insulina.

40 En el caso de que los compuestos de acuerdo con la fórmula (I) contengan uno o más grupos ácidos o básicos, la invención también comprende sus correspondientes sales farmacéutica o toxicológicamente aceptables, en particular sus sales farmacéuticamente utilizables. Por lo tanto, los compuestos de fórmula (I) que contienen grupos ácido se pueden usar de acuerdo con la invención, por ejemplo, como sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos o como sales de amonio. Los ejemplos más precisos de dichas sales incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio o sales con amoníaco o aminas orgánicas tales como, por ejemplo, etilamina, etanolamina, trietanolamina o aminoácidos. Los compuestos de fórmula (I) que contiene uno o más grupos básicos, es decir, grupos que se pueden protonar, pueden estar presentes y se pueden usar de acuerdo con la invención, en forma de sus sales de adición con ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácidos naftalenosulfónicos, ácido oxálico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido pivalico, ácido dietilacético, 50 ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido sulfamínico, ácido fenilpropiónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido isonicotínico, ácido cítrico, ácido adípico y otros ácidos conocidos para el experto en la técnica. Si los compuestos de fórmula (I) contienen simultáneamente grupos ácidos y básicos en la molécula, la invención también incluye, además de las formas de sales mencionadas, sales internas o betaínas (iones híbridos). Las respectivas sales de acuerdo con la fórmula (I) se pueden obtener por métodos habituales que son conocidos para el experto en la técnica como, por ejemplo, poniendo en contacto estos con un ácido o base orgánico o inorgánico en un disolvente o dispersante, o por intercambio aniónico o intercambio catiónico con otras sales. La presente invención también incluye todas las sales de los compuestos de fórmula (I) que, debido a su baja compatibilidad fisiológica, no son directamente adecuadas para usar en productos farmacéuticos, pero que se pueden usar, por ejemplo, como compuestos intermedios para reacciones químicas o para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables.

60

Preferiblemente, en la fórmula (I) R^2 se sustituye por L^2-Z .

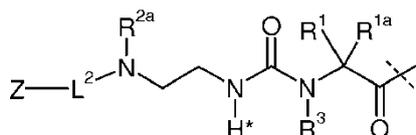
Preferiblemente, en la fórmula (I) R^1 se sustituye por L^2-Z .

Preferiblemente, en la fórmula (I) X es $N(R^3)$.

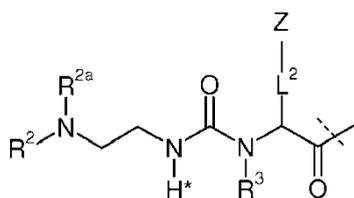
Preferiblemente, en la fórmula (I) X es $C(R^3R^{3a})$ y R^{3a} es $N(R^{2b})C(O)R^4$.

5 Preferiblemente, X es $C(R^3R^{3a})$, R^{3a} es $N(R^{2b})-L^2-Z$.

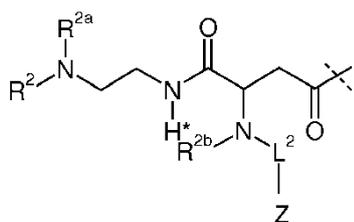
Los profármacos preferidos de la presente invención comprenden un conjugado de insulina y conector D-L, en donde L^1 de la fórmula (I) se representa por las fórmulas (Ia), (Ib), (Ic) o (Id):



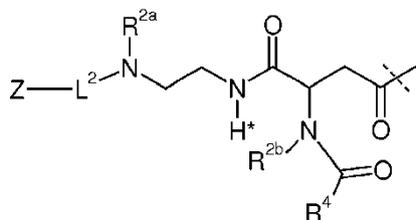
(Ia),



(Ib),



(Ic),



(Id),

en donde R^1 , R^{1a} , R^2 , R^{2a} , R^{2b} , R^3 , R^4 , L^2 , Z tienen el significado indicado en la presente memoria y en donde L^1 está opcionalmente sustituido adicionalmente, con la condición de que el hidrógeno marcado con el asterisco en las fórmulas (Ia) a (Id) no se sustituya por un sustituyente.

15 Preferiblemente, L^1 no está sustituido adicionalmente (aparte del sustituyente obligatorio L^2-Z).

Como se muestra, p. ej., en las fórmulas (Ia) a (Id) un hidrógeno se sustituye por el grupo L^2-Z .

En general, L^2 puede estar unido a L^1 en cualquier posición aparte de la sustitución del hidrógeno marcado con un asterisco en la fórmula (I). Preferiblemente, uno de los hidrógenos dado por R^1 , R^{1a} , R^2 , R^{2a} , R^{2b} , R^3 , R^{3a} , R^4 directamente o como hidrógeno del alquilo C_{1-4} o grupos adicionales, se sustituye por L^2-Z .

20 Además, L^1 puede estar opcionalmente sustituido adicionalmente. En general, se puede usar cualquier sustituyente siempre que no se afecte el principio de escisión. Sin embargo, se prefiere que L^1 no esté adicionalmente sustituido.

Preferiblemente, uno o más sustituyentes opcionales adicionales se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halógeno; CN; $COOR^9$; OR^9 ; $C(O)R^9$; $C(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2N(R^9R^{9a})$; $S(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2R^9$; $S(O)R^9$; $N(R^9)S(O)_2N(R^{9a}R^{9b})$; SR^9 ; $N(R^9R^{9a})$; NO_2 ; $OC(O)R^9$; $N(R^9)C(O)R^{9a}$; $N(R^9)S(O)_2R^{9a}$; $N(R^9)S(O)R^{9a}$; $N(R^9)C(O)OR^{9a}$; $N(R^9)C(O)N(R^{9a}R^{9b})$; $OC(O)N(R^9R^{9a})$; T; alquilo C_{1-50} ; alquenilo C_{2-50} ; o alquinilo C_{2-50} , en donde T; C_{1-50} alquilo alquenilo C_{2-50} ; y alquinilo C_{2-50} , están opcionalmente sustituidos con uno o más R^{10} , que son iguales o diferentes y en donde el alquilo C_{1-50} ; alquenilo C_{2-50} ; y alquinilo C_{2-50} , están opcionalmente interrumpidos con uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T, $-C(O)O-$; $-O-$; $-C(O)-$; $-C(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2N(R^{11})-$; $-S(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2-$;

25

-S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});

5 R⁹, R^{9a}, R^{9b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; T; y alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; o alquino C₂₋₅₀, en donde T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀, están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son iguales o diferentes, y en donde el alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀, están opcionalmente interrumpidos con uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});

10 T se selecciona del grupo que consiste en fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C₃₋₁₀; heterociclo de 4 a 7 miembros; o heterobiciclo de 9 a 11 miembros, en donde T está opcionalmente sustituido con uno o más R¹⁰, que son iguales o diferentes;

15 R¹⁰ es halógeno; CN; oxo (=O); COOR¹²; OR¹²; C(O)R¹²; C(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂N(R¹²R^{12a}); S(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂R¹²; S(O)R¹²; N(R¹²)S(O)₂N(R^{12a}R^{12b}); SR¹²; N(R¹²R^{12a}); NO₂; OC(O)R¹²; N(R¹²)C(O)R^{12a}; N(R¹²)S(O)₂R^{12a}; N(R¹²)S(O)R^{12a}; N(R¹²)C(O)OR^{12a}; N(R¹²)C(O)N(R^{12a}R^{12b}); OC(O)N(R¹²R^{12a}); o alquilo C₁₋₆, en donde el alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

R¹¹, R^{11a}, R¹², R^{12a}, R^{12b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; o alquilo C₁₋₆, en donde el alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes.

El término "interrumpido" significa que entre dos carbonos se inserta un grupo o al final de la cadena de carbonos entre el carbono y el hidrógeno.

20 L² es un enlace simple químico o un espaciador. En el caso de que L² sea un espaciador, preferiblemente se define como el uno o más sustituyentes opcionales definidos antes, con la condición de que L² esté sustituido con Z.

25 Por consiguiente, cuando L² es distinto de un enlace simple químico, L²-Z es COOR⁹; OR⁹; C(O)R⁹; C(O)N(R⁹R^{9a}); S(O)₂N(R⁹R^{9a}); S(O)N(R⁹R^{9a}); S(O)₂R⁹; S(O)R⁹; N(R⁹)S(O)₂N(R^{9a}R^{9b}); SR⁹; N(R⁹R^{9a}); OC(O)R⁹; N(R⁹)C(O)R^{9a}; N(R⁹)S(O)₂R^{9a}; N(R⁹)S(O)R^{9a}; N(R⁹)C(O)OR^{9a}; N(R⁹)C(O)N(R^{9a}R^{9b}); OC(O)N(R⁹R^{9a}); T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; o alquino C₂₋₅₀, en donde T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀, están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son iguales o diferentes, y en donde el alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀, están opcionalmente interrumpidos con uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en -T-, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});

30 R⁹, R^{9a}, R^{9b} se seleccionan independientemente del grupo de H; Z; T; y alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; o alquino C₂₋₅₀, en donde T; alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀, están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son iguales o diferentes, y en donde el alquilo C₁₋₅₀; alqueno C₂₋₅₀; y alquino C₂₋₅₀, están opcionalmente interrumpidos con uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});

35 T se selecciona del grupo que consiste en fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C₃₋₁₀; heterociclo de 4 a 7 miembros; o heterobiciclo de 9 a 11 miembros, en donde t está opcionalmente sustituido con uno o más R¹⁰, que pueden ser iguales o diferentes;

40 R¹⁰ es Z; halógeno; CN; oxo (=O); COOR¹²; OR¹²; C(O)R¹²; C(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂N(R¹²R^{12a}); S(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂R¹²; S(O)R¹²; N(R¹²)S(O)₂N(R^{12a}R^{12b}); SR¹²; N(R¹²R^{12a}); NO₂; OC(O)R¹²; N(R¹²)C(O)R^{12a}; N(R¹²)S(O)₂R^{12a}; N(R¹²)S(O)R^{12a}; N(R¹²)C(O)OR^{12a}; N(R¹²)C(O)N(R^{12a}R^{12b}); OC(O)N(R¹²R^{12a}); o alquilo C₁₋₆, en donde el alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

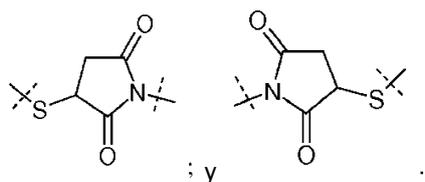
R¹¹, R^{11a}, R¹², R^{12a}, R^{12b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; Z; o alquilo C₁₋₆, en donde el alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

45 con la condición de que uno de R⁹, R^{9a}, R^{9b}, R¹⁰, R¹¹, R^{11a}, R¹², R^{12a}, R^{12b} es Z.

Más preferiblemente, L² es una cadena de alquilo C₁₋₂₀, que está opcionalmente interrumpida con uno o más grupos independientemente seleccionados de -O-; y C(O)N(R^{3aa}); opcionalmente sustituido con uno o más grupos independientemente seleccionados de OH; y C(O)N(R^{3aa}R^{3aaa}); y en donde R^{3aa}, R^{3aaa} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄.

50 Preferiblemente, L² tiene un peso molecular en el intervalo de 14 g/mol a 750 g/mol.

Preferiblemente, L² está unido a Z por un grupo terminal seleccionado de



En el caso de que L^2 tenga dicho grupo terminal, se prefiere además que L^2 tenga un peso molecular en el intervalo de 14 g/mol a 500 g/mol, calculado sin dicho grupo terminal.

Preferiblemente, la unión covalente formada entre el conector y el hidrogel Z es un enlace permanente.

- 5 Preferiblemente, el hidrogel Z es hidrogel insoluble en agua basado en polietilenglicol (PEG) biodegradable. La expresión "basado en PEG" como se entiende en la presente memoria, significa que la proporción en masa de las cadenas de PEG en el hidrogel es al menos 10% en peso, preferiblemente al menos 25%, basado en el peso total del hidrogel. El resto puede estar compuesto de espaciadores y/u oligómeros o polímeros, tales como oligo o polilisinas.
- 10 Además, la expresión "insoluble en agua" se refiere a una red molecular reticulada tridimensionalmente que forma el hidrogel. El hidrogel si suspende en un gran exceso de agua, o tampón acuoso de osmolalidad fisiológica, puede absorber una cantidad sustancial de agua, p. ej., hasta 10 veces en una base en peso, y por lo tanto se puede hinchar, pero después de retirar el exceso de agua retiene todavía la estabilidad física de un gel y la forma. Dicha forma puede ser de cualquier geometría, y se entiende que dicho objeto de hidrogel individual se debe considerar
- 15 como una sola molécula que consiste en componentes en donde cada componente está conectado a otro componente por enlaces químicos.

De acuerdo con esta invención, el hidrogel puede estar compuesto de restos de cadena principal interconectados por enlaces degradables por hidrólisis.

- 20 Preferiblemente, el resto de cadena principal tiene un peso molecular en el intervalo de 1 kDa a 20 kDa, más preferiblemente de 1 kDa a 15 kDa e incluso más preferiblemente de 1 kDa a 10 kDa. Los restos de cadena principal principalmente también se basan en PEG, comprendiendo una o más cadenas de PEG.

- En un hidrogel que lleva conjugados de fármaco-conector de acuerdo con la invención, un resto de cadena principal se caracteriza por una serie de grupos funcionales, que comprenden grupos funcionales biodegradables interconectados y conjugados de fármaco-conector conectados a hidrogel, y opcionalmente grupos de rematado.
- 25 Esto significa que un resto de cadena principal se caracteriza por una serie de conjugados de fármaco-conector conectados a hidrogel; grupos funcionales que comprenden grupos funcionales interconectados biodegradables; y opcionalmente grupos de rematado. Preferiblemente, la suma de los grupos funcionales interconectados biodegradables y conjugados de fármaco-conector es 16-128, preferido 20-100, más preferido 24-80 y lo más preferido 30-60.

- 30 Preferiblemente, la suma de grupos funcionales interconectados y conjugados de fármaco-conector conectados a hidrogel y grupos de rematado de un resto de cadena principal se divide de forma igualitaria entre el número de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el centro de ramificación. Por ejemplo, si hay 32 grupos funcionales interconectados y conjugados de fármaco-conector conectados a hidrogel y grupos de rematado, 8 grupos los pueden proporcionar cada uno de las cuatro cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el centro, preferiblemente mediante restos dendríticos unidos al extremo de cada cadena polimérica basada en PEG. Alternativamente, cuatro grupos los pueden proporcionar cada una de las ocho cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el centro, o dos grupos cada una de las dieciséis cadenas poliméricas basadas en PEG. Si el número de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el centro no permite una distribución igualitaria, se prefiere que el número medio de la suma de los grupos funcionales interconectados y conjugados de fármaco-conector conectados a hidrogel y grupos de rematado por cadena polimérica basada en PEG, se mantenga en un mínimo.
- 35
- 40

- En dichos profármacos unidos a vehículo de acuerdo con la invención, es conveniente que prácticamente toda la liberación de fármaco (>90%) haya ocurrido antes de que tenga lugar un aumento significativo de liberación de los restos de cadena principal (<10%). Esto se puede lograr ajustando la semivida del profármaco unido a vehículo frente a la cinética de degradación del hidrogel de acuerdo con la invención.
- 45

- Preferiblemente, un resto de cadena principal se caracteriza por tener un centro que se ramifica, a partir del cual se extienden al menos tres cadenas poliméricas basadas en PEG. Por consiguiente, en un aspecto preferido de la presente invención, el reactivo de cadena principal comprende un centro que se ramifica, a partir del cual se extienden al menos tres cadenas poliméricas basadas en PEG. Dichos centros que se ramifican pueden estar compuestos de poli u oligoalcoholes en forma unida, preferiblemente pentaeritritol, tripentaeritritol, hexaglicerina, sacarosa, sorbitol, fructosa, manitol, glucosa, celulosa, amilosas, almidones, hidroxialquil-almidones, poli(alcoholes vinílicos), dextranos, hialuronanos, o los centros que se ramifican pueden estar compuestos de oligoaminas tales
- 50

como ornitina, ácido diaminobutírico, trilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina, octalisina, nonalisina, decalisina, undecalisina, dodecalisina, tridecalisina, tetradecalisina, pentadecalisina u oligolisinas, polietileneiminas, polivinilaminas en forma unida.

5 Preferiblemente, del centro que se ramifica se extienden de 3 a 16 cadenas poliméricas basadas en PEG, más preferiblemente de 4 a 8. Los centros que se ramifican preferidos pueden estar compuestos de pentaeritritol, ornitina, ácido diaminobutírico, trilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina u oligolisina, PEI de bajo peso molecular, hexaglicerina, tripentaeritritol en forma unida. Preferiblemente, del centro que se ramifica se extienden de 3 a 16 cadenas poliméricas basadas en PEG, más preferiblemente de 4 a 8. Preferiblemente, la cadena polimérica basada en PEG es una cadena de polietilenglicol lineal, de la cual un extremo está conectado al centro que se ramifica y el otro a un resto dendrítico hiper-ramificado. Se entiende que una cadena polimérica basada en PEG puede estar terminada o interrumpida por grupos alquilo o arilo opcionalmente sustituidos con heteroátomos y grupos funcionales químicos.

Preferiblemente, una cadena polimérica basada en PEG es un derivado de polietilenglicol adecuadamente sustituido (basado en PEG).

15 Las estructuras preferidas para las correspondientes cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde un centro de ramificación contenido en un resto de cadena principal, son derivados de PEG de múltiples brazos como, por ejemplo, se detalla en la lista de productos de of JenKem Technology, EE.UU. (accedido por www.jenkemusa.com el 28 de julio, 2009), derivados de 4brazos-PEG (centro de pentaeritritol), derivados de 8brazos-PEG (centro de hexaglicerina) y derivados de 8brazos-PEG (centro de tripentaeritritol). Los más preferidos son los 4brazos-PEG-Amina (centro de pentaeritritol) y 4brazos-PEG-Carboxilo (centro de pentaeritritol), 8brazos-PEG-Amina (centro de hexaglicerina), 8brazos-PEG-Carboxilo (centro de hexaglicerina), 8brazos-PEG-Amina (centro de tripentaeritritol) y 8brazos-PEG-Carboxilo (centro de tripentaeritritol). Los pesos moleculares preferidos para dichos derivados de PEG de múltiples brazos en un resto de cadena principal son de 1 kDa a 20 kDa, más preferiblemente de 1 kDa a 15 kDa e incluso más preferiblemente de 1 kDa a 10 kDa.

25 Se entiende que los grupos amina terminales de las moléculas de múltiples brazos mencionadas antes, están presentes en forma unida en el resto de cadena principal para proporcionar grupos funcionales interconectados adicionales y grupos funcionales reactivos de un resto de cadena principal.

Se prefiere que la suma de los grupos funcionales interconectados y los grupos funcionales reactivos de un resto de cadena principal se divida de forma igualitaria entre el número de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el centro que se ramifica. Si el número de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el centro que se ramifica no permite una distribución igualitaria, se prefiere que la desviación del número medio de la suma de los grupos funcionales interconectados y reactivos por cadena polimérica basada en PEG se mantenga en el mínimo.

35 Más preferiblemente, la suma de grupos funcionales interconectados y reactivos por un resto de cadena principal se divide de forma igualitaria entre el número de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el centro que se ramifica. Por ejemplo, si hay 32 grupos funcionales interconectados y grupos funcionales reactivos, pueden proporcionar ocho grupos cada una de las cuatro cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el centro que se ramifica, preferiblemente mediante restos dendríticos unidos al extremo de cada cadena polimérica basada en PEG. Alternativamente, pueden proporcionar cuatro grupos cada una de las ocho cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el centro que se ramifica o dos grupos cada una de las dieciséis cadenas poliméricas basadas en PEG.

Dichos grupos funcionales adicionales los pueden proporcionar los restos dendríticos. Preferiblemente, cada resto dendrítico tiene un peso molecular en el intervalo de 0,4 kDa a 4 kDa, más preferiblemente de 0,4 kDa a 2 kDa. Preferiblemente, cada resto dendrítico tiene al menos 3 ramificaciones y al menos 4 grupos funcionales reactivos, y como mucho 63 ramificaciones y 64 grupos funcionales reactivos, se prefiere al menos 7 ramificaciones y al menos 8 grupos funcionales reactivos, y como mucho 31 ramificaciones y 32 grupos funcionales reactivos.

Los ejemplos de dichos restos dendríticos están compuestos de trilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina, octalisina, nonalisina, decalisina, undecalisina, dodecalisina, tridecalisina, tetradecalisina, pentadecalisina, hexadecalisina, heptadecalisina, octadecalisina, nonadecalisina en forma unida. Los ejemplos de dichos restos dendríticos preferidos están compuestos de trilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina en forma unida, lo más preferido de trilisina, pentalisina o heptalisina, ornitina, ácido diaminobutírico en forma unida.

Lo más preferiblemente, el vehículo de hidrogel de la presente invención se caracteriza porque el resto de cadena principal tiene un carbono cuaternario de fórmula $C(A-Hyp)_4$, en donde cada A es independientemente una cadena polimérica basada en polietilenglicol unida terminalmente al carbono cuaternario por un enlace covalente y el extremo distal de la cadena polimérica basada en PEG está unido covalentemente a un resto dendrítico Hyp, teniendo cada resto dendrítico Hyp al menos cuatro grupos funcionales que representan grupos funcionales interconectados y grupos funcionales reactivos.

Preferiblemente, cada A se selecciona independientemente de la fórmula $-(CH_2)_{n1}(OCH_2CH_2)_nX-$, en donde $n1$ es 1 o

2; n es un número entero en el intervalo de 5 a 50; y X es un grupo funcional químico que une covalentemente A e Hyp.

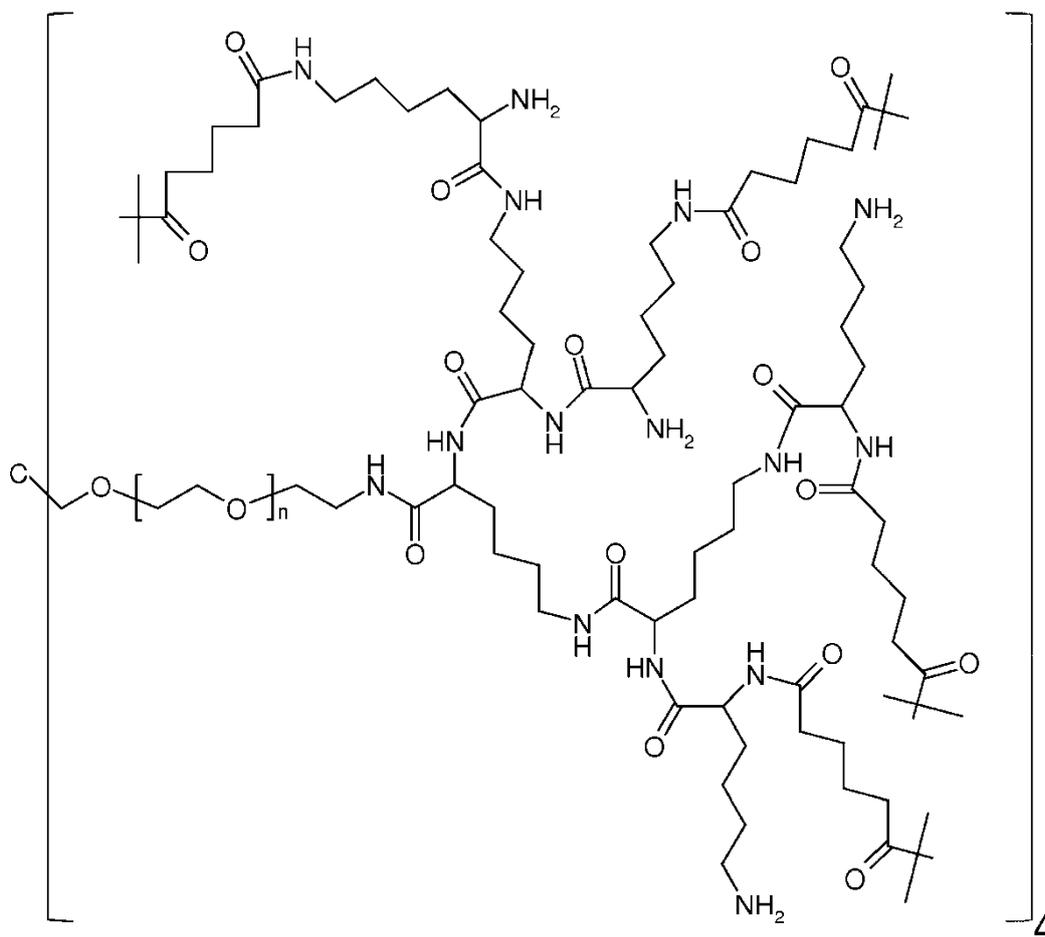
Preferiblemente, A e Hyp están unidos covalentemente por un enlace amida.

5 Preferiblemente, el resto dendrítico Hyp es un polipéptido hiper-ramificado. Preferiblemente, el polipéptido hiper-ramificado comprende lisina en forma unida. Preferiblemente, cada resto dendrítico Hyp tiene un peso molecular en el intervalo de 0,4 kDa a 4 kDa. Se entiende que un resto de cadena principal C(A-Hyp)₄ puede consistir en los mismos o diferentes restos dendríticos Hyp y que cada Hyp se puede seleccionar independientemente. Cada resto Hyp consiste en entre 5 y 32 lisinas, preferiblemente al menos 7 lisinas, es decir, cada resto Hyp está compuesto de entre 5 y 32 lisinas en forma unida, preferiblemente al menos 7 lisinas en forma unida. Lo más preferiblemente Hyp está compuesto de heptalisinilo.

10 La reacción de los grupos funcionales polimerizables de un reactivo de cadena principal, más específicamente de Hyp con los grupos funcionales polimerizables de reactivos de reticulación basados en polietilenglicol, da como resultado un enlace amida permanente.

15 Preferiblemente C(A-Hyp)₄ tiene un peso molecular en el intervalo de 1 kDa a 20 kDa, más preferiblemente de 1 kDa o 15 kDa e incluso más preferiblemente de 1 kDa a 10 kDa.

Se muestra a continuación un resto de cadena principal preferido, las líneas de trazos indican las uniones biodegradables de interconexión a restos reticuladores y n es un número entero de 5 a 50:



20 La biodegradabilidad de los hidrogeles de acuerdo con la presente invención se logra por la introducción de enlaces degradables por hidrólisis.

25 Las expresiones “degradable por hidrólisis”, “biodegradable” o “escindible por hidrólisis”, “autoescindible” o “autoescisión”, “que se autoescinde”, “transitorio” o “temporal”, se refieren dentro del contexto de la presente invención, a enlaces y uniones que se pueden degradar o escindir por hidrólisis de forma no enzimática en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37°C) con semividas en el intervalo de una hora a tres meses, e incluye, pero no se limita a aconitilos, acetales, amidas, anhídridos carboxílicos, ésteres, iminas, hidrazonas, amidas del ácido maleámico, ortoésteres, fosfamidas, fosfoésteres, ésteres de fosfosililo, ésteres de sililo, ésteres

sulfónicos, carbamatos aromáticos, combinaciones de los mismos, y similares.

Si está presente en un hidrogel de acuerdo con la invención como grupo funcional interconectado degradable, las uniones biodegradables preferidas son ésteres, carbonatos, fosfoésteres y ésteres de ácido sulfónico, y las más preferidas son ésteres o carbonatos.

- 5 Las uniones permanentes son degradables por hidrólisis de forma no enzimática en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37°C) con semividas de 6 meses o más prolongadas, tales como, por ejemplo, amidas.

Para introducir los enlaces escindibles por hidrólisis en el vehículo de hidrogel de la invención, los restos de cadena principal pueden estar unidos directamente entre sí mediante enlaces biodegradables.

- 10 En una realización, los restos de cadena principal del vehículo de hidrogel biodegradable pueden estar unidos directamente entre sí, es decir, sin restos reticuladores. Los restos dendríticos hiper-ramificados de dos restos de cadena principal de dicho hidrogel biodegradable pueden estar unidos directamente por un grupo funcional interconectado de dicho hidrogel biodegradable que conecta los dos restos dendríticos hiper-ramificados. Alternativamente, los dos restos dendríticos hiper-ramificados de dos restos de cadena principal diferentes pueden estar interconectados por dos restos espaciadores conectados a un resto de cadena principal y en el otro lado conectados a un resto de reticulación separado por grupos funcionales interconectados.
- 15

- Alternativamente, los restos de cadena principal pueden estar unidos entre sí por restos reticuladores, cada resto reticulador está terminado por al menos dos enlaces degradables por hidrólisis. Además de los enlaces degradables de terminación, los restos reticuladores pueden contener además enlaces biodegradables. Por lo tanto, cada extremo del resto reticulador unido a un resto de cadena principal comprende un enlace degradable por hidrólisis, y pueden estar presentes enlaces biodegradables adicionales en el resto reticulador.
- 20

Preferiblemente, el vehículo de hidrogel biodegradable está compuesto de restos de cadena principal interconectados por enlaces degradables por hidrólisis y los restos de cadena principal están unidos entre sí por restos reticuladores.

- 25 El vehículo de hidrogel biodegradable puede contener uno o más tipos diferentes de restos reticuladores, preferiblemente uno. El resto reticulador puede ser una molécula lineal o ramificada y preferiblemente es una molécula lineal. En una realización preferida de la invención, el resto reticulador está conectado a restos de cadena principal por al menos dos enlaces biodegradables.

- 30 Preferiblemente, los restos reticuladores tienen un peso molecular en el intervalo de 60 Da a 5 kDa, más preferiblemente, de 0,5 kDa a 4 kDa, incluso más preferiblemente de 1 kDa a 4 kDa, incluso más preferiblemente de 1 kDa a 3 kDa. En una realización, un resto reticulador consiste en un polímero.

Además de los restos de reticulación oligoméricos o poliméricos, se pueden usar restos de reticulación de bajo peso molecular, en especial cuando se usan restos de cadena principal de alto peso molecular hidrófilos para la formación de un hidrogel biodegradable de acuerdo con la invención.

- 35 Preferiblemente, los restos reticuladores basados en polietilenglicol son cadenas hidrocarbonadas que comprenden unidades de etilenglicol, opcionalmente comprenden grupos funcionales químicos adicionales, en donde los restos reticuladores basados en polietilenglicol comprenden al menos cada uno m unidades de etilenglicol, en donde m es un número entero en el intervalo de 3 a 100, preferiblemente de 10 a 70. Preferiblemente, los restos reticuladores basados en polietilenglicol tienen un peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 5 kDa.

- 40 Si se usa en referencia a un resto reticulador o a una cadena polimérica basada en PEG conectada a un centro que se ramifica, el término "basado en PEG" se refiere a un resto reticulador o cadena polimérica basada en PEG que comprende al menos 20% en peso de restos de etilenglicol.

- 45 En una realización, los monómeros que constituyen los restos reticuladores poliméricos están conectados por enlaces biodegradables. Dichos restos reticuladores poliméricos pueden contener hasta 100 enlaces biodegradables o más, dependiendo del peso molecular del resto reticulador y el peso molecular de las unidades de monómero. Los ejemplos de dichos restos reticuladores son polímeros basados en poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico). Se entiende que dicha cadena de poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico) puede estar terminada o interrumpida por grupos alquilo o arilo y que pueden estar opcionalmente sustituidos con heteroátomos y grupos funcionales químicos.

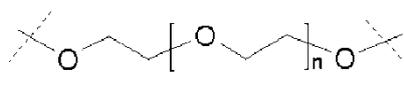
- 50 Preferiblemente, los restos reticuladores están basados en PEG, preferiblemente representados por solo una cadena molecular basada en PEG. Preferiblemente, los restos reticuladores basados en polietilenglicol son cadenas de hidrocarburo que comprenden unidades de etilenglicol, que comprenden opcionalmente grupos funcionales químicos adicionales, en donde los restos reticuladores basados en polietilenglicol comprenden al menos cada uno m unidades de etilenglicol, en donde m es un número entero en el intervalo de 3 a 100, preferiblemente de 10 a 70. Preferiblemente, los restos reticuladores basados en polietilenglicol tienen un peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 5 kDa.
- 55

En una realización preferida de la presente invención, el resto reticulador consiste en PEG, que está conectado simétricamente por enlaces éster a dos espaciadores alfa,omega-dicarboxílicos alifáticos proporcionados por restos de cadena principal conectados al resto dendrítico hiper-ramificado por enlaces amida permanentes.

5 Los ácidos dicarboxílicos de los restos espaciadores conectados a un resto de cadena principal y en el otro lado conectados a un resto de reticulación, consisten en 3 a 12 átomos de carbono, más preferiblemente entre 5 y 8 átomos de carbono y pueden estar sustituidos en uno o más átomos de carbono. Los sustituyentes preferidos son grupos alquilo, grupos hidroxilo o grupos amido o grupos amino sustituidos. Uno o más de los grupos metileno del ácido dicarboxílico alifático puede estar opcionalmente sustituido por O o NH o N sustituido con alquilo. El alquilo preferido es alquilo lineal o ramificado con de 1 a 6 átomos de carbono.

10 Preferiblemente, hay un enlace amida permanente entre el resto dendrítico hiper-ramificado y el resto espaciador conectado a un resto de cadena principal y en el otro lado está conectado a un resto reticulador.

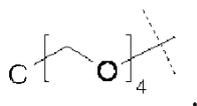
Se muestra a continuación un resto reticulador preferido; las líneas de trazos indican las uniones biodegradables de interconexión a los restos de cadena principal:



15 en donde n es un número entero de 5 a 50.

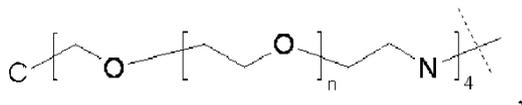
Preferiblemente, el vehículo de hidrogel está compuesto de restos de cadena principal interconectados por enlaces degradables por hidrólisis.

Más preferiblemente, los restos de cadena principal comprenden un centro que se ramifica de la siguiente fórmula:



20 en donde la línea de trazos indica la unión al resto de cadena principal restante:

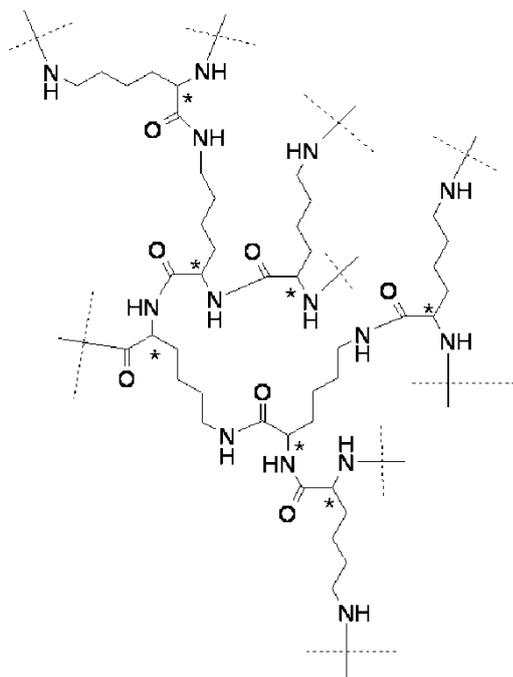
Más preferiblemente, los restos de cadena principal comprenden una estructura de la siguiente fórmula:



en donde n es un número entero de 5 a 50 y la línea de trazos indica la unión al resto de cadena principal restante.

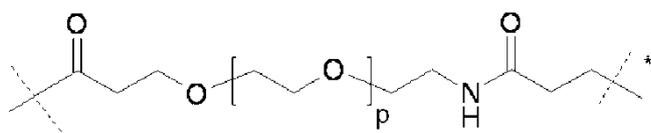
Preferiblemente, el resto de cadena principal comprende un resto hiper-ramificado Hyp.

25 Más preferiblemente, el resto de cadena principal comprende un resto hiper-ramificado Hyp de la siguiente fórmula:



en donde la línea de trazos indica la unión al resto de la molécula y los átomos de carbono marcados con asteriscos indican configuración S.

Preferiblemente, los restos de cadena principal están unidos a al menos un espaciador de la siguiente fórmula:



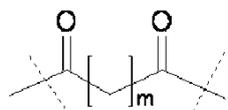
5

en donde la línea de trazos marcada con un asterisco indica el enlace entre el hidrogel y el N del grupo tiosuccinimida,

en donde la otra línea de trazos indica la unión a Hyp, y

en donde p es un número entero de 0 a 10.

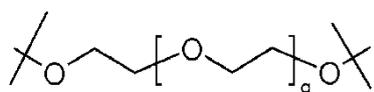
10 Preferiblemente, los restos de cadena principal están unidos a al menos un espaciador de la siguiente fórmula:



en donde una de las líneas de trazos indica la unión al resto hiper-ramificado Hyp y la segunda línea de trazos indica la unión al resto de la molécula; y

en donde m es un número entero de 2 a 4.

15 Preferiblemente, los restos de cadena principal están unidos entre sí por restos reticuladores que tienen la siguiente estructura



en donde

q es un número entero de 3 a 100;

en la velocidad de hidrólisis de los enlaces biodegradables entre los restos de cadena principal y los restos reticuladores influye, o está determinada por el número y tipo de átomos conectados adyacentes al grupo PEG-éster de carboxi. Por ejemplo, seleccionando el ácido succínico, adípico o glutárico para la formación del éster de PEG, se pueden variar las semividas de degradación del vehículo de hidrogel biodegradable de acuerdo con la invención.

5 La cantidad total de restos de cadena principal se puede medir en solución después de degradación completa del hidrogel de acuerdo con la invención, y durante la degradación se pueden separar fracciones de productos de degradación de la cadena principal del hidrogel insoluble de acuerdo con la invención, y se pueden cuantificar sin interferencia de otros productos de degradación solubles liberados del hidrogel de acuerdo con la invención. Un hidrogel objeto de acuerdo con la invención se puede separar del exceso de agua de tampón de osmolalidad fisiológica por sedimentación o centrifugación. La centrifugación se puede llevar a cabo de modo que el líquido sobrenadante proporciona al menos 10% del volumen del hidrogel que se hincha de acuerdo con la invención. Los productos de degradación del hidrogel solubles permanecen en el líquido sobrenadante acuoso después de dicha etapa de sedimentación o centrifugación, y los productos de degradación solubles en agua que comprenden uno o más restos de cadena principal son detectables sometiendo partes alícuota de dicho líquido sobrenadante a métodos de separación y/o analíticos adecuados.

Preferiblemente, los productos de degradación solubles en agua se pueden separar de los productos de degradación insolubles en agua por filtración a través de filtros de 0,45 μm , después de lo cual los productos de degradación se pueden encontrar en el flujo que pasa. Los productos de degradación solubles en agua también se pueden separar de los productos de degradación insolubles en agua por una combinación de una etapa de centrifugación y una filtración.

Por ejemplo, los restos de cadena principal pueden llevar grupos que presentan absorción UV a longitudes de onda donde otros productos de degradación no presentan absorción UV. Dichos grupos que absorben UV selectivamente pueden ser componentes estructurales del resto de cadena principal tales como enlaces amida o se pueden introducir en la cadena principal por unión a sus grupos funcionales reactivos mediante sistemas de anillos aromáticos tales como grupos indolilo.

En dichos profármacos de insulina unida a hidrogel de acuerdo con la invención, es deseable que prácticamente toda la liberación de insulina (>90%) haya ocurrido antes de que tenga lugar un aumento significativo de la liberación de los productos de degradación de la cadena principal (<10%). Esto se puede lograr ajustando la semivida del profármaco de insulina unida a hidrogel frente a la cinética de degradación del hidrogel.

30 El profármaco de insulina unida a hidrogel de la presente invención se puede preparar partiendo del hidrogel de la presente invención por métodos convenientes conocidos en la técnica. Está claro para un experto en la técnica que existen varias rutas. Por ejemplo, el conector del profármaco mencionado antes al que está unido covalentemente el resto biológicamente activo, es decir, la insulina, se puede hacer reaccionar con los grupos funcionales reactivos del hidrogel de la presente invención que llevan ya o no el resto activo, es decir, la insulina, en parte, o completo.

35 En un método preferido de preparación, el hidrogel se genera por reacciones químicas de ligación. El hidrogel se puede formar a partir de dos eductos macromoleculares con grupos funcionales complementarios que dan una reacción tal como una condensación o adición. Uno de estos materiales de partida es un reactivo reticulador con al menos dos grupos funcionales idénticos y el otro material de partida es un reactivo de cadena funcional homomultifuncional. Los grupos funcionales adecuados presentes en el reactivo de reticulación incluyen amino, ácido carboxílico y derivados, maleimida y otros aceptores de Michael alfa,beta-insaturados como grupos vinilsulfona, tiol, hidroxilo. Los grupos funcionales adecuados presentes en el reactivo de la cadena principal incluyen, pero no se limitan a amino, ácido carboxílico y derivados, maleimida y otros aceptores de Michael alfa,beta-insaturados como grupos vinilsulfona, tiol, hidroxilo.

45 Si los grupos polimerizables del reactivo reticulador se usan de forma subestequiométrica con respecto a los grupos polimerizables de la cadena principal, el hidrogel resultante será un hidrogel reactivo con grupos funcionales reactivos libres unidos a la estructura de la cadena principal.

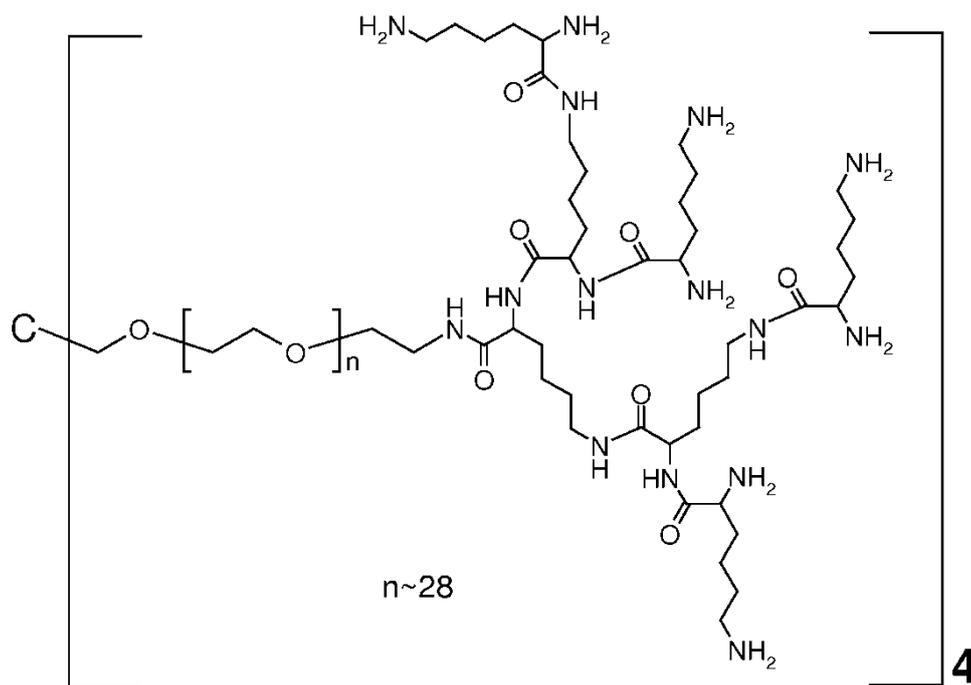
Opcionalmente, el conector del profármaco se puede conjugar primero con la insulina y el conjugado de insulina-conector del profármaco se puede hacer reaccionar después con los grupos funcionales reactivos del hidrogel. Alternativamente, después de activación de uno de los grupos funcionales del conector del profármaco, el conjugado de conector-hidrogel se puede conectar con la insulina en la segunda etapa de reacción y el exceso de insulina se puede eliminar por filtración después de conjugación de la insulina al conector del profármaco unido al hidrogel.

Un procedimiento preferido para la preparación de un profármaco de acuerdo con la presente invención es como sigue:

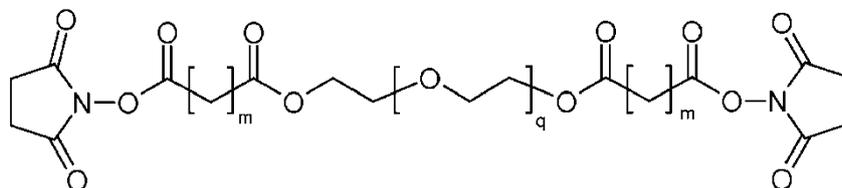
55 Un material de partida preferido para la síntesis del reactivo de la cadena principal es un PEG de 4 brazos-tetraamina o PEG de 8 brazos-octaamina, teniendo el reactivo de PEG un peso molecular en el intervalo de 2000 a 10000 Dalton, lo más preferiblemente de 2000 a 5000 Da. A dichos derivados de PEG de múltiples brazos se acoplan restos de lisina secuencialmente para formar un reactivo de cadena principal hiper-ramificado. Se entiende que las lisinas se pueden proteger parcial o totalmente con grupos protectores durante las etapas de acoplamiento y

que también el reactivo de la cadena principal final puede contener grupos protectores. Una unidad estructural preferida es una bis-Boc-lisina. Alternativamente, en lugar de adiciones secuenciales de restos de lisina, se puede ensamblar un resto de poli-lisina dendrítico primero y posteriormente acoplarlo con la PEG de 4 brazos-tetraamina o PEG de 8 brazos-octaamina. Es conveniente obtener el reactivo de la cadena principal que lleva 32 grupos amino, por consiguiente, se unirían siete lisinas a cada brazo de un PEG de 4 brazos, o se unirían cinco lisinas a cada brazo de un PEG de 8 brazos. En otra realización, el derivado de PEG de múltiples brazos es un tetra- u octa-carboxi. En este caso, los restos dendríticos se pueden generar a partir del ácido glutámico o aspártico, y el reactivo de la cadena principal resultante llevaría 32 grupos carboxi. Se entiende que toda o una parte de los grupos funcionales del reactivo de la cadena principal pueden estar presentes en una forma libre, como sales o conjugados a grupos protectores. Se entiende que debido a razones prácticas el número de lisinas del reactivo de la cadena principal por brazo de PEG será entre seis y siete, más preferiblemente aproximadamente siete.

Un reactivo de la cadena principal preferido se muestra a continuación:



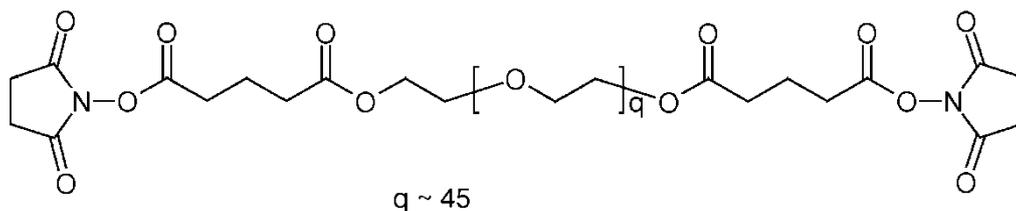
La síntesis del reactivo reticulador empieza a partir de una cadena de PEG lineal con un peso molecular en el intervalo de 0,2 a 5 kDa, más preferiblemente de 0,6 a 2 kDa, que se esterifica con un semiéster de un ácido dicarboxílico, lo más preferido ácido adípico o ácido glutámico. El grupo protector preferido para la formación del semiéster es el grupo bencílico. Los semiésteres de bis-ácido dicarboxílico-PEG se convierten en compuestos carboxi más reactivos tales como cloruros de acilo o ésteres activos, p. ej., ésteres de pentafluorofenilo o N-hidroxisuccinimida, lo más preferido ésteres de N-hidroxisuccinimida, de los cuales la estructura seleccionada preferida se muestra a continuación.



en donde cada m es independientemente un número entero en el intervalo de 2 a 4, y

q es un número entero de 3 a 100.

Es más preferida la siguiente estructura:



Alternativamente, los semiésteres de bis-ácido dicarboxílico-PEG se pueden activar en presencia de un agente de acoplamiento tal como DCC o HOBt o PyBOP.

5 En una realización alternativa, el reactivo de la cadena principal lleva grupos carboxilo y el correspondiente reactivo reticulador se seleccionaría de cadenas de PEG terminadas en amino que contiene éster.

10 El reactivo de la cadena principal y el reactivo reticulador se pueden polimerizar para formar el hidrogel de acuerdo con la invención usando polimerización en emulsión inversa. Después de seleccionar la estequiometría deseada entre la cadena principal y los grupos polimerizables del reticulador, la cadena principal y el reticulador se disuelven en DMSO y se usa un emulsionante adecuado con un valor de HLB adecuado, preferiblemente Arlacel P135, para formar una emulsión inversa usando un agitador mecánico y controlando la velocidad de agitación. La polimerización se inicia por la adición de una base adecuada, preferiblemente por N,N,N',N'-tetrametilendiamina. Después de agitación durante una cantidad de tiempo adecuada, la reacción se inactiva por la adición de un ácido, tal como ácido acético y agua. Las perlas se recogen, se lavan y se fraccionan de acuerdo con el tamaño de partículas por tamizado mecánico. Opcionalmente, los grupos protectores se pueden retirar en esta etapa.

15 En una realización alternativa de esta invención, se acoplan restos multifuncionales a los grupos funcionales reactivos del hidrogel reactivo polimerizado para aumentar el número de grupos funcionales, lo que permite aumentar la carga de fármaco del hidrogel. Dichos restos multifuncionales se pueden proporcionar mediante derivados adecuadamente sustituidos de lisina, dilisina, trilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina, u oligolisina, PEI de bajo peso molecular. Preferiblemente, el resto multifuncional es lisina.

20 Además, dicho hidrogel de acuerdo con la invención se puede funcionalizar con un espaciador que lleva el mismo grupo funcional, por ejemplo, se pueden introducir grupos amino en el hidrogel por acoplamiento de un espaciador heterobifuncional, tal como COOH-(EG)₆-NH-fmoc (EG=etilenglicol), y eliminando el grupo protector fmoc.

25 Después de cargar el conjugado de insulina-conector en el hidrogel que contiene grupo maleimido funcionalizado, todos los grupos funcionales que quedan se rematan con un reactivo de bloqueo adecuado, tal como mercaptoetanol, para prevenir reacciones secundarias indeseadas.

30 En una realización preferida de la invención, un conjugado de insulina-conector que lleva un grupo tiol libre conectado al resto conector, se hace reaccionar con un hidrogel funcionalizado con maleimida a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C, más preferido a temperatura ambiente, en una solución acuosa tamponada de pH 2-5, preferiblemente pH 2,5-4,5, más preferiblemente pH 3,0-4,0. Posteriormente, el conjugado de insulina-conector-hidrogel resultante correspondiente se trata con mercaptoetanol a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C, más preferido a temperatura ambiente, en una solución acuosa tamponada de pH 2-5, preferiblemente pH 2,5-4,0, más preferiblemente pH 2,5-3,5.

35 En otra realización preferida de la invención, un conjugado de insulina-conector que lleva un grupo maleimida conectado al resto conector, se hace reaccionar con un hidrogel funcionalizado con tiol a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C, más preferido a temperatura ambiente, en una solución acuosa tamponada de pH 2-5, preferiblemente pH 2,5-4,5, más preferiblemente pH 3,0-4,0. Posteriormente, el conjugado de insulina-conector-hidrogel resultante correspondiente se trata con un compuesto de bajo peso molecular que comprende un grupo maleimida, preferiblemente un compuesto que contiene maleimida de 100 a 300 Da, p. ej., N-etil-maleimida, a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C, más preferido a temperatura ambiente, en una solución acuosa tamponada de pH 2-5, preferiblemente pH 2,5-4,0, más preferiblemente pH 2,5-3,5.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento que comprende las etapas de

45 (a) poner en contacto una suspensión acuosa que comprende micropartículas de hidrogel funcionalizado con maleimida, con una solución que comprende el reactivo de insulina-conector que lleva grupos tiol tiol a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C, en una solución acuosa tamponada de pH 2-5, dando como resultado un conjugado de insulina-conector-hidrogel;

(b) opcionalmente, tratar el conjugado de insulina-conector-hidrogel de la etapa (a) con un compuesto que contiene tiol de 34 Da a 500 Da a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C, en una solución acuosa tamponada de pH 2-5.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento que comprende las etapas de

(a) poner en contacto una suspensión acuosa que comprende micropartículas de hidrogel funcionalizado con tiol con una solución que comprende el reactivo de insulina-conector que lleva grupos maleimida a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C en una solución acuosa tamponada de pH 2-5, dando como resultado un conjugado de insulina-conector-hidrogel;

- 5 (b) opcionalmente, tratar el conjugado de insulina-conector-hidrogel de la etapa (a) con un compuesto que contiene maleimida de 100 a 300 Da a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C en una solución acuosa tamponada de pH 2-5.

Un método particularmente preferido para la preparación de un profármaco de insulina de la presente invención comprende las etapas de

- 10 (a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula $C(A'-X^1)_4$, en donde $A'-X^1$ representa A antes de su unión a Hyp o un precursor de Hyp y X^1 es un grupo funcional adecuado, con un compuesto de fórmula $Hyp'-X^2$, en donde $Hyp'-X^2$ representa Hyp antes de su unión a A o un precursor de Hyp y X^2 es un grupo funcional adecuado para reaccionar con X^1 ;

- 15 (b) opcionalmente, hacer reaccionar el compuesto resultante de la etapa (a) en una o más etapas adicionales para dar un compuesto de fórmula $C(A-Hyp)_4$ que tiene al menos cuatro grupos funcionales;

(c) hacer reaccionar los al menos cuatro grupos funcionales del compuesto resultante de la etapa (b) con un reactivo reticulador basado en polietilenglicol, en donde los grupos reactivos del reactivo reticulador se usan en una cantidad subestequiométrica comparado con el número total de grupos funcionales reactivos de $C(A-Hyp)_4$ para dar un hidrogel;

- 20 (d) hacer reaccionar los grupos funcionales que no han reaccionado que quedan (que representan los grupos funcionales reactivos de la cadena principal comprendidos en el hidrogel de la presente invención) en la cadena principal de hidrogel de la etapa (c) con un conjugado covalente de insulina y conector del profármaco transitorio, o primero hacer reaccionar los grupos funcionales que no han reaccionado con el conector del profármaco transitorio y posteriormente con insulina;

- 25 (e) opcionalmente rematar los grupos funcionales que no han reaccionado que quedan para dar un profármaco de la presente invención.

Específicamente, los hidrogeles para el profármaco de insulina de la presente invención se sintetizan como sigue:

Para la polimerización en masa, se mezclan el reactivo de la cadena principal y el reactivo reticulador en una relación de amina/éster activo de 2:1 a 1,05:1.

- 30 Tanto el reactivo de la cadena principal como el reactivo reticulador se disuelven en DMSO para dar una solución con una concentración de 5 a 50 g por 100 ml, preferiblemente de 7,5 a 20 g por 100 ml y lo más preferiblemente de 10 a 20 g por 100 ml.

- 35 Para realizar la polimerización, se añaden N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TMEDA) de 2 a 10% (en vol) a la solución de DMSO que contiene el reactivo reticulador y el reactivo de la cadena principal, y la mezcla se agita durante 1 a 20 segundos y se deja reposar. La mezcla solidifica en menos de 1 min.

Dicho hidrogel de acuerdo con la invención preferiblemente se muele por procedimientos mecánicos tales como agitación, trituración, cortado prensado o molienda y opcionalmente tamizado. Para la polimerización en emulsión, la mezcla de reacción está compuesta de la fase dispersa y la fase continua.

- 40 Para la fase dispersa, el reactivo de la cadena principal y el reactivo reticulador se mezclan en una relación de amina/éster activo de 2:1 a 1,05:1 y se disuelven en DMSO para dar una solución con una concentración de 5 a 50 g por 100 ml, preferiblemente de 7,5 a 20 g por 100 ml y lo más preferiblemente de 10 a 20 g por 100 ml.

- 45 La fase continua es cualquier disolvente, que no sea miscible con el DMSO, no básico, aprótico y que muestre una viscosidad inferior a 10 Pa.s, el disolvente no es miscible con el DMSO, no básico, aprótico y muestra una viscosidad inferior a 2 Pa.s y no es tóxico. Más preferiblemente, el disolvente es un hidrocarburo lineal o ramificado saturado con 5 a 10 átomos de carbono. Lo más preferiblemente, el disolvente es n-heptano.

Para formar una emulsión de la fase dispersa en la fase continua, se añade un emulsionante a la fase continua antes de añadir la fase dispersa. La cantidad de emulsionante es de 2 a 50 mg por ml de fase dispersa, más preferiblemente de 5 a 20 mg por ml de fase dispersa, lo más preferiblemente 10 mg por ml de fase dispersa.

- 50 El emulsionante tiene un valor de HLB de 3 a 8. Preferiblemente, el emulsionante es un triéster de sorbitol y un ácido graso o un conjugado de poli(hidroxil-ácido graso)-poli(etilenglicol). Más preferiblemente, el emulsionante es un conjugado de poli(hidroxi-ácido graso)-polietilenglicol, con un polietilenglicol lineal de un peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 5 kDa y unidades de poli(hidroxi-ácido graso) de peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 3 kDa en cada extremo de la cadena. Lo más preferiblemente, el emulsionante es polietilenglicol-dipoli(hidroxi-

estearato, Cithrol DPHS (Cithrol DPHS, antes Arlancel P135, Croda International Plc).

- 5 Se generan pequeñas gotas de la fase dispersa por agitación con un impulsor de flujo axial con una geometría similar a los agitadores tales como Isojet, Intermig, Propeller (EKATO Ruhr- und Mischtechnik GmbH, Alemania), lo más preferiblemente similar a Isojet con un diámetro de 50 a 90% el diámetro del reactor. Preferiblemente, la agitación se inicia antes de la adición de la fase dispersa. La velocidad del agitador se ajusta de 0,6 a 1,7 m/s. La fase dispersa se añade a temperatura ambiente y la concentración de la fase dispersa es de 2% a 70%, preferiblemente de 5 a 50%, más preferiblemente de 10 a 40%, y lo más preferiblemente de 20 a 35% del volumen total de reactivo. La mezcla de la fase dispersa, emulsionante y fase continua se agita durante 5 a 60 min antes de añadir la base para realizar la polimerización.
- 10 Se añaden de 5 a 10 equivalentes (respecto a cada enlace amida que se va a formar) de una base a la mezcla de fase dispersa y continua. La base es aprótica, no nucleófila y soluble en la fase dispersa. Preferiblemente, la base es aprótica, no nucleófila, bien soluble tanto en la fase dispersa como en DMSO. Más preferiblemente la base es aprótica, no nucleófila, bien soluble tanto en la fase dispersa como en DMSO, una base amina no tóxica. Los más preferiblemente, la base es N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TMEDA). La agitación en presencia de base se continúa durante 1 a 16 h.
- 15 Durante la agitación, pequeñas gotas de fase dispersa se endurecen para convertirse en perlas de hidrogel reticulado de acuerdo con la invención, que se pueden recoger y se lleva a cabo el fraccionamiento de acuerdo con el tamaño en una máquina de tamizado continuo vibratoria con una plataforma de 75 μm y una de 32 μm para dar micropartículas de hidrogel de acuerdo con la invención.
- 20 El hidrogel para el profármaco de insulina de la presente invención se puede obtener por el método de preparación en forma de micropartículas. En una realización preferida de la invención, el hidrogel reactivo es un artículo conformado tal como una malla o una endoprótesis. Lo más preferiblemente, el hidrogel se forma en perlas de micropartículas que se pueden administrar como inyección subcutánea o intramuscular mediante una jeringa estándar. Dichas perlas blandas pueden tener un diámetro entre 1 y 500 micrómetros.
- 25 Preferiblemente, las micropartículas tienen un diámetro entre 10 y 100 micrómetros si están suspendidas en un tampón de formulación acuosa isotónica, lo más preferiblemente un diámetro de entre 20 y 100 micrómetros, lo más preferiblemente un diámetro de entre 25 y 80 micrómetros.
- 30 Preferiblemente, las micropartículas se pueden administrar por inyección a través de una aguja menor de 0,6 mm de diámetro interno, preferiblemente a través de una aguja menor de 0,3 mm de diámetro interno, más preferiblemente a través de una aguja menor de 0,225 mm de diámetro interno, incluso más preferiblemente a través de una aguja menor de 0,175 mm de diámetro interno, y lo más preferiblemente a través de una aguja menor de 0,16 mm de diámetro interno.
- 35 Se entiende que las expresiones “se puede administrar por inyección”, “inyectable” o “inyectabilidad” se refieren a una combinación de factores tales como una determinada fuerza aplicada a un émbolo de una jeringa que contiene el hidrogel biodegradable de acuerdo con la invención hinchado en un líquido a una determinada concentración (p/v) y a una determinada temperatura, una aguja de un diámetro interno dado conectada a la salida de dicha jeringa y el tiempo requerido para extruir un determinado volumen del hidrogel biodegradable de acuerdo con la invención de la jeringa a través de la aguja.
- 40 Con el fin de proporcionar inyectabilidad, se puede extruir un volumen de 1 ml de profármacos de insulina de acuerdo con la invención hinchado en agua a una concentración de al menos 5% (p/v) y contenido en una jeringa que tiene un émbolo de 4,7 mm de diámetro, a temperatura ambiente en el espacio de 10 segundos aplicando una fuerza menor de 50 Newton.
- 45 Preferiblemente, la inyectabilidad se logra para un profármaco de insulina de acuerdo con la invención hinchado en agua a una concentración de aproximadamente 10% (p/v).
- En una realización adicional, la composición se caracteriza por ser una composición líquida que tras inyección forma un depósito.
- En una realización adicional, la composición se caracteriza por ser administrada por inyección, tal como subcutánea o intramuscular.
- 50 En una realización adicional, la composición es para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la deficiencia de insulina, en el que es beneficioso el tratamiento o prevención con un compuesto de insulina, tal como hiperglucemia, prediabetes, tolerancia a la glucosa alterada, diabetes tipo I, diabetes tipo II, síndrome X. Típicamente, dicha enfermedad o trastorno es la diabetes tipo II.
- 55 En una realización adicional, el compuesto de insulina se selecciona de insulina humana o no humana o análogos y derivados de insulina o conjugados de los mismos. Es más preferida la insulina humana y análogos de insulina, tales como por ejemplo, insulina glargina, insulina detemir, insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina. Cuando se

administra el compuesto de insulina, se alcanza una concentración pico máxima típicamente en las primeras 48 horas. En una realización adicional, la concentración máxima se alcanza en las primeras 24 horas de la administración, tal como en las primeras 12 horas de la administración, p. ej., en las primeras 6 horas de la administración.

- 5 En un aspecto adicional, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además un compuesto de GLP-1, típicamente un agonista de GLP-1.

Dichos compuesto de GLP-1 típicamente se selecciona de uno cualquiera de

[Seq ID No: 1] Exendina-4

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2

- 10 [Seq ID No: 2] Exendina-3

HSDGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2

[Seq ID No: 3]

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG P

[Seq ID No: 4]

- 15 HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG Y

[Seq ID No: 5]

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG

[Seq ID No: 6]

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG-NH2

- 20 [Seq ID No: 7]

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKN-NH2

[Seq ID No: 8]

HGEGTFTSDL SKQLEEEAVR LFIEFLKNGG PSSGAPPPS-NH2

[Seq ID No: 9]

- 25 HGEGTFTSDL SKQLEEEAVR LFIEFLKN-NH2

[Seq ID No: 10]

HGEGTFTSDL SKQLEEEAVR LAIEFLKN-NH2

[Seq ID No: 11]

HGEGTFTSDL SKQLEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2

- 30 [Seq ID No: 12]

HGDGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2

[Seq ID No: 13] GLP-1 (7-36) amida

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLKGR-NH2

[Seq ID No: 14]

- 35 HSEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLKGR-NH2

[Seq ID No: 15] GLP-1 (7-37)

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLKGRG

[Seq ID No: 16]

HAXaaGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGR-NH2

En donde Xaa se selecciona de P, F, Y.

[Seq ID No: 17]

HXaaEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGR-NH2

5 En donde Xaa se selecciona de T, ácido a-aminobutírico, D-Ala, V, Gly.

[Seq ID No: 18]

HaEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGG

[Seq ID No: 19]

R-HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGR-NH2

10 En donde R se selecciona de acetilo, piroglutamilo, N-2-hidroxi benzoilo, N-trans-3-hexenoilo.

[Seq ID No 20]

HXaaAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFlAWLVKGR-NH2

En donde Xaa es 6-amino-hexanoilo.

15 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de insulina para preparar una composición farmacéutica que comprende el compuesto de insulina en una concentración que es suficiente para mantener un nivel terapéuticamente eficaz del compuesto de insulina en el plasma sanguíneo durante al menos 3 días, típicamente al menos 80 horas, p. ej., una semana o más, caracterizada por tener un perfil farmacocinético in vivo sin sustancialmente aumento brusco del compuesto de insulina, para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la deficiencia de insulina, en el que es beneficioso el tratamiento o prevención con un compuesto de insulina.

20 Dicha concentración variará de un sujeto a otro y depende de la ventana terapéutica en un sujeto individual, pero con el fin de que esté presente un efecto terapéutico durante al menos 3 días, p. ej., una semana (es decir, aproximadamente 7 días) la concentración típicamente es al menos aproximadamente 10 mg/ml, p. ej., más de 10 mg/ml.

25 En los siguientes párrafos se da una composición preferida de un profármaco de insulina-hidrogel.

La composición del profármaco de insulina-hidrogel se puede proporcionar como una composición en suspensión o como una composición seca. Preferiblemente, la composición farmacéutica del profármaco de insulina-hidrogel es una composición seca. Los métodos adecuados de secado son, por ejemplo, secado por atomización y liofilización (congelación-secado). Preferiblemente, la composición farmacéutica del profármaco de insulina-hidrogel se seca por liofilización.

30 Preferiblemente, el profármaco de insulina-hidrogel tiene una dosificación en la composición suficiente para proporcionar la cantidad terapéuticamente eficaz de insulina durante al menos tres días en una aplicación. Más preferiblemente, una aplicación del profármaco de insulina-hidrogel es suficiente para una semana.

35 La composición farmacéutica del profármaco de insulina-hidrogel de acuerdo con la presente invención contiene uno o más excipientes.

Los excipientes usados en las composiciones parenterales se pueden clasificar como agentes de tamponamiento, modificadores de la isotonicidad, conservantes, estabilizantes, agentes antiadsorción, agentes de protección frente a la oxidación, viscosificadores/agentes de potenciación de la viscosidad, u otros agentes auxiliares. En algunos casos, estos ingredientes pueden tener función doble o triple. Las composiciones del profármaco de insulina-hidrogel de acuerdo con la presente invención contienen uno o más de un excipiente, seleccionado del grupo que consiste en:

45 (i) Agentes de tamponamiento: tampones fisiológicamente tolerados para mantener el pH en un intervalo deseado, tales como fosfato sódico, bicarbonato, succinato, histidina, citrato y acetato, sulfato, nitrato, cloruro, piruvato. También se pueden usar antiácidos tales como Mg(OH)₂ o ZnCO₃. La capacidad de tamponamiento se puede ajustar para que se corresponda con las condiciones más sensibles a la estabilidad del pH.

(ii) Modificadores de la isotonicidad: para minimizar el dolor que puede producirse por el daño a la célula debido a diferentes de presión osmótica en el depósito de inyección. Son ejemplos la glicerina y el cloruro sódico. Las concentraciones eficaces se pueden determinar por osmometría usando una osmolalidad supuesta para el suero de 285-315 mOsmol/kg.

- (iii) Conservantes y/o antimicrobianos: las preparaciones parenterales de múltiples dosis requieren la adición de conservantes en una concentración suficiente para minimizar el riesgo de que los pacientes se infecten tras la inyección y se han establecido los correspondientes requisitos reguladores. Los conservantes típicos incluyen m-cresol, fenol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, clorobutanol, alcohol bencílico, nitrato fenilmercúrico, timerosol, ácido sórbico, sorbato potásico, ácido benzoico, clorocresol, y cloruro de benzalconio.
- (iv) Estabilizantes: La estabilización se logra fortaleciendo las fuerzas estabilizadoras de la proteína, por desestabilización del estado desnaturalizado o por unión directa de excipientes a la proteína. Los estabilizantes pueden ser aminoácidos tales como alanina, arginina, ácido aspártico, glicina, histidina, lisina, prolina, azúcares tales como glucosa, sacarosa, trehalosa, polioles tales como glicerol, manitol, sorbitol, sales tales como fosfato potásico, sulfato sódico, agentes quelantes tales como EDTA, hexafofosato, ligandos tales como iones de metales divalentes (zinc, calcio, etc.), otras sales o moléculas orgánicas tales como derivados fenólicos. Además, se pueden usar oligómeros o polímeros tales como ciclodextrinas, dextrano, dendrímeros, PEG o PVP o protamina o HSA.
- (v) Agentes antiadsorción: Se usan principalmente tensioactivos iónico o no iónicos u otras proteínas o polímeros solubles para recubrir o adsorber de forma competitiva la superficie interior de la composición o del recipiente de la composición. P. ej., poloxámero (Pluronic F-68), éter de dodecilo y PEG (Brij 35), polisorbato 20 y 80, dextrano, polietilenglicol, PEG-polihistidina, BSA y HSA y gelatinas. La concentración y tipo de excipiente elegido depende del efecto que se quiere evitar, pero típicamente se forma una monocapa de tensioactivo en la interfase justo por encima del valor de CMC.
- (vi) Lio y/o crioprotectores: Durante la liofilización o secado por atomización, los excipientes pueden contrarrestar los efectos desestabilizantes causados por la rotura de enlaces de hidrógeno y la eliminación de agua. Para este fin se pueden usar azúcares y polioles, pero también se han observado los correspondientes efectos positivos para tensioactivos, aminoácidos, disolventes no acuosos y otros péptidos. La trehalosa es particularmente eficaz para reducir la agregación inducida por la humedad y también mejora la estabilidad térmica potencialmente causada por exposición de los grupos hidrófobos de la proteína al agua. También se pueden usar manitol y sacarosa, sea como lio/crioprotector solo o en combinación entre ellos, donde se sabe que las proporciones más altas de manitol:sacarosa potencian la estabilidad física de una torta liofilizada. El manitol también se puede combinar con trehalosa. La trehalosa también se puede combinar con sorbitol o se puede usar el sorbitol como el único protector. También se puede usar almidón y derivados de almidón.
- (vii) Agentes de protección frente a la oxidación: antioxidantes tales como ácido ascórbico, ectoína, metionina, glutatión, monotioglicerol, morina, polietilenimina (PEI), galato de propilo, vitamina E, agentes quelantes tales como ácido cítrico, EDTA, hexafofosato, ácido tioglicólico.
- (viii) Viscosificadores o potenciadores de la viscosidad: retardan el asentamiento de las partículas en el vial y la jeringa y se usan con el fin de facilitar la mezcla y resuspensión de las partículas y para hacer que la suspensión sea más fácil de inyectar (es decir, fuerza baja en el émbolo de la jeringa). Los viscosificadores o potenciadores de la viscosidad adecuados son, por ejemplo, viscosificadores de carbómero como Carbopol 940, Carbopol Ultrez 10, derivados de celulosa como hidroxipropilmetilcelulosa (hipromelosa, HPMC) o dietilaminoetilcelulosa (DEAE o DEAE-C), silicato de magnesio coloidal (Veegum) o silicato sódico, gel de hidroxiapatito, gel de fosfato tricálcico, xantanos, carragenanos como goma Satia UTC 30, poli(hidroxi-ácidos) alifáticos, tales como poli(ácido D,L- o L-láctico) (PLA) y poli(ácido glicólico) (PGA) y sus copolímeros (PLGA), terpolímeros de D,L-lactida, glicólido y caprolactona, poloxámeros, bloques de poli(oxietileno) hidrófilos y bloques de poli(oxipropileno) hidrófobos para componer un tribloque de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno)-poli(oxietileno) (p. ej. Pluronic®), copolímero de poli-éter-éster, tal como copolímero de poli(tereftalato de etilenglicol)/poli(tereftalato de butileno), acetato isobutirato de sacarosa (SAIB), dextrano o derivados del mismo, combinaciones de dextranos y PEG, polidimetilsiloxano, colágeno, chitosán, poli(alcohol vinílico) (PVA) y derivados, polialquilimidaz, poli(acrilamida-co-dialildimetilamonio (DADMA)), polivinilpirrolidona (PVP), glucosaminoglucanos (GAGs) tales como sulfato de dermatán, sulfato de condroitina, sulfato de keratán, heparina, sulfato de heparán, hialuronano, copolímeros tribloque ABA o bloques AB compuestos de bloques A hidrófobos, tales como polilactida (PLA) o poli(lactida-co-glicólido) (PLGA), y bloques B hidrófilos, tales como polietilenglicol (PEG) o polivinilpirrolidona. Dichos copolímeros de bloques, así como los poloxámeros mencionados antes pueden presentar un comportamiento de gelación térmico inverso (estado fluido a temperatura ambiente para facilitar la administración y estado de gel por encima de la temperatura de transición de sol-gel a la temperatura corporal después de inyección).
- (ix) Agente de expansión o difusión: modificadores de la permeabilidad del tejido conjuntivo por la hidrólisis de los componentes de la matriz extracelular en el espacio intersticial, tales como, pero no limitado a ácido hialurónico, un polisacárido encontrado en el espacio intercelular del tejido conjuntivo. Un agente de expansión tal como, pero no limitado a hialuronidasa disminuye temporalmente la viscosidad de la matriz extracelular y promueve la difusión de los fármacos inyectados.
- (x) Otros agentes auxiliares: tales como agentes humectantes, modificadores de la viscosidad, antibióticos, hialuronidasa. Los ácidos y bases tales como ácido clorhídrico e hidróxido sódico son agentes auxiliares necesarios para ajustar el pH durante la fabricación.

Preferiblemente, la composición de profármaco de insulina-hidrogel contiene uno o más de un viscosificador y/o agente de modificación de la viscosidad.

5 El término "excipiente" preferiblemente se refiere a un diluyente, adyuvante o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dicho excipiente farmacéutico puede ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los procedentes del petróleo, animales, vegetales o sintéticos, incluyendo pero no limitado a aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un excipiente preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía oral. La solución salina y dextrosa acuosa son los excipientes preferidos cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se usan preferiblemente como excipientes líquidos para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden tener forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y excipientes tradicionales, como triglicéridos. La formulación oral puede incluir excipientes convencionales tales como manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etc. de calidades farmacéuticas. Los ejemplos de excipientes farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de excipiente, para así proporcionar la forma de administración adecuada para el paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

En una realización general, una composición farmacéutica de la presente invención sea en forma seca o como una suspensión o en otra forma, se puede proporcionar como una composición de dosis única o de múltiples dosis.

25 En una realización de la presente invención, la composición seca del profármaco de insulina-hidrogel se proporciona como una sola dosis, lo que significa que el recipiente en el que se suministra contiene una dosis farmacéutica.

Por lo tanto, en otro aspecto de la presente invención, la composición se proporciona como una composición de dosis única.

30 Preferiblemente, la composición en suspensión es una composición de múltiples dosis, lo que significa que contiene más de una dosis terapéutica. Preferiblemente, una composición de múltiples dosis contiene al menos 2 dosis. Dicha composición de múltiples dosis de insulina-hidrogel la pueden usar diferentes pacientes que lo necesiten o está dirigida para usar en un solo paciente, en donde las dosis restantes se almacenan después de la aplicación de la primera dosis, hasta que sea necesario.

35 En otro aspecto de la presente invención, la composición está comprendida en un recipiente. Preferiblemente, el recipiente es una jeringa de doble cámara. En especial, la composición seca de acuerdo con la presente invención se proporciona en una primera cámara de la jeringa de doble cámara y se proporciona solución de reconstitución en una segunda cámara de la jeringa de doble cámara.

40 Antes de aplicar la composición seca de profármaco de insulina-hidrogel a un paciente que lo necesite, la composición seca se reconstituye. La reconstitución puede tener lugar en el recipiente en el que se proporciona la composición seca de profármaco de insulina-hidrogel, tal como en un vial, jeringa, jeringa de doble cámara, ampolla y cartucho. La reconstitución se hace por adición de una cantidad predefinida de solución de reconstitución a la composición seca. Las soluciones de reconstitución son líquidos estériles, tales como agua o tampón, que pueden contener aditivos adicionales, tales como conservantes y/o antimicrobianos. Si la composición de profármaco de insulina-hidrogel se proporciona como una sola dosis, la solución de reconstitución puede contener uno o más conservantes y/o antimicrobianos. Preferiblemente, la solución de reconstitución es agua estéril. Si la composición de profármaco de insulina-hidrogel es una composición de múltiples dosis, se prefiere que la solución de reconstitución contenga uno o más conservantes y/o antimicrobianos tales como, por ejemplo, alcohol bencílico y cresol.

50 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al método de administración de una composición de profármaco de insulina-hidrogel reconstituida. La composición de profármaco de insulina-hidrogel se puede administrar por métodos de inyección o infusión, que incluyen transdérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraósea e intraperitoneal.

55 Un aspecto adicional es un método de preparación de una composición reconstituida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco de insulina-hidrogel, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde la insulina está transitoriamente unida a un hidrogel, comprendiendo el método las etapas de

- poner en contacto la composición de la presente invención con una solución de reconstitución.

Otro aspecto es una composición reconstituida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco de insulina-hidrogel, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde la insulina está transitoriamente unida a un hidrogel que se puede obtener por el método anterior.

5 Otro aspecto de la presente invención, es el método de fabricación de una composición seca de profármaco de insulina-hidrogel. En una realización, dicha composición en suspensión se hace por

- (i) mezcla del profármaco de insulina-hidrogel con uno o más excipientes,
- (ii) transferencia de cantidades equivalentes a dosis individuales o dosis múltiples a un recipiente adecuado,
- (iii) secado de la composición en dicho recipiente, y
- (iv) sellado del recipiente.

10 Los recipientes adecuados son viales, jeringas, jeringas de doble cámara, ampollas y cartuchos.

Otro aspecto es un kit de piezas. Cuando el dispositivo de administración es simplemente una jeringa hipodérmica, entonces el kit puede comprender la jeringa, una aguja y un recipiente que comprende la composición de profármaco de insulina-hidrogel para usar con la jeringa y un segundo recipiente que comprende la solución de reconstitución. En realizaciones más preferidas, el dispositivo de inyección es distinto de una simple jeringa hipodérmica y por lo tanto el recipiente separado con el profármaco de insulina-hidrogel reconstituido se adapta para encajar con el dispositivo de inyección, de modo que cuando se usa, la composición líquida en el recipiente está en conexión fluida con la salida del dispositivo de inyección. Los ejemplos de dispositivos de administración incluyen, pero no se limitan a jeringas hipodérmicas y dispositivos inyectoros tipo bolígrafo. Los dispositivos de inyección particularmente preferidos son inyectoros de tipo bolígrafo, en cuyo caso el recipiente es un cartucho, preferiblemente un cartucho desechable.

20 Un kit de piezas preferido comprende una aguja y un recipiente que contiene la composición de acuerdo con la presente invención y opcionalmente contiene una solución de reconstitución, estando el recipiente adaptado para usar con la aguja. Preferiblemente, el recipiente es una jeringa de doble cámara.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un cartucho que contiene una composición de profármaco de insulina-hidrogel como se ha descrito en lo que antecede, para usar con un dispositivo inyector de bolígrafo. El cartucho puede contener una sola dosis o una multiplicidad de dosis de insulina.

30 En una realización de la presente invención, la composición en suspensión del profármaco de insulina-hidrogel no comprende solo un profármaco de insulina-hidrogel y uno o más excipientes, sino también otros agentes biológicamente activos, sea en forma libre o como profármacos. Preferiblemente, dichos uno o más agentes biológicamente activos adicionales es un profármaco, más preferiblemente un profármaco de hidrogel. Dichos agentes biológicamente activos incluyen, pero no se limitan a compuestos de las siguientes clases:

- (i) Sulfonilureas, tales como, por ejemplo, clorpropamida, tolazamida, tolbutamida, gliburida, glipizida, glimepirida, y similares,
- (ii) Meglitinidas, tales como, por ejemplo, repaglinida,
- 35 (iii) Péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y sus miméticos, péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y sus miméticos, Exendina y sus miméticos, inhibidores de dipeptidilo proteasa (DPP-IV),
- (iv) Biguanidas, tales como, por ejemplo, metformina,
- (v) Tiazolidinadionas, tales como, por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona, troglitazona, isaglitazona (conocida como MCC-555), ácido 2-[2-[(2R)-4-hexil-3,4-dihidro-3-oxo-2H-1,4-benzoxazin-2-il]etoxi]-benceno-acético, y similares
- 40 (vi) GW2570, y similares,
- (vii) moduladores de receptor retinoide-X (RXR), tales como, por ejemplo, targretina, ácido 9-cis-retinoico, y similares,
- (viii) Otros agentes sensibilizadores de insulina, tales como, por ejemplo, INS-1, inhibidores de PTP-1B, inhibidores de GSK3, inhibidores de glucógeno fosforilasa a, inhibidores de fructosa-1,6-bisfosfatasa, y similares,
- 45 (ix) Insulinas, incluyendo insulinas normales o de acción corta, acción intermedia y acción prolongada, insulina inhalada y análogos de insulina, tales como moléculas de insulina con diferencias menores en la secuencia de aminoácidos natural,
- (x) Moléculas pequeñas miméticas de insulina, que incluyen, pero no se limitan a L-783281, TE-17411, y similares,
- (xi) inhibidores del cotransportador de Na-glucosa, tales como T-1095, T-1095A, florizina, y similares,

(xii) Agonistas de amilina que incluyen, pero no se limitan a pramlintida, y similares,

(xiii) Antagonistas de glucagón tales como AY-279955, y similares.

Además de agentes antidiabéticos, los compuestos bioactivos pueden ser agentes antiobesidad como orlistat, un inhibidor de lipasa pancreática, que previene la rotura y absorción de grasa; o sibutramina, un supresor del apetito e inhibidor de la recaptación de serotonina, norepinefrina y dopamina en el cerebro, factores de crecimiento que aumentan la movilización de grasa (p. ej., hormona del crecimiento, IGF-1, factor de liberación de la hormona del crecimiento), oxintomodulina y moduladores de grelina. Otros potenciales agentes antiobesidad bioactivos incluyen, pero no se limitan a supresores del apetito que actúan por mecanismos adrenérgicos tales como benzfetamina, fenmetrazina, fentermina, dietilpropión, mazindol, sibutramina, fenilpropanolamina o, efedrina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos serotoninérgicos tales como quipazina, fluoxetina, sertralina, fenfluramina, o dexfenfluramina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos de la dopamina, p. ej., apomorfina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos histaminérgicos (p. ej., miméticos de histamina, moduladores de receptor H3); potenciadores del gasto de energía tales como agonistas beta-3 adrenérgicos y estimuladores de la función de proteínas desacoplates; leptina y miméticos de leptina (p. ej., metreleptina); antagonistas del neuropéptido Y; moduladores del receptor de melanocortina-1, 3 y 4; agonistas de colecistoquinina; miméticos y análogos del péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) (p. ej., Exendina); andrógenos (p. ej., deshidroepiandrosterona y derivados tales como eticolandiona), testosterona, esteroides anabólicos (p. ej., oxandrolona), y hormonas esteroideas; antagonistas del receptor de galanina; agentes de citoquinas tales como factor neurotrófico ciliar; inhibidores de amilasa; agonistas/miméticos de enterostatina; antagonistas de orexina/hipocretina; antagonistas de urocortina; agonistas de bombesina; moduladores de proteína quinasa A; miméticos del factor de liberación de corticotropina; miméticos de transcrito regulado por cocaína y anfetamina; miméticos de péptido relacionado con el gen de la calcitonina; e inhibidores de la ácido graso sintasa.

En una realización alternativa, la composición de profármaco de insulina-hidrogeles de acuerdo con la presente invención, se combina con un segundo compuesto biológicamente activo de modo que el profármaco de insulina-hidrogeles se administra primero a un paciente que lo necesita, seguido de la administración de un segundo compuesto. Alternativamente, la composición de insulina-hidrogeles se administra a un paciente que lo necesita después de que se ha administrado otro compuesto al mismo paciente.

Además de agentes antidiabéticos, los compuestos bioactivos pueden ser agentes antiobesidad tales como orlistat, un inhibidor de lipasa pancreática, que previene la rotura y absorción de grasa; o sibutramina, un supresor del apetito e inhibidor de la recaptación de serotonina, norepinefrina y dopamina en el cerebro, factores de crecimiento que aumentan la movilización de grasa (p. ej., hormona del crecimiento, IGF-1, factor de liberación de la hormona del crecimiento), oxintomodulina y moduladores de grelina. Otros potenciales agentes antiobesidad bioactivos incluyen, pero no se limitan a supresores del apetito que actúan por mecanismos adrenérgicos tales como benzfetamina, fenmetrazina, fentermina, dietilpropión, mazindol, sibutramina, fenilpropanolamina o, efedrina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos serotoninérgicos tales como quipazina, fluoxetina, sertralina, fenfluramina, o dexfenfluramina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos de la dopamina, p. ej., apomorfina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos histaminérgicos (p. ej., miméticos de histamina, moduladores de receptor H3); potenciadores del gasto de energía tales como agonistas beta-3 adrenérgicos y estimuladores de la función de proteínas desacoplates; leptina y miméticos de leptina (p. ej., metreleptina); antagonistas del neuropéptido Y; moduladores del receptor de melanocortina-1, 3 y 4; agonistas de colecistoquinina; miméticos y análogos del péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) (p. ej., Exendina); andrógenos (p. ej., deshidroepiandrosterona y derivados tales como eticolandiona), testosterona, esteroides anabólicos (p. ej., oxandrolona), y hormonas esteroideas; antagonistas del receptor de galanina; agentes de citoquinas tales como factor neurotrófico ciliar; inhibidores de amilasa; agonistas/miméticos de enterostatina; antagonistas de orexina/hipocretina; antagonistas de urocortina; agonistas de bombesina; moduladores de proteína quinasa A; miméticos del factor de liberación de corticotropina; miméticos de transcrito regulado por cocaína y anfetamina; miméticos de péptido relacionado con el gen de la calcitonina; e inhibidores de la ácido graso sintasa.

En una realización alternativa, la composición de profármaco de insulina-hidrogeles de acuerdo con la presente invención, se combina con un segundo compuesto biológicamente activo de modo que el profármaco de insulina-hidrogeles se administra primero a un paciente que lo necesita, seguido de la administración de un segundo compuesto. Alternativamente, la composición de insulina-hidrogeles se administra a un paciente que lo necesita después de que se ha administrado otro compuesto al mismo paciente.

Los pacientes que necesitan tratamiento con composiciones de insulina de acción prolongada descritas en la presente invención tienen un riesgo alto de desarrollar comorbilidades. Por consiguiente, se puede usar la combinación de la insulina de acción prolongada de la presente con compuestos bioactivos adecuados, p. ej., para prevenir, retrasa el avance o el tratamiento de enfermedades y trastornos seleccionados del grupo que consiste en hipertensión (que incluye pero no se limita a hipertensión sistólica aislada e hipertensión dislipidémica familiar), insuficiencia cardíaca congestiva, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad arterial periférica, retinopatía diabética, degeneración macular, cataratas, nefropatía diabética, glomerulosclerosis, insuficiencia renal crónica, neuropatía diabética, síndrome X, síndrome premenstrual, cardiopatía coronaria, angina de pecho, trombosis, aterosclerosis, Infarto de miocardio, ataques isquémicos transitorios, accidente cerebrovascular, reestenosis

vascular, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina, alteración del metabolismo de la glucosa, afecciones de alteración de la glucosa en ayunas, obesidad, disfunción eréctil, trastornos de la piel y del tejido conectivo, ulceraciones del pie y colitis ulcerosa, disfunción endotelial y distensibilidad vascular deteriorada.

5 La prevención, retraso del avance o tratamiento de enfermedades y trastornos seleccionados del grupo anterior, se puede lograr por la combinación de la composición de insulina de acción prolongada de la presente invención con al menos un compuesto bioactivo seleccionado de las clases de fármacos usadas para tratar dichas afecciones, que incluyen antagonistas del receptor AT₁; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE); inhibidores de renina; bloqueadores del receptor beta adrenérgico; bloqueadores del receptor alfa adrenérgico; bloqueadores de canales de calcio; inhibidores de la aldosterona sintasa; antagonistas del receptor de aldosterona; inhibidores de la endopeptidasa neutral (NEP); inhibidores dobles de la enzima convertidora de angiotensina/endopeptidasa neutral (ACE/NEP); un antagonista del receptor de endotelina; diuréticos; estatinas; nitratos; agentes antiocoagulantes; péptidos natriuréticos; compuestos digitálicos; moduladores de PPAR.

10 Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de insulina para preparar una composición farmacéutica que comprende el compuesto de insulina en una concentración de al menos 10 mg/ml, caracterizada porque tiene un perfil farmacocinético sin sustancialmente aumento brusco del compuesto de insulina, para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la deficiencia de insulina, en cuyo tratamiento o prevención es beneficioso un compuesto de insulina.

15 En una realización de la presente invención, la concentración del compuesto de insulina es al menos 11 mg/ml, tal como de 11 mg/ml a 35 mg/ml, más preferido de 15 mg/ml a 25 mg/ml, incluso más preferido aproximadamente 20 mg/ml, e incluso más preferido aproximadamente 24 mg/ml.

El volumen que se va a administrar, tal como mediante una jeringa, a un sujeto, tal como un ser humano, preferiblemente es menor de 1,5 ml, típicamente 1,0 ml o menos.

20 En una realización adicional, la enfermedad o trastorno asociado con la deficiencia de insulina, en cuyo tratamiento o prevención es beneficioso un compuesto de insulina, se selecciona de hiperglucemia, prediabetes, tolerancia a la glucosa alterada, diabetes tipo I, diabetes tipo II, síndrome X. Típicamente, dicha enfermedad o trastorno es la diabetes tipo II.

Una realización adicional más se refiere al tratamiento o prevención de la hiperglucemia, prediabetes, tolerancia a la glucosa alterada, diabetes tipo I, diabetes tipo II, síndrome X, en un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano.

25 En una realización adicional, al sujeto humano se le ha diagnosticado prediabetes, tolerancia a la glucosa alterada, obesidad, hipertensión, diabetes tipo I, diabetes tipo II, síndrome X.

En una realización adicional más, el perfil farmacocinético se mide en el plasma sanguíneo de mamífero tal como plasma sanguíneo humano.

30 En una realización adicional, la composición se caracteriza por presentar una relación de pico a valle menor que 2, tal como menor que 1,75, menor que 1,5, o menor que 1,25.

En una realización adicional más, la composición se caracteriza por una liberación continua de un compuesto de insulina estructuralmente intacta a lo largo del periodo de tiempo completo entre administraciones.

En una realización adicional el periodo de tiempo completo entre administraciones es al menos aproximadamente 80 horas, tal como aproximadamente 110 horas, típicamente una semana.

35 En una realización adicional más el compuesto de insulina es un profármaco. Dicho profármaco se puede seleccionar típicamente de los descritos antes representados por la fórmula D-L.

En una realización adicional el compuesto de insulina está totalmente contenido en un depósito, típicamente un gel polimérico, tal como un hidrogel, p. ej., una matriz de polímero bien hidratada. Típicamente una matriz de polímero bien hidratada minimiza el contacto intermolecular de moléculas de insulina.

40 En una realización adicional más el compuesto de insulina está covalentemente unido en el depósito, típicamente el gel polimérico, tal como el hidrogel, p. ej., una matriz de polímero bien hidratada.

En una realización adicional, la composición se caracteriza por ser una composición líquida, la cual tras inyección forma un depósito.

En una realización adicional más, la composición se administra por inyección, tal como subcutánea o intramuscular.

45 En una realización adicional, el compuesto de insulina se selecciona de insulina humana o no humana o análogos y derivados de insulina o conjugados de los mismos. Es más preferida la insulina humana y análogos de insulina, tales como por ejemplo, insulina glargina, insulina detemir, insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina.

En una realización adicional más, la concentración máxima se alcanza en las primeras 24 horas de la administración, tal como en las primeras 12 horas de la administración, p. ej., en las primeras 6 horas de la administración.

En una realización adicional, la composición comprende además un compuesto de GLP-1.

- 5 Una realización adicional más está en combinación con un compuesto de GLP-1. Típicamente, el compuesto de insulina se puede administrar primero o viceversa, y el compuesto de insulina y el compuesto de GLP-1 se puede administrar de forma simultánea o secuencial.

10 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la deficiencia de insulina, en cuyo tratamiento o prevención es beneficioso un compuesto de insulina, tal como hiperglucemia, prediabetes, tolerancia a la glucosa alterada, diabetes tipo I, diabetes tipo II, síndrome X, en un sujeto mamífero que necesite dicho tratamiento o prevención, por la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de insulina en una concentración que es suficiente para mantener un nivel terapéuticamente eficaz del compuesto de insulina en el plasma sanguíneo durante al menos 3 días, típicamente al menos 80 horas, p. ej., una semana o más, caracterizado por tener un perfil farmacocinético in vivo sin sustancialmente aumento brusco del compuesto de insulina.

15 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la deficiencia de insulina, en cuyo tratamiento o prevención es beneficioso un compuesto de insulina, tal como hiperglucemia, prediabetes, tolerancia a la glucosa alterada, diabetes tipo I, diabetes tipo II, síndrome X, en un sujeto mamífero que necesite dicho tratamiento o prevención, por la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de insulina en una concentración de al menos 10 mg/ml, caracterizado por tener un perfil farmacocinético in vivo sin sustancialmente aumento brusco del compuesto de insulina.

20 Una realización se refiere al tratamiento o prevención de la hiperglucemia, prediabetes, tolerancia a la glucosa alterada, diabetes tipo I, diabetes tipo II, síndrome X, en un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano. Típicamente, al sujeto humano se le ha diagnosticado prediabetes, tolerancia a la glucosa alterada, obesidad, hipertensión, diabetes tipo I, diabetes tipo II, síndrome X.

En una realización adicional, la concentración del compuesto de insulina es al menos 11 mg/ml, tal como de 11 mg/ml a 35 mg/ml.

25 En una realización adicional más, el perfil farmacocinético se mide en el plasma sanguíneo de mamífero tal como plasma sanguíneo humano.

En una realización adicional, la composición se caracteriza por presentar una relación de pico a valle menor que 2, tal como menor que 1,75, menor que 1,5, o menor que 1,25.

En una realización adicional más, la composición se caracteriza por una liberación continua de un compuesto de insulina estructuralmente intacta a lo largo del periodo de tiempo completo entre administraciones.

30 En una realización adicional el periodo de tiempo completo entre administraciones es al menos aproximadamente 80 horas, tal como aproximadamente 110 horas, típicamente una semana.

En una realización adicional más el compuesto de insulina es un profármaco, tal como uno cualquiera de los profármacos descritos en la presente memoria.

35 En una realización adicional el compuesto de insulina está totalmente contenido en un depósito, típicamente un gel polimérico, tal como un hidrogel, p. ej., una matriz de polímero bien hidratada.

En una realización adicional más el compuesto de insulina está covalentemente unido en el depósito, típicamente el gel polimérico, tal como el hidrogel, p. ej., una matriz de polímero bien hidratada.

En una realización adicional, la composición se caracteriza por ser una composición líquida, la cual tras inyección forma un depósito.

40 En una realización adicional más, la composición se administra por inyección, tal como subcutánea o intramuscular.

45 En una realización adicional, el compuesto de insulina se selecciona de insulina humana o no humana o análogos y derivados de insulina o conjugados de los mismos. Es más preferida la insulina humana y análogos de insulina, tales como por ejemplo, insulina glargina, insulina detemir, insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina. En una realización adicional más, la concentración máxima se alcanza en las primeras 24 horas de la administración, tal como en las primeras 12 horas de la administración, p. ej., en las primeras 6 horas de la administración.

50 En una realización adicional, la composición comprende además un compuesto de GLP-1.

Una realización adicional más está en combinación con un compuesto de GLP-1. Típicamente, el compuesto de insulina se puede administrar primero o viceversa, y el compuesto de insulina y el compuesto de GLP-1 se puede administrar de forma simultánea o secuencial.

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un kit de piezas que comprende una composición farmacéutica de una cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria y un recipiente para la administración de la composición. Típicamente, el recipiente es una jeringa.

Una realización del kit comprende además un compuesto de GLP-1.

Figura 1a. Cromatograma de UPLC del conjugado de insulina-conector 12a.

Figura 1b. Cromatograma de UPLC del conjugado de insulina-conector 12b.

- 10 La figura 2 muestra la concentración de insulina plasmática media de los animales 1-10 después de una sola dosis subcutánea del artículo de ensayo 11a que contiene 6 mg de insulina, en ratas sanas a los largo de un periodo de 2 semanas. (Las barras de error se dan como \pm desviación típica, obtenida de los 10 animales, los valores t_0 se tomaron 3 días antes de la administración).

- 15 Figura 3: Concentración de insulina plasmática media de los animales 1-8 después de una sola dosis subcutánea del artículo de ensayo 11da que contiene 3 mg de insulina, en ratas sanas a los largo de un periodo de 13 días. (Las barras de error se dan como \pm desviación típica, obtenida de los 8 animales, los valores t_0 se tomaron 1 día antes de la administración).

- 20 Figura 4: Concentración de insulina plasmática (cuadrados grises) y nivel de glucosa en la sangre (círculos negros) después de una sola dosis subcutánea del artículo de ensayo 11da que contiene 6,4 mg de insulina, en ratas diabéticas (n=7). (Las barras de error se dan como \pm desviación típica, obtenida de los 7 animales, los valores t_0 se tomaron 4 días antes de la administración).

- 25 Figura 5: Nivel de insulina plasmática media después de una sola dosis subcutánea de 8 mg/kg del artículo de ensayo 11db, en ratas durante las primeras 24 horas después de la administración (análisis del aumento brusco). 8 ratas se dividieron en 2 grupos y se tomaron muestras de sangre para la farmacocinética alternando entre ambos grupos. En ninguno de los grupos hubo un efecto de aumento brusco perceptible. (Las barras de error se dan como \pm desviación típica, obtenida de todos los animales por grupo, los valores t_0 se tomaron 1 día antes de la administración).

- 30 Figura 6: Concentración de insulina plasmática (cuadrados grises) y nivel de glucosa en la sangre (círculos negros) durante un periodo de 4 semanas después 3 dosis subcutáneas semanales de 8 mg/kg del artículo de ensayo 11da, en ratas diabéticas (n=8). (Las barras de error se dan como \pm desviación típica, obtenida de los 8 animales, los valores t_0 se tomaron 3 días antes de la administración).

- 35 Figura 7: Concentración de insulina plasmática media de los animales 1-8 (animales 1-4 y animales 5-8 para el valor de 0,3, 1 h 2 y 4 h, respectivamente) después de una sola inyección subcutánea de 12 mg/kg de insulina formulada en el artículo de ensayo 11dc, en ratas sanas a los largo de un periodo de 13 días. (Las barras de error se dan como \pm desviación típica, obtenida de los 8 animales, los valores t_0 se tomaron 4 días antes de la administración).

- Figura 8: Superposición de la liberación de insulina y la degradación de hidrogel de insulina-conector-hidrogel 11a. La cantidad de contenido de insulina en el insulina-conector-hidrogel (triángulos) y liberación de restos de cadena principal (círculos) tras incubación del insulina-conector-hidrogel a pH 7,4 y 37°C, se representan gráficamente frente al tiempo de incubación.

- 40 La figura 9 muestra una representación gráfica de la fuerza frente al flujo usando una aguja 30G. Puntos de datos: cuadrados negros = etilenglicol; triángulos negros = agua; puntos negros = profármaco de hidrogel-insulina

Ejemplos

Materiales y métodos

La insulina humana recombinante se obtuvo de Biocon Ltd., Bangalore, India.

- 45 El amino-PEG de 4 brazos de 5 kDa se obtuvo de JenKem Technology, Beijing, P. R. China.

El éster de NHS del ácido N-(3-maleimidopropil)-21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-heneicosanoico (Mal-PEG6-NHS) se obtuvo de Celares GmbH, Berlín, Alemania.

- 50 La resina de cloruro de 2-clorotritilo, HATU, N-ciclohexil-carbodiimida-N'-metil-poliestireno, y aminoácidos eran de Merck Biosciences GmbH, Schwabach/Ts, Alemania, si no se expone otra cosa. Fmoc(NMe)-Asp(OtBu)-OH se obtuvo de Bachem AG, Bubendorf, Suiza. El ácido S-tritil-6-mercaptohexanoico se adquirió en Polipeptide, Strasbourg, Francia. Los aminoácidos usados eran la configuración L si no se expone otra cosa.

Todos los demás productos químicos eran de Sigma-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania.

La síntesis en fase sólida se llevó a cabo en resina de cloruro de 2-clorotritilo (TCP) con una carga de 1,3 mmol/g. Se usaron jeringas equipadas con fritas de polipropileno como recipientes de reacción.

La carga del primer aminoácido en las resinas se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Desprotección de Fmoc:

Para la eliminación del grupo protector Fmoc, la resina se agitó con piperidina/DBU/DMF 2/2/96 (v/v/v) (2 veces, 10 min cada vez) y se lavaron con DMF (10 veces).

Desprotección de Fmoc de resinas cargadas con Fmoc-Aib

10 La desprotección de Fmoc de Fmoc-Aib-OH inmovilizado se logró por agitación de la resina en DMF/piperidina 4/1 (v/v) a 50 °C durante 20 min (2 veces).

Protocolo de escisión para la resina de cloruro de 2-clorotritilo

15 Tras completarse la síntesis, la resina se lavó con DCM, se secó a vacío y se trató dos veces durante 30 min con 6/4 DCM/HFIP (v/v). Los eluatos se combinaron, los productos volátiles se separaron con una corriente de nitrógeno y el producto bruto resultante se purificó por RP-HPLC. Las fracciones de HPLC que contenían producto se combinaron y liofilizaron.

Los productos que contenían amina obtenidos como sales de TFA se convirtieron en las correspondientes sales de HCl usando resina de intercambio iónico (Discovery DSC-SAX, Supelco, EE.UU.). Esta etapa se llevó a cabo en el caso de que se esperase que el THF residual interfiriera con, p. ej., una posterior reacción de acoplamiento.

Purificación por RP-HPLC:

20 La RP-HPLC se hizo en una columna de 100x20 mm o 100x40 mm C18 ReproSil-Pur 300 ODS-3 5 μ (Dr. Maisch, Ammerbuch, Alemania) conectada a un sistema de HPLC Waters 600 y detector de absorbancia Waters 2487. Se usaron gradientes lineales de solución A (TFA al 0,1% en H₂O) y solución B (TFA al 0,1% en acetonitrilo). Las fracciones de HPLC que contenían producto se liofilizaron.

Cromatografía ultrarrápida

25 Se llevaron a cabo purificaciones por cromatografía ultrarrápida en un sistema Isolera One de Biotage AB, Suecia, usando cartuchos de sílice Biotage KP-Sil y n-heptano y acetato de etilo como eluyentes. Los productos se detectaron a 254 nm.

Para las perlas de hidrogel, se usaron jeringas equipadas con fritas de polipropileno como recipientes de reacción o para las etapas de lavado.

30 Métodos analíticos

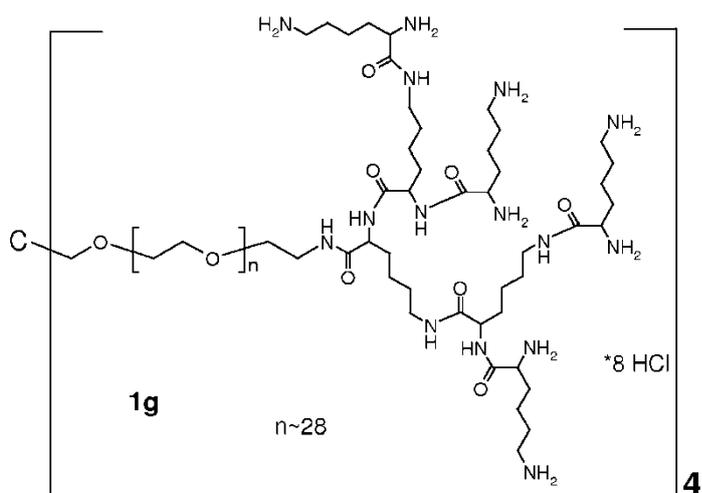
Se llevó a cabo la CL de ultra rendimiento analítica (UPLC) en un sistema Waters Acquity equipado con una columna Waters BEH300 C18 (2,1 x 50 mm, tamaño de partículas 1,7 μ m) acoplada a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Discovery de Thermo Scientific.

35 La MS de los productos de PEG mostraba una serie de restos de (CH₂CH₂O)_n debido a la polidispersidad de los materiales de partida de PEG. Para una interpretación más fácil, solo se da una señal m/z representativa en los ejemplos. La MS de los conjugados de insulina se da para los isótopos representativos y se refiere a aductos de cuatro protones [M+4H]⁴⁺.

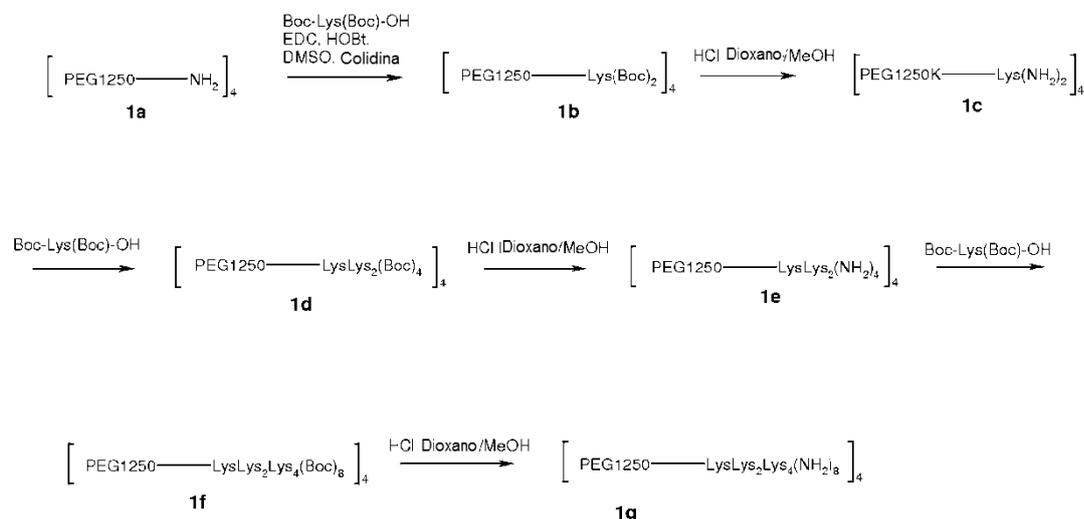
40 La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) se llevó a cabo usando un sistema de Amersham Bioscience AEKTAbasic equipado con una columna Superdex200 5/150 GL (Amersham Bioscience/GE Healthcare) equipado con un filtro de entrada de 0,45 μ m, si no se expone otra cosa. Se usó fosfato sódico 20 mM, NaCl 140 mM, a pH 7,4, como fase móvil.

Ejemplo 1

Síntesis del reactivo de la cadena principal 1g



El reactivo de la cadena principal 1g se sintetizó a partir del amino-PEG5000 4 brazos 1a de acuerdo con el siguiente esquema:



- 5 Para la síntesis del compuesto 1b, el amino-PEG5000 4 brazos 1a (PM aproximadamente 5200 g/mol, 5,20 g, 1,00 mmol, sal de HCl) se disolvió en 20 ml de DMSO (anhidro). Se añadieron Boc-Lis(Boc)-OH (2,17 g, 6,25 mmol) en 5 ml de DMSO (anhidro), EDC HCl (1,15 g, 6,00 mmol), HOBT·H₂O (0,96 g, 6,25 mmol), y colidina (5,20 ml, 40 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min a t.a.

- 10 La mezcla de reacción se diluyó con 1200 ml de diclorometano y se lavó con 600 ml de H₂SO₄ 0,1 N (2 x), salmuera (1 x), NaOH 0,1 M (2 x), y salmuera/agua 1/1 (v/v) (4 x). Las capas acuosas se volvieron a extraer con 500 ml de DCM. Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron para dar 6,3 g de producto bruto **1b** en forma de un aceite incoloro. El compuesto 1b se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento 3,85 g (59%) del producto vítreo incoloro 1b.

MS: m/z 1294,4 = [M+5H]⁵⁺ (calculado = 1294,6).

- 15 El compuesto 1c se obtuvo por agitación de 3,40 g del compuesto 1b (0,521 mmol) en 5 ml de metanol y 9 ml de HCl 4 N en dioxano a t.a. durante 15 min. Los compuestos volátiles se separaron a vacío. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

MS: m/z 1151,9 = [M+5H]⁵⁺ (calculado = 1152,0).

- 20 Para la síntesis del compuesto 1d, se disolvieron 3,26 g del compuesto 1c (0,54 mmol) en 15 ml de DMSO (anhidro). Se añadieron 2,99 g de Boc-Lis(Boc)-OH (8,64 mmol) en 15 ml DMSO (anhidro), 1,55 g de DC HCl (8,1 mmol), 1,24 g de HOBT·H₂O (8,1 mmol), y 5,62 ml de colidina (43 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min a t.a.

La mezcla de reacción se diluyó con 800 ml de DCM y se lavó con 400 ml de H₂SO₄ 0,1 N (2 x), salmuera (1 x), NaOH 0,1 M (2 x), y 1/1 (v/v) salmuera/agua (4 x). Las capas acuosas se volvieron a extraer con 800 ml de DCM.

Las fases orgánicas se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron para dar un producto bruto vítreo.

El producto se disolvió en DCM y precipitó con éter dietílico enfriado (-18 °C). Este procedimiento se repitió dos veces y el precipitado se secó a vacío.

5 Rendimiento: 4,01 g (89%) de producto vítreo incoloro 1d, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.
MS: m/z 1405,4 = [M+6H]⁶⁺ (calculado = 1405,4).

El compuesto 1e se obtuvo agitando una solución del compuesto 1d (3,96 g, 0,47 mmol) en 7 ml de metanol y 20 ml de HCl 4 N en dioxano a t.a. durante 15 min. Los compuestos volátiles se separaron a vacío. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

MS: m/z 969,6 = [M+7H]⁷⁺ (calculado = 969,7).

10 Para la síntesis del compuesto 1f, el compuesto 1e (3,55 g, 0,48 mmol) se disolvió en 20 ml de DMSO (anhidro). Se añadieron Boc-Lis(Boc)-OH (5,32 g, 15,4 mmol) en 18,8 ml de DMSO (anhidro), EDC HCl (2,76 g, 14,4 mmol), HOBT·H₂O (2,20 g, 14,4 mmol), y 10,0 ml de colidina (76,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 60 min a t.a.

15 La mezcla de reacción se diluyó con 800 ml de DCM y se lavó con 400 ml de H₂SO₄ 0,1 N (2 x), salmuera (1 x), NaOH 0,1 M (2 x), y salmuera/agua 1/1 (v/v) (4 x). Las capas acuosas se volvieron a extraer con 800 ml de DCM. Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron para dar el producto bruto 1f en forma de un aceite incoloro.

El producto se disolvió en DCM y precipitó con éter dietílico enfriado (-18 °C). Esta etapa se repitió dos veces y el precipitado se secó a vacío.

20 Rendimiento 4,72 g (82%) de producto vítreo incoloro 1f, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.
MS: m/z 1505,3 = [M+8H]⁸⁺ (calculado = 1505,4).

El reactivo de la cadena principal 1g se obtuvo agitando una solución del compuesto 1f (PM aproximado 12035 g/mol, 4,72 g, 0,39 mmol) en 20 ml de metanol y 40 ml de HCl 4 N en dioxano a t.a. durante 30 min. Los compuestos volátiles se separaron a vacío.

25 Rendimiento 3,91 g (100 %), de producto vítreo reactivo de la cadena principal 1g.

MS: m/z 977,2 = [M+9H]⁹⁺ (calculado = 977,4).

Ruta sintética alternativa para 1g

30 Para la síntesis del compuesto 1b, a una suspensión de PEG5000-4 brazos-tetraamina (1a) (50,0 g, 10,0 mmol) en 250 ml de *i*PrOH (anhidro), se añadieron boc-Lis(boc)-OSu (26,6 g, 60,0 mmol) y DIEA (20,9 ml, 120 mmol) a 45 °C y la mezcla se agitó durante 30 min.

35 Posteriormente, se añadieron *n*-propilamina (2,48 ml, 30,0 mmol). Después de 5 min la solución se diluyó con 1000 ml de MTBE y se almacenó durante la noche a -20 °C sin agitación. Aproximadamente 500 ml del líquido sobrenadante se separaron por decantación y se descartaron. Se añadieron 300 ml de MTBE frío y después de 1 min de agitación el producto el producto se recogió por filtración a través de un filtro de vidrio y se lavó con 500 ml de MTBE frío. El producto se secó a vacío durante 16 h.

Rendimiento: 65,6 g (74%) 1b como un sólido blanco grumoso

MS: m/z 937,4 = [M+7H]⁷⁺ (calculado = 937,6).

40 El compuesto 1c se obtuvo por agitación del compuesto 1b de la etapa previa (48,8 g, 7,44 mmol) en 156 ml de 2-propanol a 40 °C. Se añadieron una mezcla de 196 ml de 2-propanol y 78,3 ml de cloruro de acetilo con agitación en 1-2 min. La solución se agitó a 40 °C durante 30 min y se enfrió a -30 °C durante la noche con agitación. Se añadieron 100 ml de MTBE frío, la suspensión se agitó durante 1 min y se enfrió durante 1 h a -30 °C. El producto se recogió por filtración a través de un filtro de vidrio y se lavó con 200 ml de MTBE frío. El producto se secó a vacío durante 16 h.

Rendimiento: 38,9 g (86%) de 1c en forma de un polvo blanco

45 MS: m/z 960,1 = [M+6H]⁶⁺ (calculado = 960,2).

50 Para la síntesis del compuesto 1d, a una suspensión de 1c de la etapa previa (19,0 g, 3,14 mmol) en 80 ml 2-propanol, se añadieron boc-Lis(boc)-OSu (16,7 g, 37,7 mmol) y DIEA (13,1 ml, 75,4 mmol) a 45 °C y la mezcla se agitó durante 30 min a 45 °C. Posteriormente, se añadió *n*-propilamina (1,56 ml, 18,9 mmol). Después de 5 min la solución precipitó con 600 ml de MTBE frío y se centrifugó (3000 min⁻¹, 1 min) El precipitado se secó a vacío durante 1 h y se disolvió en 400 ml THF. Se añadieron 200 ml de éter dietílico y el producto se enfrió a -30 °C durante 16 h

sin agitación. La suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio y se lavó con 300 ml de MTBE frío. El producto se secó a vacío durante 16 h.

Rendimiento: 21,0 g (80%) de 1d como un sólido blanco

MS: m/z 1405,4 = $[M+6H]^{6+}$ (calculado = 1405,4).

- 5 El compuesto 1e se obtuvo disolviendo el compuesto 1d de la etapa previa (15,6 g, 1,86 mmol) en HCl 3 N en metanol (81 ml, 243 mmol) y agitando durante 90 min a 40 °C. Se añadieron 200 ml de MeOH y 700 ml de iPrOH y la mezcla se almacenó durante 2 h a -30 °C. Para que se completara la cristalización, se añadieron 100 ml de MTBE y la suspensión se almacenó a -30 °C durante la noche. Se añadieron 250 ml de MTBE frío, la suspensión se agitó durante 1 min y se filtró a través de un filtro de vidrio y se lavó con 100 ml de MTBE frío. El producto se secó a vacío.

- 10 Rendimiento: 13,2 g (96%) 1e como un polvo blanco

MS: m/z 679,1 = $[M+10H]^{10+}$ (calculado = 679,1).

- 15 Para la síntesis del compuesto 1f, a una suspensión del compuesto 1e de la etapa previa, (8,22 g, 1,12 mmol) en 165 ml de 2-propanol, se añadieron boc-Lis(boc)-OSu (11,9 g, 26,8 mmol) y DIEA (9,34 ml, 53,6 mmol) a 45 °C y la mezcla se agitó durante 30 min. Posteriormente, se añadió *n*-propilamina (1,47 ml, 17,9 mmol). Después de 5 min la solución se enfrió a -18 °C durante 2 h, después se añadieron 165 ml de MTBE frío, la suspensión se agitó durante 1 min y se filtró a través de un filtro de vidrio. Posteriormente, la torta de filtración se lavó con 4x 200 ml de MTBE frío/iPrOH 4:1 y 1x 200 ml de MTBE frío. El producto se secó a vacío durante 16 h.

Rendimiento: 12,8 g, PM (90 %) de 1f en forma de un sólido amarillo pálido grumoso

MS: m/z 1505,3 = $[M+8H]^{8+}$ (calculado = 1505,4).

- 20 El reactivo de la cadena principal 1g se obtuvo disolviendo 4BrazosPEG5kDa(-LisLis₂Lis₄(boc)₈)₄ (1f) (15,5 g, 1,29 mmol) en 30 ml de MeOH y enfriando a 0 °C. Se añadió HCl 4 N en dioxano (120 ml, 480 mmol, enfriado a 0 °C) en el espacio de 3 min y se retiró el baño de hielo. Después de 20 min, se añadió HCl 3 N en metanol (200 ml, 600 mmol, enfriado a 0 °C) en el espacio de 15 min y la solución se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. La solución de producto precipitó con 480 ml de MTBE frío y se centrifugó a 3000 rpm durante 1 min. El precipitado se secó a vacío durante 1 h y se volvió a disolver en 90 ml de MeOH, precipitó con 240 ml de MTBE frío y la suspensión se centrifugó a 3000 rpm durante 1 min. El producto 1g se secó a vacío

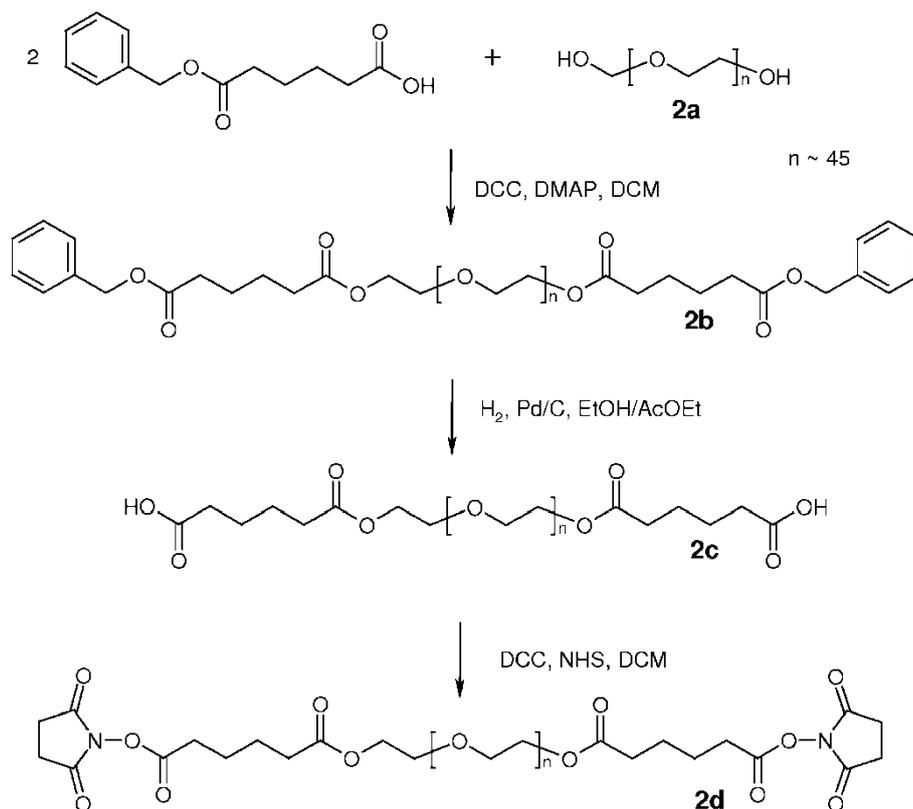
Rendimiento: 11,5 g (89 %) como copos amarillo pálido.

MS: m/z 1104,9 = $[M+8H]^{8+}$ (calculado = 1104,9).

Ejemplo 2

- 30 Síntesis del reactivo de reticulación 2d

El reactivo reticulador 2d se preparó a partir del éster monobencílico del ácido adípico (English, Arthur R. et al., *Journal of Medicinal Chemistry*, 1990, 33(1), 344-347) y PEG2000 de acuerdo con el siguiente esquema:



Una solución de PEG 2000 (2a) (11,0 g, 5,5 mmol) y semiéster de adipato bencílico (4,8 g, 20,6 mmol) en diclorometano (90,0 ml) se enfrió to 0°C. Se añadió diciclohexilcarbodiimida (4,47 g, 21,7 mmol) seguido de una cantidad catalítica de DMAP (5 mg) y la solución se agitó y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente durante la noche (12 h). El matraz se almacenó a +4°C durante 5 h. El sólido se filtró y el disolvente se eliminó completamente por destilación a vacío. El residuo se disolvió en 1000 ml de éter dietílico/acetato de etilo 1/1(v/v) y se almacenó a t.a. durante 2 horas, mientras se formaba una pequeña cantidad de un sólido en escamas. El sólido se separó por filtración a través de una almohadilla de Celite®. La solución se almacenó en un matraz herméticamente cerrado a -30°C en el congelador durante 12 h hasta completase la cristalización. El producto cristalino se filtró a través de una frita de vidrio y se lavó con éter dietílico enfriado (-30°C). La torta de filtración se secó a vacío. Rendimiento: 11,6 g (86 %) de 2b como un sólido incoloro. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

MS: m/z 813,1 = $[M+3H]^{3+}$ (calculado = 813,3)

En un recipiente de autoclave de vidrio de 500 ml se disolvió el PEG2000-bis-ácido adípico-bis-éster de bencilo 2b (13,3 g, 5,5 mmol) en acetato de etilo (180 ml) y se añadió paladio sobre carbón al 10% (0,4 g). La solución se hidrogenó a 6 bar, 40°C hasta que cesó el consumo de hidrógeno (5-12 h). El catalizador se separó por filtración a través de una almohadilla de Celite® y el disolvente se evaporó a vacío. Rendimiento: 12,3 g (cuantitativo) de 2c en forma de aceite amarillo. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

MS: m/z 753,1 = $[M+3H]^{3+}$ (calculado = 753,2)

Una solución de PEG2000-bis-semiéster de ácido adípico 2c (9,43 g, 4,18 mmol), *N*-hidroxisuccinimida (1,92 g, 16,7 mmol) y diciclohexilcarbodiimida (3,44 g, 16,7 mmol) en 75 ml de DCM (anhidro) se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y el precipitado se separó por filtración. El DCM se evaporó y el residuo se recrystalizó en THF.

Rendimiento: 8,73 g (85%) reactivo reticulador 2d como un sólido incoloro.

MS: m/z 817,8 = $[M+3H]^{3+}$ (calculado = 817,9 g/mol).

Ejemplo 3

Preparación de perlas de hidrogel (3) y (3a) que contiene grupos amino libres

Una solución de 275 mg del compuesto 1g y 866 mg del compuesto 2d en 14 ml de DMSO se añadió a una solución de 100 mg Arlacel P135 (Croda International Plc) en 60 ml heptano. La mezcla se agitó a 700 rpm con un agitador

metálico adaptado durante 10 min a 25 °C para formar una suspensión. Se añadió 1,0 ml de N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina para llevar a cabo la polimerización. Después de 2 h, la velocidad del agitador se redujo a 400 rpm y la mezcla se agitó durante 16 h adicionales. Se añadieron 1,5 ml de ácido acético y después tras 10 min se añadieron 50 ml de agua. Después de 5 min, el agitador se detuvo y la fase acuosa se drenó.

- 5 Para el fraccionamiento por tamaño de las perlas, la suspensión de agua-hidrogel se tamizó por vía húmeda en tamices de acero de malla de 75, 50, 40, 32 y 20 μm . Las fracciones de perlas que se retuvieron en los tamices de 32, 40, y 50 μm se juntaron y se lavaron 3 veces con agua, 10 veces con etanol y se secaron durante 16 h a 0,1 mbar para dar el producto 3 como un polvo blanco.

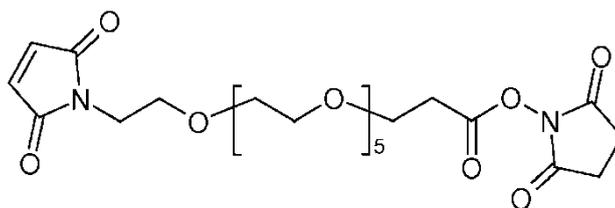
- 10 El producto 3a se preparó como se ha descrito para 3 excepto que se usaron 1200 mg de 1g, 3840 mg de 2d, 28,6 ml de DMSO, 425 mg de Arlcel P135, 100 ml de heptano y 4,3 ml de TMEDA. Para el tratamiento, se añadieron 6,6 ml de ácido acético y después tras 10 min se añadieron 50 ml de agua y 50 ml de solución acuosa saturada de cloruro sódico.

- 15 El contenido de grupos amino del hidrogel se determinó por conjugación de un fmoc-aminoácido con los grupos amino libres del hidrogel y posterior determinación de fmoc como describen Gude, M., J. Ryf, et al. (2002) *Letters in Peptide Science* 9(4): 203-206.

El contenido de grupos amino en 3 y 3a se determinó que era entre 0,11 y 0,16 mmol/g.

Ejemplo 4

Preparación de perlas de hidrogel funcionalizadas con maleimida (4) y (4a) y (4aa) y determinación de la sustitución de maleimida



- 20 Mal-PEG6-NHS

Una solución de 600 mg de Mal-PEG6-NHS (1,0 mmol) en 4,5 ml de acetonitrilo/agua 2/1 (v/v) se añadió a 200 mg de perlas de hidrogel secas 3. Se añadieron 500 μl de tampón de fosfato sódico (pH 7,4, 0,5 M) y la suspensión se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Las perlas 4 se lavaron cinco veces con acetonitrilo/agua 2/1 (v/v), metanol y acetonitrilo/agua/TFA 1/1/0,001 (v/v/v).

- 25 El producto 4a se sintetizó como se ha descrito antes, excepto que se usó 3a en lugar de 3.

- 30 Alternativamente, las perlas de hidrogel 3a se prelavaron con DMSO/DIEA 99/1 (v/v), se lavaron con DMSO y se incubaron durante 45 min con una solución de Mal-PEG6-NHS (2,0 eq respecto a la cantidad teórica de grupos amino en el hidrogel) en DMSO. Las perlas 4aa se lavaron dos veces con DMSO y tres veces con succinato a pH 3,0 (20 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,01%). La muestra se incubó en fosfato sódico a pH 6,0 (50 mM, etanolamina 50 mM, Tween-20 al 0,01%) durante 1 h a t.a. y se lavó cinco veces con succinato sódico a pH 3,0 (20 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,01 %).

- 35 Para la determinación del contenido de maleimida, una parte alícuota de las perlas de hidrogel 4, 4a, o 4aa, respectivamente, se liofilizó y se pesó. Otra parte alícuota de las perlas de hidrogel 4, 4a o 4aa, respectivamente, se hizo reaccionar con exceso de mercaptoetanol (en tampón de fosfato sódico 50 mM, 30 min a t.a.), y el consumo de mercaptoetanol se detectó por ensayo de Ellman (Ellman, G. L. et al., *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 7, 88-95). Se determinó que el contenido de maleimida estaba entre 0,11 y 0,13 mmol/g de hidrogel seco.

Ejemplo 5

Síntesis del reactivo conector 5d

El reactivo conector 5d se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema:

Na_2SO_4 y los productos volátiles se separaron a presión reducida. El producto 5b bruto se usó sin purificación adicional.

Rendimiento: 2,52 g (3,19 mmol).

MS: m/z 519,3 = $[\text{M}+\text{H}]^+$ (PM calculado = 518,8 g/mol).

5 Síntesis del reactivo conector intermedio 5c:

El producto 5b (780 mg, 0,98 mmol, ~65% de pureza) y NaCNBH_3 (128 mg, 1,97 mmol) se disolvieron en metanol anhidro (13 ml). Se añadió una solución de 2,4-dimetoxibenzaldehído (195 mg, 1,17 mmol) en DCM (2 ml), y la mezcla se agitó durante 2 h a t.a. Los disolventes se evaporaron a presión reducida y el producto bruto se disolvió en DCM y se lavó con solución saturada de NaCO_3 . La fase acuosa se extrajo tres veces con DCM, y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a presión reducida. El producto 5c se purificó por cromatografía ultrarrápida usando DCM y MeOH como eluyentes.

10 Rendimiento: 343 mg (0,512 mmol).

Rendimiento: 343 mg (0,512 mmol).

MS: m/z 669,37 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculado = 669,95).

Síntesis del reactivo conector 5d:

15 La resina TCP cargada con Fmoc-Aib (980 mg, ~0,9 mmol) se desprotegió con DMF/piperidina, se lavó con DMF (5 veces) y DCM (6 veces) y se secó a vacío. La resina se trató con una solución de cloroformiato de *p*-nitrofenilo (364 mg, 1,81 mmol) y colidina (398 μl , 3,0 mmol) en THF anhidro (6 ml) y se agitó durante 30 min. La solución de reactivo se separó por filtración y la resina se lavó con THF (5 veces) antes de añadir una solución de amina 5c (490 mg, 0,7 mmol) y DIEA (1,23 ml, 7,1 mmol) en THF anhidro (6 ml). Después de agitar durante 18 h a t.a., la solución de reactivo se separó por filtración y la resina se lavó con DCM (5 veces). El reactivo conector se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC. Las fracciones de producto se llevaron a pH 6 por adición de solución acuosa saturada de NaHCO_3 y se concentró a presión reducida. La suspensión resultante se repartió entre solución acuosa saturada de NaCl y DCM, y la capa acuosa se extrajo con DCM. Las fracciones orgánicas combinadas se concentraron hasta sequedad para dar el reactivo conector 5d.

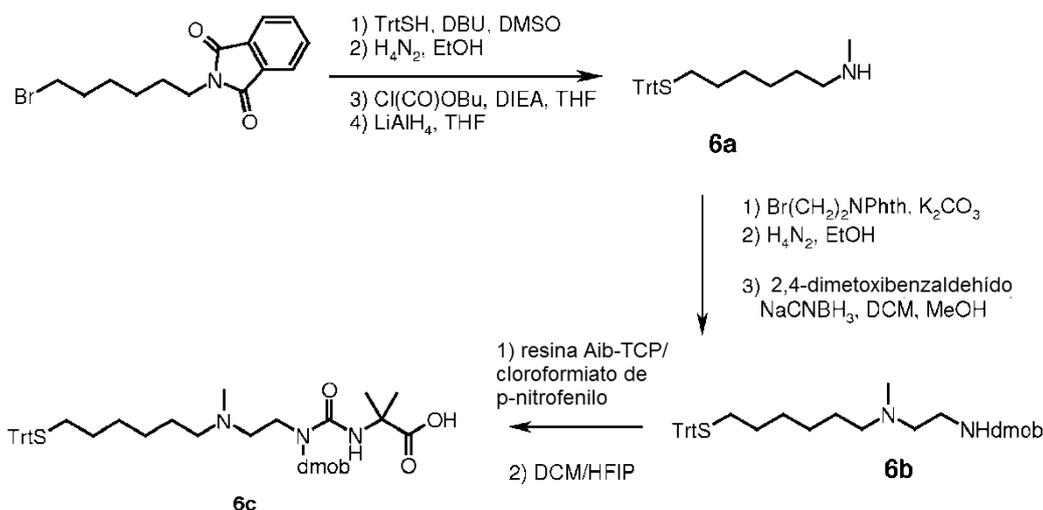
20 Rendimiento: 230 mg, (0,29 mmol).

MS m/z 798,41 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculado = 798,1).

Ejemplo 6

Síntesis del reactivo conector 6c

El reactivo conector 6c se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema:



30 Síntesis de la amina 6a:

Se suspendió trifenilmetanotiol (11,90 g, 43,08 mmol) en DMSO (40 ml). Se añadieron DBU (7,41 ml, 49,55 mmol) y 6-bromohexilftalimida (13,32 g, 42,94 mmol) y la mezcla se dejó que reaccionara durante aproximadamente 15 min. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo (700 ml) y HCl 0,1 M (200 ml). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml), y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO_3 sat. (80 ml) y salmuera (80 ml), se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron. El aceite amarillo bruto se recrystalizó en *n*-

35

heptano/acetato de etilo. La 6-(*S*-tritol)-mercaptohexilftalimida intermedia se obtuvo como un sólido blanco (13,3 g, 26,4 mmol, 62%).

- 5 La 6-(*S*-tritol)-mercaptohexilftalimida (14,27 g, 28,2 mmol) se suspendió en etanol (250 ml). Se añadió hidrato de hidrazina (3,45 ml, 70,5 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 2 h. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a vacío. Se añadió cloroformo (180 ml) al aceite residual y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla se filtró y el filtrado se extrajo con agua (60 ml) y salmuera (60 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró para dar la 6-(tritolmercapto)-hexilamina bruta (10,10 g, 26,87 mmol, 95%).

MS: m/z 376,22 = [M+H]⁺, (calculado = 376,20).

- 10 Se añadieron DIEA (1,41 ml, 8,11 mmol) y cloroformato de *n*-butilo (908 μ l, 7,14 mmol, en 1 ml de THF) a una solución enfriada (0 °C) de 6-(tritolmercapto)-hexilamina (2,44 g, 6,49 mmol) en THF (50 ml). Se añadió LiAlH₄ (1 M en THF, 9,74 ml, 9,47 mmol) después de 30 minutos y la mezcla se calentó a reflujo durante 90 min.

La adición de agua, NaOH ac. 3,75 M y condujo a la formación de un precipitado que se separó de la mezcla por filtración. El filtrado se concentró a vacío para obtener el producto 6a.

Rendimiento: 2,41 g (6,20 mmol).

- 15 MS: m/z 390,22 = [M+H]⁺, (calculado = 390,22).

Síntesis del reactivo conector intermedio 6b:

- 20 A una solución del producto 6a (2,1 g, 5,31 mmol) se añadió 2-bromoetilftalimida (1,96 g, 7,7 mmol) y K₂CO₃ (1,09 g, 7,9 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 6 h. Después de filtración y concentración, la mezcla bruta se repartió entre acetato de etilo y solución acuosa saturada de NaHCO₃. La (2-(*N*-metil-*N*-(6-tritolmercaptohexil)-amino)etil)ftalimida intermedia bruta se purificó por cromatografía ultrarrápida.

Rendimiento: 1,23 g (2,18 mmol).

MS: m/z : 563,27 = [M+H]⁺, (calculado = 563,27).

- 25 A una solución de (2-(*N*-metil-*N*-(6-tritolmercaptohexil)-amino)etil)ftalimida (672 mg, 1,19 mmol) en etanol (12 ml) se añadió hidrazina monohidrato (208 μ l, 4,17 mmol), y la mezcla se calentó a reflujo durante 1 h. La mezcla de reacción se filtró, se concentró y la *N*-(2-aminoetil)-*N*-metil-*N*-(6-tritolmercaptohexil)-amina se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 624 mg (0,944 mmol).

MS: m/z 433,27 = [M+H]⁺, (calculado = 433,26).

- 30 A una solución de *N*-(2-aminoetil)-*N*-metil-*N*-(6-tritolmercaptohexil)-amina (151 mg, 0,229 mmol) y NaCNBH₃ (30 mg, 0,463 mmol) en MeOH anhidro (6 ml) se añadió una solución de 2,4-dimetoxibenzaldehído en CH₂Cl₂ anhidro (0,6 μ l). Después de agitar durante 1 h a t.a., la mezcla de reacción se concentró, se volvió a disolver en 2 ml de agua/acetonitrilo 1/9 (v/v) y el producto 6b se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 177 mg (0,219 mmol).

MS: m/z 583,33 = [M+H]⁺, (calculado = 583,33).

Síntesis del reactivo conector 6c

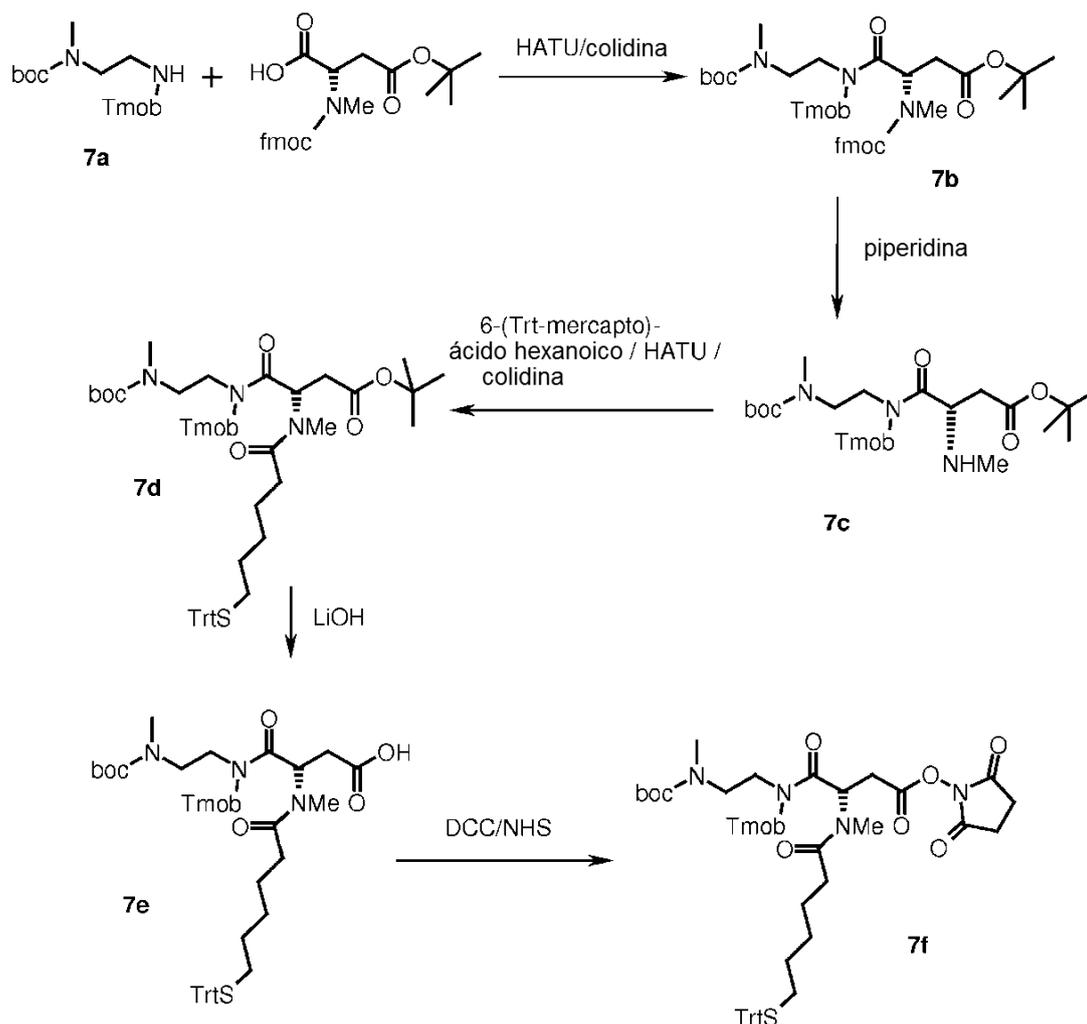
- 35 El reactivo conector 6c se preparó a partir de la resina cargada con Fmoc-Aib (704 mg, ~0,6 mmol) como se ha descrito para 5d, excepto que se usó la amina 6b (como sal de TFA, 430 mg, 0,53 mmol) en lugar de 5c.

Rendimiento: 285 mg, (0,330 mmol).

MS: m/z 712,37 = [M+H]⁺, (calculado = 712,37).

Ejemplo 7

- 40 Síntesis del reactivo conector 7f



- 5 A una solución enfriada (0 °C) de *N*-Metil-*N*-boc-etilendiamina (0,5 ml, 2,79 mmol) y NaCNBH₃ (140 mg, 2,23 mmol) en MeOH (10 ml) y ácido acético (0,5 ml) se añadió una solución de 2,4,6-trimetoxibenzaldehído (0,547 mg, 2,79 mmol) en EtOH (10 ml). La mezcla se agitó a t.a. durante 2 h, se acidificó con HCl 2 M (1 ml) y se neutralizó con solución acuosa saturada de Na₂CO₃ (50 ml). La evaporación de todos los productos volátiles, extracción con DCM de la suspensión acuosa resultante y concentración de las fracciones orgánicas de la *N*-Metil-*N*-boc-*N*'-tmob-etilendiamina (7a) en forma de un aceite bruto que se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 593 mg (1,52 mmol)

MS: m/z 377,35 = [M+Na]⁺, (calculado = 377,14).

- 10 Se disolvió *N*-Fmoc-*N*-Me-Asp(OtBu)-OH (225 mg, 0,529 mmol) en DMF (3 ml) y se añadieron el producto 7a (300 mg, 0,847 mmol), HATU (201 mg, 0,529 mmol), y colidina (0,48 ml, 3,70 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 2 h para dar el producto 7b. Para la desprotección de fmoc, se añadió piperidina (0,22 ml, 2,16 mmol) y se continuó agitando durante 1 h. Se añadió ácido acético (1 ml) y el producto 7c se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 285 mg (0,436 mmol como sal de TFA)

- 15 MS: m/z 562,54 = [M+Na]⁺, (calculado = 562,67).

- 20 Se disolvió ácido 6-tritilmercaptohexanoico (0,847 g, 2,17 mmol) en DMF anhidra (7 ml). Se añadieron HATU (0,825 g, 2,17 mmol), y colidina (0,8 ml, 6,1 mmol) y el producto 7c (0,78 g, 1,44 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 60 min a t.a., se acidificó con AcOH (1 ml) y se purificó por RP-HPLC. Las fracciones de producto se neutralizaron con solución acuosa saturada de NaHCO₃ y se concentraron. La fase acuosa que quedaba se extrajo con DCM y el producto 7d se aisló tras evaporación del disolvente.

Rendimiento: 1,4 g (94%)

MS: m/z 934,7 = [M+Na]⁺, (calculado = 934,5).

A una solución del producto 7d (1,40 mg, 1,53 mmol) en MeOH (12 ml) y H₂O (2 ml) se añadió LiOH (250 mg, 10,4 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 14 h a 70 °C. La mezcla se acidificó con AcOH (0,8 ml) y el producto 7e se purificó por RP-HPLC. Las fracciones de producto se neutralizaron con solución acuosa saturada de NaHCO₃ y se concentraron. La fase acuosa que quedaba se extrajo con DCM y el producto 7e se aisló tras evaporación del disolvente.

5

Rendimiento: 780 mg (60 %)

MS: m/z 878,8 = [M+Na]⁺, (calculado = 878,40).

A una solución del producto 7e (170 mg, 0,198 mmol) en DCM anhidro (4 ml) se añadieron DCC (123 mg, 0,59 mmol) y *N*-hidroxi-succinimida (114 mg, 0,99 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 1 h. La mezcla se filtró y el filtrado se acidificó con 0,5 ml de AcOH y el producto 7f se purificó por RP-HPLC. Las fracciones de producto se neutralizaron con solución acuosa saturada de NaHCO₃ y se concentraron. La fase acuosa que quedaba se extrajo con DCM y el producto 7f se aisló tras evaporación del disolvente.

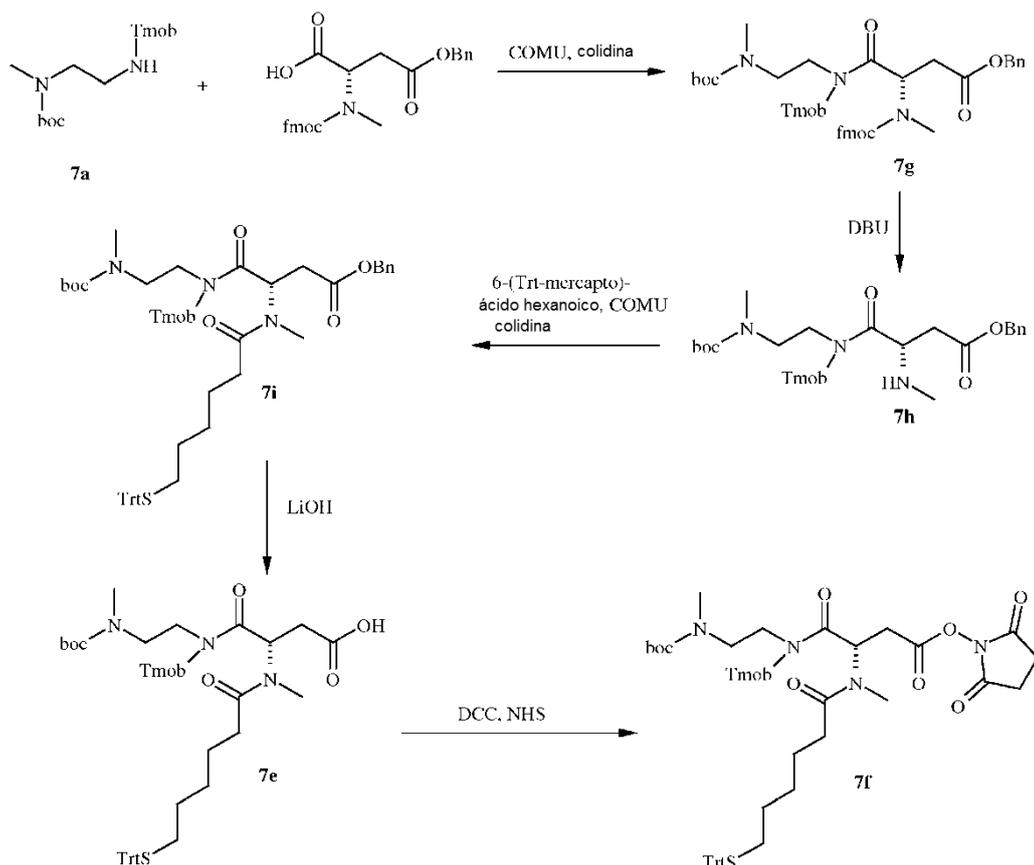
10

Rendimiento: 154 mg (0,161 mmol)

MS: m/z 953,4 = [M+H]⁺, (calculado = 953,43).

15 Alternativamente, el reactivo conector 7f se sintetizó de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Esquema de reacción alternativo:



A una solución de *N*-Metil-*N*-boc-etilendiamina (2 g, 11,48 mmol) y NaCNBH₃ (819 mg, 12,63 mmol) en MeOH (20 ml) se añadió 2,4,6-trimetoxibenzaldehído (2,08 mg, 10,61 mmol) en porciones. La mezcla se agitó a t.a. durante 90 min, se acidificó con HCl 3 M (4 ml) y se agitó 15 min adicionales. La mezcla de reacción se añadió a solución saturada de NaHCO₃ (200 ml) y se extrajo 5 x con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y los disolventes se evaporaron a vacío. La *N*-Metil-*N*-boc-*N'*-tmob-etilendiamina resultante (7a) se secó completamente con alto vacío y se usó en la siguiente etapa sin más purificación adicional.

20

Rendimiento: 3,76 g (11,48 mmol, 89 % de pureza, 7a : producto protegido con Tmob doble = 8 : 1)

25 MS: m/z 355,22 = [M+H]⁺, (calculado = 354,21).

A una solución del producto 7a (2 g, 5,65 mmol) en CH₂Cl₂ (24 ml) se añadieron COMU (4,84 g, 11,3 mmol), *N*-

5 Fmoc-N-Me-Asp(OBn)-OH (2,08 g, 4,52 mmol) y colidina (2,65 ml, 20,34 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a t.a., se diluyó con CH₂Cl₂ (250 ml) y se lavó 3 x con H₂SO₄ 0,1 M (100 ml) y 3 x con salmuera (100 ml). Las fases acuosas se volvieron a extraer con CH₂Cl₂ (100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el residuo se concentró hasta un volumen de 24 ml. El producto 7g se purificó usando cromatografía ultrarrápida.

Rendimiento: 5,31 g (148 %, 6,66 mmol)

MS: m/z 796,38 = [M+H]⁺, (calculado = 795,37).

10 A una solución del producto 7g [5,31 g, máx. 4,51 mmol respecto a N-Fmoc-N-Me-Asp(OBn)-OH] en THF (60 ml) se añadió DBU (1,8 ml, 3 % v/v). La solución se agitó durante 12 min a t.a., se diluyó con CH₂Cl₂ (400 ml) y se lavó 3 x con H₂SO₄ 0,1 M (150 ml) y 3 x con salmuera (150 ml). Las fases acuosas se volvieron a extraer con CH₂Cl₂ (100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se filtraron. El producto 7h se aisló tras evaporación del disolvente y se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

MS: m/z 574,31 = [M+H]⁺, (calculado = 573,30).

15 El producto 7h (5,31 g, 4,51 mmol, bruto) se disolvió en acetonitrilo (26 ml) y se añadieron COMU (3,87 g, 9,04 mmol), ácido 6-tritilmercaptohexanoico (2,12 g, 5,42 mmol) y colidina (2,35 ml, 18,08 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a t.a., se diluyó con CH₂Cl₂ (400 ml) y se lavó 3 x con H₂SO₄ 0,1 M (100 ml) y 3 x con salmuera (100 ml). Las fases acuosas se volvieron a extraer con CH₂Cl₂ (100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el producto 7i se aisló tras evaporación del disolvente. El producto 7i se purificó usando cromatografía ultrarrápida.

20 Rendimiento: 2,63 g (62 %, 94 % de pureza)

MS: m/z 856,41 = [M+H]⁺, (calculado = 855,41).

25 A una solución del producto 7i (2,63 g, 2,78 mmol) en *i*-PrOH (33 ml) y H₂O (11 ml) se añadió LiOH (267 mg, 11,12 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 70 min a t.a. La mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ (200 ml) y se lavó 3 x con H₂SO₄ 0,1 M (50 ml) y 3 x con salmuera (50 ml). Las fases acuosas se volvieron a extraer con CH₂Cl₂ (100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el producto 7e se aisló tras evaporación del disolvente. El producto 7j se purificó usando cromatografía ultrarrápida.

Rendimiento: 2,1 g (88 %)

MS: m/z 878,4 = [M+Na]⁺, (calculado = 878,40).

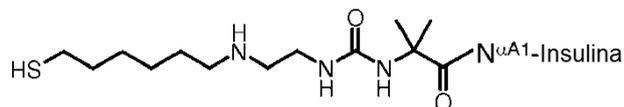
30 A una solución del producto 7e (170 mg, 0,198 mmol) en DCM anhidro (4 ml) se añadieron DCC (123 mg, 0,59 mmol), y una cantidad catalítica de DMAP. Después de 5 min, se añadió N-hidroxi-succinimida (114 mg, 0,99 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 1 h. La mezcla de reacción se filtró, el disolvente se separó a vacío y el residuo se recogió en acetonitrilo al 90% más TFA al 0,1% (3,4 ml). La mezcla bruta se purificó por RP-HPLC. Las fracciones de producto se neutralizaron con tampón de fosfato 0,5 M a pH 7,4 y se concentraron. La fase acuosa que quedaba se extrajo con DCM y el producto 7f se aisló tras evaporación del disolvente.

35 Rendimiento: 154 mg (81%)

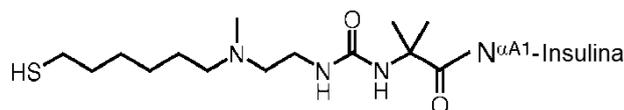
MS: m/z 953,4 = [M+H]⁺, (calculado = 953,43).

Ejemplo 8

Síntesis de los conjugados de N^αA¹-insulina-conector 8b y 8c



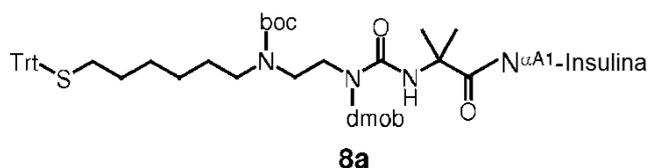
8b



8c

40

Síntesis del conjugado de insulina-conector protegido 8a



5 El reactivo conector 5d se disolvió en DCM (20 mg/mL) y se activó con resina de N-ciclohexil-carbodiimida-N'-metil-poliestireno (1,9 mmol/g, 10 eq.) durante 1 h. La solución del reactivo conector activado se añadió a una solución de insulina (1,2 eq.) y DIEA (3,5 eq.) en DMSO (100 mg insulina/ml), y la mezcla se agitó a t.a. durante 45 min. La solución se acidificó con ácido acético, el DCM se evaporó a presión reducida y el conjugado de N^{αA1}-insulina protegida conjugada-conector 8a se purificó por RP-HPLC.

El producto 8a liofilizado se trató con una mezcla de HFIP/TFA/agua/trietilsilano 90/10/2/2 (v/v/v/v) (2 ml/100 mg de 8a) durante 45 min a t.a. La mezcla de reacción se diluyó con agua, y los productos volátiles se separaron con una corriente de nitrógeno. El conjugado de N^{αA1}-insulina conjugada-conector 8b se purificó por RP-HPLC.

10 8b:

Rendimiento: 139 mg (0,023 mmol) a partir de 62 mg (0,078 mmol) del conector 5d

MS: m/z 1524,45 = [M+4H]⁴⁺ (calculado = 1524,75).

El conjugado de N^{αA1}-insulina conjugada-conector 8c se sintetizó como se ha descrito para 8b excepto que se usó 6c (72 mg, 0,101 mmol) en lugar del producto 5d.

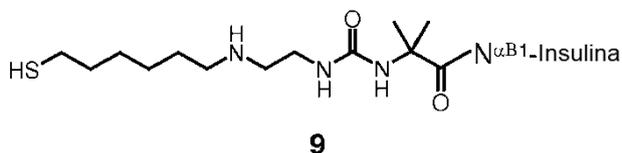
15 8c:

Rendimiento: 237 mg (0,039 mmol)

MS: m/z 1528,23 = [M+4H]⁴⁺ (calculado = 1528,28).

Ejemplo 9

Síntesis del conjugado de N^{αB1}-insulina-conector 9



20

La N^ε-boc-Gly^{A1}-N^ε-boc-Lis^{B29}-insulina protegida doble se preparó como se ha descrito previamente (J. Markussen, J. Halstrøm, F. C. Wiberg, L. Schäffer, *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 18814-18818).

25 El reactivo conector 5d (0,04 mmol) se disolvió en DCM (0,5 ml) y se activó con resina de N-ciclohexil-carbodiimida-N'-metil-poliestireno (0,205 mmol) a t.a. durante 2 h. La solución resultante del reactivo conector activado se añadió a una solución de insulina bis-boc-protegida (24 mg, 0,004mmol) y DIEA (5 μl, 0,0229 mmol) y se agitó a t.a. durante 1 h. La mezcla de reacción se acidificó con 100 μl de ácido acético y el conjugado de insulina-conector se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 5 mg (0,00075 mmol).

MS: m/z 1660,27 = [M+4H]⁴⁺ (calculado = 1660,43).

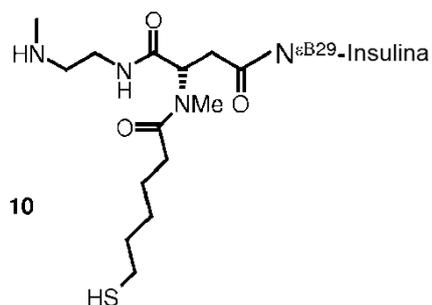
30 El conjugado de insulina-conector protegido liofilizado se trató con 1 ml de HFIP/TFA/agua/TES 90/10/2/2 (v/v/v/v) a t.a. durante 45 min. La mezcla de reacción se diluyó con 0,5 ml de agua y los productos volátiles se separaron con una corriente de nitrógeno. El conjugado de N^{αB1}-insulina conjugada-conector 9 se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 4 mg (0,0007 mmol)

MS: m/z 1524,46 = [M+4H]⁴⁺ (calculado = 1524,75).

35 Ejemplo 10

Síntesis del conjugado de N^{εB29}-insulina-conector 10



Se disolvió insulina (644 mg, 0,111 mmol) en 6,5 ml de DMSO. Se añadieron 3 ml de tampón de borato sódico 0,5 M enfriado (4 °C) (pH 8,5) y el producto 7f (70 mg, 0,073 mmol) en 2,5 ml de DMSO y la mezcla se agitó durante 5 min a t.a. Se añadieron 400 µl de AcOH y el conjugado de insulina protegida se purificó por RP HPLC.

5 Rendimiento: 172 mg (0,025 mmol).

MS: m/z 1662,27 = [M+4H]⁴⁺ (calculado = 1662,48).

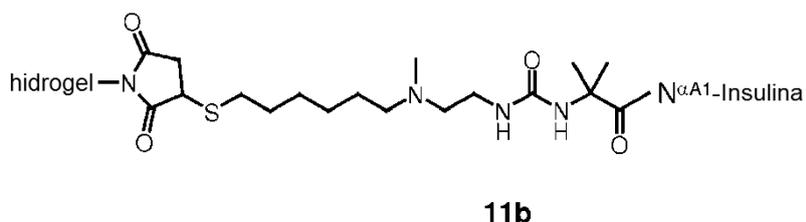
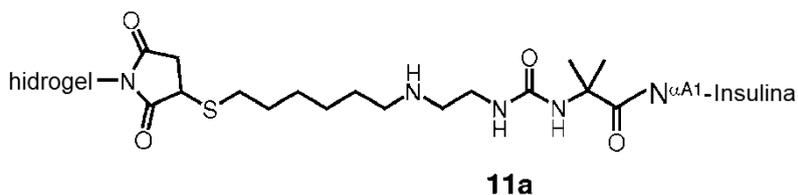
La eliminación de los grupos protectores se realizó por tratamiento de las fracciones de producto liofilizadas con 6 ml de HFIP/TFA/TES/agua 90/10/2/2 (v/v/v/v) durante 1h a t.a. El conjugado de N^{εB29}-insulina conjugada-conector 10 se purificó por RP HPLC.

10 Rendimiento: 143 mg (0,023 mmol).

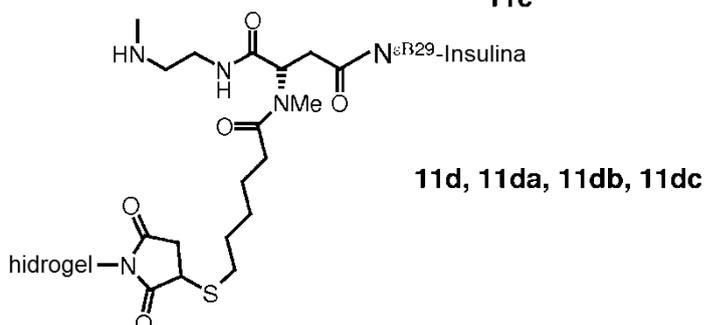
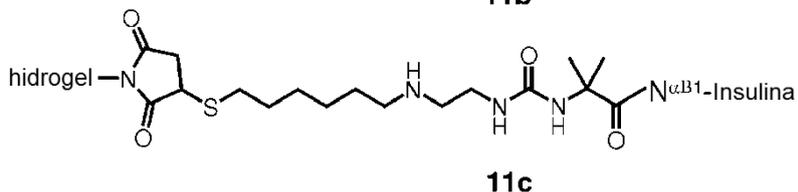
MS: m/z 1531,46 = [M+4H]⁴⁺ (calculado = 1531,71).

Ejemplo 11

Preparación insulina-conector-hidrogel 11a, 11b, 11c, 11d, 11da, 11db, y 11dc



15



Se cargó hidrogel funcionalizado con maleimida seco 4 (82 mg, 10,3 µmol de grupos maleimido) en una jeringa

equipada con una frita de vidrio. Se añadió una solución de insulina-conector-tiol 8b (27,8 mg, 4,6 μ mol) en 1,0 ml de acetonitrilo/agua/TFA 1/1/0,001 (v/v/v) y la suspensión se incubó durante 5 min a t.a. Se añadió tampón de acetato (0,4 ml, pH 4,8, 1,0 M) y la muestra se incubó a t.a. durante 1 h. El consumo del tipo se siguió por la prueba de Ellman. El hidrogel se lavó 10 veces con acetonitrilo/agua/TFA 1/0,43/0,001 (v/v/v) y 2 veces con sarcosina 1,0 M pH 7,4/acetoneitrilo/tampón de fosfato 0,5 M a pH 7,4/agua 1/1/0,2/0,25 (v/v/v/v). Finalmente, el hidrogel se suspendió en la solución de sarcosina y se incubó durante 2 h a t.a.

El insulina-conector-hidrogel 11a se lavó 10 veces con acetonitrilo/agua/TFA 1/1/0,001 (v/v/v) y se almacenó a 4°C.

El contenido de insulina se determinó por hidrólisis total de una parte alícuota del insulina-conector-hidrogel en condiciones reductoras a pH 12 y posterior cuantificación de la cadena A de insulina y la cadena B de insulina por RP-HPLC.

Carga de insulina de 11a: 175 mg insulina/g de insulina-conector-hidrogel

Cantidad de insulina en una suspensión de 11a en tampón de acetato sódico 10 mM pH 5, cloruro sódico 135 mM; 12 mg de insulina por 1 ml de suspensión de 11a.

Los productos 11b, 11c y 11d se prepararon como se ha descrito antes excepto que se usó 8c, 9, y 10, respectivamente, en lugar del producto 8b.

El producto 11da se preparó como se ha descrito antes excepto que se usó 10 y 4a en lugar del producto 8b y 4.

El producto 11db se preparó como sigue: Una suspensión de hidrogel funcionalizado con maleimida 4a en HCl a pH 2,5, Tween-20 al 0,01 % (5,0 ml, 119 μ mol de grupos maleimido) se cargó en una jeringa equipada con un filtro. Se añadió una solución de insulina-conector-tiol 10 (166 mg, 24,4 μ mol) en 8,0 ml de HCl a pH 2,5, Tween-20 al 0,01% y la suspensión se incubó durante 5 min a t.a. Se añadió tampón de succinato sódico (3,9 ml, pH 4,0, 150 mM; EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,01%) para dar pH 3,6 y la muestra se incubó a t.a. durante 90 min. El consumo de tiol se siguió por la prueba de Ellman. El hidrogel se lavó 10 veces con tampón de succinato sódico (pH 3,0, 50 mM; EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,01%) y 3 veces con tampón de succinato sódico (pH 3,0, 50 mM; EDTA 1 mM, 0 Tween-20 al 0,01%) que contenía acetil-cisteína 200 mM. Finalmente, el hidrogel se suspendió en el tampón que contenía acetil-cisteína y se incubó durante 1 h a t.a.

El insulina-conector-hidrogel 11db se lavó 10 veces con tampón de succinato (pH 3,0, 50 mM; EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,01%) y 8 veces con tampón de acetato sódico (pH 5,0, 10 mM; NaCl 130 mM, Tween-20 al 0,01%).

Carga de insulina de 11db: 6,12 mg de insulina por ml de suspensión de insulina-conector-hidrogel

El producto 11dc se preparó como sigue: Una suspensión de hidrogel funcionalizado con maleimida 4a en HCl a pH 2,5, Tween-20 al 0,01% (58,3 ml, 958 μ mol grupos maleimido) se añadió a un reactor de síntesis en fase sólida. Se añadió una solución de insulina-conector-tiol 10 (117 ml, 460 μ mol) en HCl 2,5, Tween-20 al 0,01% al producto 4a. La suspensión se incubó a t.a. durante 5 min. Se añadió tampón de succinato (4,8 ml, pH 4,0, 150 mM; EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,01%) para dar un pH de 3,6 y la suspensión se incubó a t.a. durante 90 min.

El consumo de tiol se siguió por la prueba de Ellman. El hidrogel se lavó 10 veces con tampón de succinato (pH 3,0, 50 mM; EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,01%) y 2 veces con tampón de succinato (pH 3,0, 50 mM; EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,01%) que contenía mercaptoetanol 10 mM. Finalmente, el hidrogel se suspendió en el tampón que contenía mercaptoetanol y se incubó durante 3 h a t.a.

El insulina-conector-hidrogel 11dc se lavó 10 veces con tampón de succinato (pH 3,0, 50 mM; EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,01%) y 6 veces con tampón de succinato/Tris (pH 5,0, 10 mM; trehalosa 85 g/l, Tween-20 al 0,01%).

Carga de insulina de 11dc: 18,7 mg de insulina por ml de suspensión de insulina-conector-hidrogel

Alternativamente, se pueden usar micropartículas de hidrogel derivatizado con maleimida 4aa en lugar del producto 4a.

Ejemplo 12

Cinética de liberación in vitro

Los insulina-conector-hidrogel 11a, 11b, 11c y 11d, respectivamente, (insulina-conector-hidrogel que contiene aproximadamente 1 mg de insulina) se suspendieron en 2 ml de fosfato sódico 60 mM, EDTA 3 mM, Tween-20 al 0,01%, pH 7,4, y se incubaron a 37 °C. Las suspensiones se centrifugaron a intervalos de tiempo y el líquido sobrenadante se analizó por RP-HPLC a 215 nm y ESI-MS. Las señales de UV que se correlacionaban con la insulina liberada se integraron y se representaron gráficamente frente al tiempo de incubación.

Se aplicó el software de ajuste de la curva para calcular el tiempo medio de liberación correspondiente.

Las semividas in vitro de 16 d, 10 d, 30 d, y 14 d se determinaron para los productos 11a, 11b, 11c y 11d, respectivamente.

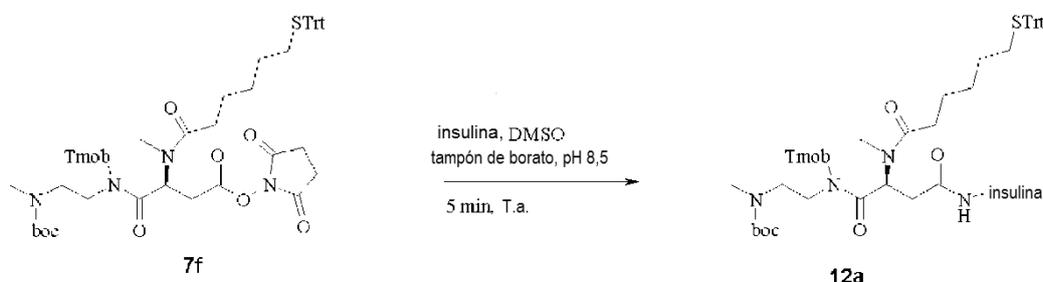
5 Alternativamente, el insulina-conector-hidrogel 11db se transfirió a jeringas equipadas con filtro, suspendido en 6 ml de fosfato sódico 60 mM, EDTA 3 mM, Tween-20 al 0,01%, pH 7,4, y se incubó a 37 °C. En tiempos de medición definidos, el líquidos sobrenadante se intercambiò y se cuantificò la insulina liberada por RP-HPLC a 215 nm. La cantidad de insulina liberada se representò gráficamente frente al tiempo de incubación. Se aplicò el software de ajuste de la curva y se calculò para 11 db el tiempo medio in vitro de 15 d.

10 Alternativamente, el insulina-conector-hidrogel 11db se cargò en una columna cromatogràfica y se puso en un incubador a temperatura controlada (37°C). Se bombeò fosfato sódico (pH 7,4, 60 mM; EDTA 3 mM, Tween-20 al 0,01%) a través de la columna con un flujo constante de 0,25 ml/h (nominal) y se recogió fuera del incubador. En tiempo de medición definidos la solución se analizò por RP-HPLC a 215 nm. La cantidad de insulina liberada se representò gráficamente frente al tiempo de incubación. Se aplicò el software de ajuste de la curva y se calculò para 11 db el tiempo medio in vitro de 13 d.

Ejemplo 13

15 Síntesis de un conjugado de LisB29-conector de insulina (12a) y un conjugado de LisB28-conector de insulina lispro (12b):

Síntesis del conjugado de LisB29-conector de insulina (12a)



20 Se disolvieron 1,2 g (0,206 mmol, 0,85 eq) de insulina en DMSO a t.a. Después de 30 min la solución se enfrió a 0 °C mientras se añadía tampón de borato (0,5 M, pH 8,5, 21,6 ml) a lo largo de un periodo de 4,40 min. La temperatura de la solución se mantuvo entre 25 y 28 °C. Se añadió constante en el tiempo una solución de 228 mg (0,239 mmol, 1 eq) del producto 7f se disolvió en 40 ml de DMSO a lo largo de un periodo de 3 min. Se retirò el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó durante 5 min a t.a. La reacción se inactivò por adición de 70 ml de MeCN/H₂O (1:1, TFA al 0,1%) y 400 µl de AcOH. El producto 12a se purificò por RP HPLC (disolvente A: H₂O con TFA al 0,1%, disolvente B: MeCN con TFA al 0,1%, gradiente: 30-80% de B a lo largo de 14 min, flujo: 40 ml/min).

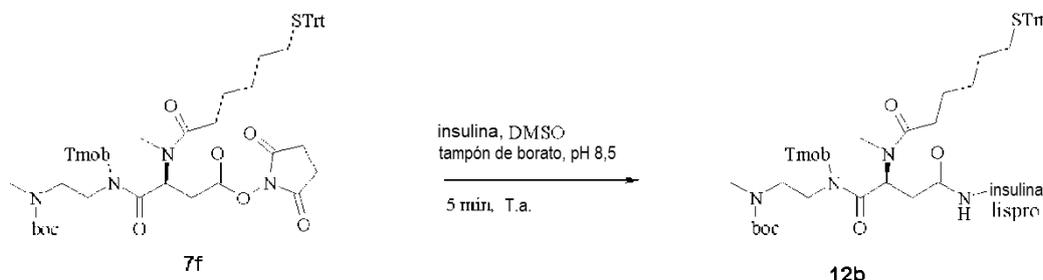
25

Regioselectividad de acuerdo con el análisis por UPLC (antes de la purificación por RP-HPLC): 0,70% de 7f unido a la GlyA1 de la insulina y 76,2% de 7f unido a la LisB29 de la insulina (véase la Fig. 1a).

Rendimiento: 862 mg (sal de TFA, 60%).

MS $[M+H]_{1/4}^+ = 1662,25 \text{ g/mol}$ ($(MW+H)_{1/4}$ calculado = 1662,35 g/mol).

30 Síntesis del conjugado de LisB28-conector de insulina lispro (12b)



35 Se disolvieron 0,347 g (0,059 mmol, 0,85 eq) de insulina lispro en 6 ml DMSO a t.a. Después de 30 min la solución se enfrió a 0°C mientras se añadía tampón de borato (0,5 M, pH 8,5, 5,64 ml) a lo largo de un periodo de 1,40 min. La temperatura de la solución se mantuvo entre 25 y 30 °C. Se añadió constante en el tiempo una solución de 67 mg (0,070 mmol, 1 eq) de 7f disuelto en 8 ml DMSO a lo largo de un periodo de 2 min. Se retirò el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó durante 5 min a t.a. La reacción se inactivò por adición de 20 ml de MeCN/H₂O (1:1, TFA al 0,1%) y 1 ml de AcOH. El producto 12a se purificò por RP HPLC (disolvente A: H₂O con TFA al 0,1%,

disolvente B: MeCN con TFA al 0,1%, gradiente: 30-80% de B a lo largo de 14 min, flujo: 40 ml/min).

Regioselectividad de acuerdo con el análisis por UPLC (antes de la purificación por RP-HPLC): 1,3% del producto era 7f unido a la GlyA1 de la insulina lispro y 76,7% del producto era 7f unido a la LisB29 de la insulina lispro (véase la Fig. 1b).

5 Rendimiento: 305 mg (sal de TFA, 72%).

MS $[M+H]_{1/4}^+ = 1662,25$ g/mol ($(MW+H)_{1/4}$ calculado = 1662,35 g/mol).

Ejemplo 14

Estudio farmacocinético en rata

10 La farmacocinética del producto 11a se determinó midiendo la concentración de insulina en el plasma después de aplicación subcutánea de una sola dosis en ratas.

15 Se usó un grupo que consistía en 10 ratas macho Wistar (200-250 g) para estudiar los niveles de insulina plasmática a lo largo de un periodo de 14 días. Cada uno de los animales recibió una sola inyección subcutánea de 500 μ l de suspensión de 11a en tampón de acetato a pH 5, que contenía 6 mg de insulina (12 mg de insulina/ml). Se extrajeron 200 μ l de sangre por animal y tiempo de medición, por vía sublingual para obtener 100 μ l de plasma con heparina-Li. Se recogieron muestras antes de la aplicación y después 4 h, 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11 y 14 días después de inyección. Las muestras de plasma se congelaron en el espacio de 15 min después de la extracción de sangre y se almacenaron a -80°C hasta que se ensayaron.

20 Las concentraciones de insulina plasmática se midieron usando el kit de ELISA de insulina ultrasensible (Mercodia) siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras de plasma se diluyeron en tampón de ELISA (1:5 y 1:10 con calibrador 0) antes de la medición. Las concentraciones de insulina se calcularon a partir de la curva de calibración que se generó midiendo referencias de insulina por duplicado y ajustando los valores usando regresión lineal. La concentración de insulina se definió como la media de dos series de dilución independientes corregidas por el respectivo factor de dilución y representadas gráficamente frente al tiempo. Las concentraciones de insulina plasmática promediadas para cada punto de tiempo se obtuvieron calculando la media de todos los animales usados como se muestra en la figura 2.

25 Se observó una liberación sostenida y sin aumento brusco de insulina a lo largo de 14 días.

Ejemplo 15:

Estudio farmacocinético en rata

30 La farmacocinética del producto 11da se determinó midiendo la concentración de insulina en el plasma después de un periodo de 13 días en ratas sanas.

35 8 ratas Wistar (aproximadamente 250 g de peso corporal) recibieron una sola inyección subcutánea de 500 μ l del artículo de ensayo 11da en tampón de acetato a pH 5, que contenía 3 mg de insulina (12 mg de insulina/ml). Se extrajeron 200 μ l de sangre por animal y por tiempo de medición, de la vena de la cola, para obtener 100 μ l de plasma con heparina-Li. Se recogieron muestras 1 día antes y 4 h, 1 d, 2 d, 3 d, 6 d, 7 d, 8 d, 10 d y 13 días después de administración del artículo. Las muestras de plasma se congelaron y se almacenaron a -80°C hasta que se ensayaron. El contenido de insulina de las muestras de plasma se midió usando un kit de ELISA de insulina ultrasensible (DRG Instruments GmbH, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron blancos (calibrador 0) en la curva de calibración y se restaron de los valores de muestra y la curva de calibración se ajustó usando una ecuación polinómica de 3^{er} orden. Antes del análisis las muestras de plasma se agitaron con vórtice y se diluyeron en tubos de reacción (1:5 y 1:10 con calibrador 0). Para el análisis se midió la DO a 450 nm con un lector de placa de microvaloración (Tecan Ultra) sin corrección de longitud de onda de referencia. Los resultados del contenido de insulina en el plasma hasta el día 13 para todos los animales en investigación se muestran en la figura 3.

45 Después de una sola inyección subcutánea de 500 μ l del producto 11d que contenía 3 mg de insulina, el nivel de insulina plasmática medio subió a un máximo de aproximadamente 500 pM el día 1. Como se esperaba, la concentración de insulina plasmática posteriormente disminuyó continuamente en 2 semanas. La relación de pico a valle de los niveles de insulina plasmática en la primera semana del estudio era aproximadamente 1,7.

Ejemplo 16:

Estudio farmacocinético y farmacodinámico en ratas

50 La cantidad y la bioactividad de la insulina liberada se investigaron analizando la concentración de insulina en el plasma y el efecto de disminución de glucosa en la sangre en un estudio farmacocinético/farmacodinámico de exploración usando ratas Sprague-Dawley (SD) diabéticas.

Para este propósito se indujo diabetes en 8 ratas con esteptozotocina (STZ) y todos los animales con niveles de glucosa en la sangre por encima de 350 mg/dl el día 0 se incluyeron en este estudio. 7 de 8 ratas SD se volvieron diabéticas y recibieron una sola inyección subcutánea de 500 µl del artículo de ensayo 11da en tampón de acetato a pH 5, que contenía 6,4 mg de insulina. Se extrajeron 200 µl de sangre por animal y por tiempo de medición, de la vena de la cola, para obtener 100 µl de plasma con heparina-Li. Se recogieron muestras 4 días antes y 2 h, 1 d, 2 d, 3 d, 6 d, 7 d, 8 d, 10 d y 13 días después de administración del artículo de ensayo. Las muestras de plasma se congelaron y se almacenaron a -80°C hasta que se ensayaron. La glucosa en la sangre se midió con un dispositivo AccuChek Comfort a partir de la vena de la cola 3 veces antes de inyección y 2 h, 1 d, 2 d, 3 d, 6 d, 7 d, 8 d, 10 d, 13 d, 15 d, 17 d, 20 d, 22 d y 24 d después de la administración del artículo de ensayo. El contenido de insulina de las muestras de plasma se midió usando un kit de ELISA de insulina humana (DRG Instruments GmbH, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron blancos (calibrador 0) en la curva de calibración y se restaron de los valores de muestra y la curva de calibración se ajustó usando una ecuación polinómica de 3^{er} orden. Antes del análisis las muestras de plasma se agitaron con vórtice y se diluyeron en tubos de reacción (1:5 y 1:10 con calibrador 0). Para el análisis se midió la DO a 450 nm con un lector de placa de microvaloración (Tecan Ultra) sin corrección de longitud de onda de referencia. El nivel de insulina en el plasma se vigiló a lo largo de 2 semanas y el nivel de glucosa en la sangre a lo largo de 3 semanas como se muestra en la figura 4.

Después de una sola inyección subcutánea de hidrogel de insulina 11da el nivel de glucosa en la sangre había disminuido eficazmente a lo largo de un periodo de 10 días con valores por debajo de 100 mg/dl sin ningún síntoma de hipoglucemia. Debido a la mayor dosificación de 6,4 mg de insulina por animal, la concentración de insulina plasmática máxima era aproximadamente 800 pM el día 1 y disminuyó continuamente a lo largo de 2 semanas a aproximadamente 300 pM. Simultáneamente los valores de glucosa en la sangre empiezan a subir después de 10 días y alcanzan niveles predosis después de 3 semanas.

Ejemplo 17:

Estudio farmacocinético a lo largo de 24 horas (estudio de aumento brusco) en ratas

Con el fin de probar que la insulina es liberada del insulina-conector-hidrogel sin un aumento brusco, se siguió la concentración de insulina en el plasma a lo largo de un periodo de 24 horas en ratas sanas.

8 ratas Wistar (200-250 g de peso corporal) se dividieron en 2 grupos y recibieron una sola inyección subcutánea de 2 ml del artículo de ensayo 11db en tampón de acetato a pH 5 por kg de peso corporal. El artículo de ensayo tenía una concentración de 4 mg /ml de insulina, de modo que cada animal recibía 8 mg de insulina por kg de peso corporal. Se extrajeron 200 µl de sangre por animal y tiempo de medición, de la vena de la cola, para obtener aproximadamente 100 µl de plasma con heparina-Li. Las muestras del grupo A se recogieron antes de la dosis y 5 min, 30 min, 2 h, 4 h y 8 h después de aplicación del artículo de ensayo, y el grupo B antes de la dosis y 15 min, 1 h, 3 h, 6 h y 24 h después de aplicación del artículo de ensayo. Las muestras de plasma se congelaron y se almacenaron a -80°C hasta que se ensayaron. El contenido de insulina de las muestras de plasma se midió usando un kit de ELISA ultrasensible de insulina ultrasensible (DRG Instruments GmbH, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron blancos (calibrador 0) en la curva de calibración y se restaron de los valores de muestra y la curva de calibración se ajustó usando una ecuación polinómica de 3^{er} orden. Antes del análisis las muestras de plasma se agitaron con vórtice y se diluyeron en tubos de reacción (1:5 y 1:10 con calibrador 0). Para el análisis se midió la DO a 450 nm con un lector de placa de microvaloración (Tecan Ultra) sin corrección de longitud de onda de referencia. Los resultados se muestran en la figura 5 e indican claramente que la insulina es liberada sin ningún aumento brusco.

Ejemplo 18:

Estudio farmacocinético y farmacodinámico de dosis múltiples en ratas

Se determinó la farmacocinética y farmacodinámica después de 3 dosis semanales del producto 11da midiendo las concentraciones de insulina en el plasma y los niveles de glucosa en la sangre a lo largo de un periodo de 4 semanas en ratas diabéticas.

Se usaron 8 ratas Sprague-Dawley con un peso corporal medio de 239 g. Se indujo diabetes con esteptozotocina (STZ) y todos los animales con niveles de glucosa en la sangre por encima de 350 mg/dl el día 0 (el día de inyección del artículo de ensayo) se incluyeron en este estudio. 8 de 8 animales que recibieron tratamiento de STZ se volvieron diabéticas y recibieron 3 inyecciones subcutáneas semanales los días 0, 7 y 14 de 2 ml del artículo de ensayo 11da en tampón de acetato a pH 5 por kg de peso corporal. Con una concentración de insulina del artículo de ensayo de 4 mg/ml, la dosis aplicada era 8 mg de insulina por kg de peso corporal. Se extrajeron 200 µl de sangre por animal y tiempo de medición, de la vena de la cola, para obtener aproximadamente 100 µl de plasma con heparina-Li. Se recogieron muestras 3 días antes y hasta 28 días después de administración del artículo de ensayo. Las muestras de plasma se congelaron y se almacenaron a -80°C hasta que se ensayaron. La glucosa en la sangre se midió con un dispositivo AccuChek Comfort a partir de la vena de la cola 3 veces antes de inyección y hasta 30 días después de inyección. El contenido de insulina de las muestras de plasma se midió usando un kit de ELISA de insulina humana (DRG Instruments GmbH, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron

blancos (calibrador 0) en la curva de calibración y se restaron de los valores de muestra y la curva de calibración se ajustó usando una ecuación polinómica de 3^{er} orden. Antes del análisis las muestras de plasma se agitaron con vórtice y se diluyeron en tubos de reacción (1:5 y 1:10 con calibrador 0). Para el análisis se midió la DO a 450 nm con un lector de placa de microvaloración (Tecan Ultra) sin corrección de longitud de onda de referencia. El nivel de insulina en el plasma y el nivel de glucosa en la sangre se vigilaron a lo largo de un periodo de 4 semanas y ambos se muestra en la figura 6.

La forma de las curvas indica que la insulina liberada era bioactiva disminuyendo de forma constante el nivel de glucosa en la sangre a valores de aproximadamente 100 mg/dl después de la 3^a inyección que permaneció bajo durante aproximadamente una semana. Al mismo tiempo la concentración máxima de insulina aumentó de forma constante de 200 pM después de la primera dosis y a 300 pM después de la segunda dosis a 400 pM después de la tercera dosis y posterior disminución de nuevo en 2 semanas a valores inferiores a 100 pM.

Ejemplo 19:

Estudio farmacocinético en rata

La farmacocinética del producto 11dc se determinó midiendo las concentraciones de insulina en el plasma a lo largo de un periodo de 13 días en ratas sanas.

8 ratas Wistar (aproximadamente 230 g de peso corporal) recibieron una sola inyección subcutánea de 2 ml/kg del artículo de ensayo 11dc en tampón de succinato a pH 5 (succinato/tris 10 mM, trehalosa 85 g/l, Tween-20 al 0,01%, pH 5,0), que contenía 3 mg de insulina (dosis 12 mg/kg). Se extrajeron 200 μ l de sangre por animal y por tiempo de medición, de la vena de la cola, para obtener aproximadamente 100 μ l de plasma con heparina-Li. Se recogieron muestras 4 días antes y 0,3 h (4 animales), 1 h (4 animales), 2 h (4 animales), 4 h (4 animales), 1 d, 2 d, 3 d, 6 d, 8 d, 10 d y 13 d después de administración del artículo de ensayo. Las muestras de plasma se congelaron y se almacenaron a -80°C hasta que se ensayaron. El contenido de insulina de las muestras de plasma se midió usando un kit de ELISA ultrasensible de insulina humana (DRG Instruments GmbH, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron blancos (calibrador 0) en la curva de calibración y se restaron de los valores de muestra y la curva de calibración se ajustó usando una ecuación polinómica de 3^{er} orden. Antes del análisis las muestras de plasma se agitaron con vórtice y se diluyeron en tubos de reacción (1:5 y 1:10 con calibrador 0). Para el análisis se midió la DO a 450 nm con un lector de placa de microvaloración (Tecan Ultra) sin corrección de longitud de onda de referencia. Los resultados del contenido de insulina en el plasma hasta el día 13 para todos los animales en investigación se muestran en la figura 7.

Después de una sola inyección subcutánea de 12 mg/kg del producto 11dc, el nivel de insulina plasmática medio subió a un máximo de aproximadamente 500 pM el día 1. Como se esperaba, la concentración de insulina en el plasma posteriormente disminuyó continuamente en 2 semanas. La relación de pico a valle de los niveles de insulina plasmática en la primera semana del estudio era aproximadamente 1,4.

Ejemplo 20

Liberación de insulina en tiempo real y degradación del hidrogel a pH 7,4

El Insulina-conector hidrogel 11a (730 μ l, que contenía 3,19 mg de insulina) en tampón de acetato a pH 5,0 (10 mM, NaCl 130 mM, Tween-20 al 0,01 % (p/v)) se cargó en un tubo de preparación de muestra, se lavó 3x con tampón de liberación a pH 7,4 (fosfato sódico 60 mM, EDTA 3 mM, Tween-20 al 0,01 % (p/v)) y se completó hasta 1,00 ml. Una parte alícuota de la suspensión (0,5 ml, 1,59 mg de insulina) se cargó en una columna de cromatografía y se puso en un incubador de temperatura controlada (37°C). Se bombeó tampón de liberación (pH 7,4) a través de la columna con un flujo constante de 0,25 ml/h (nominal) y se recogió fuera del incubador. En tiempos de medición definidos la solución se analizó por RP-HPLC (215 nm). La cantidad de insulina liberada se representó gráficamente frente al tiempo de incubación y se aplicó el software de ajuste de la curva para calcular el correspondiente tiempo medio de la liberación. Se determinó un tiempo medio de 9,4 d para la liberación de insulina.

Después de 39 d de incubación a 37°C, la suspensión de hidrogel se transfirió a un tubo de preparación de muestra, el hidrogel residual se arrastró por lavado de la columna con tampón de liberación a pH 7,4 y la muestra se completó hasta 1,0 ml. Se transfirieron dos partes alícuotas (300 μ l cada una) a tubos de preparación de muestra estériles, se completaron hasta 1,5 ml y se incubaron a 37°C. Se tomaron muestras a intervalos de tiempo y se analizaron por cromatografía por exclusión de tamaños. Las señales de UV que correspondían a los productos de degradación solubles en agua liberados del hidrogel que comprendían uno o más restos de cadena principal (que correspondían a grupos funcionales reactivos) se integraron y se representaron gráficamente frente al tiempo de incubación, véase la figura 8.

Ejemplo 21

Inyectabilidad del profármaco de insulina-conector-hidrogel

Se usaron 5 ml del profármaco de insulina-conector-hidrogel 11dc (distribución del tamaño de perlas 32-75 μ m, 18

5 mg de insulina/ml) en ácido succínico/tris pH 5,0 (10 mM, manitol 40 g/l; trehalosa dihidrato 10 g/l; TWEEN-20 al 0,05%). La suspensión de profármaco de insulina-conector-hidrogeles se cargó en una jeringa de 1 ml (longitud 57 mm) mediante una aguja 20 G. La aguja 20 G se sustituyó por una aguja 30 G y se puso en el montaje de jeringa (Aqua Computer GmbH&Co. KG) y la medición comenzó con una velocidad del pistón de 172 mm/min (igual a 50 μ l/s) (Soporte de ensayo de fuerza: Multitest 1-d, Software de recogida de datos: EvaluatEmperor Lite, Versión 1,16-015, Forge Gauge: BFG 200 N (todos Mecmesin Ltd., Reino Unido). Se llevaron a cabo experimentos con velocidades del pistón crecientes mostradas en la siguiente tabla con una nueva muestra de profármaco de insulina-conector-hidrogeles. Se llevaron a cabo experimentos con agua y etilenglicol en concordancia. Para todos los experimentos se usó la misma aguja 30G. En la figura 9 se muestra la fuerza frente al flujo usando una aguja 30G.

Flujo / (s/ml)	Flujo / (μ l/s)	Velocidad del pistón / (mm/min)	Fuerza / N (agua)	Fuerza / N 11dc	Fuerza / N (etilenglicol)
6	167	573	13	36	83
8	125	430	10	29	62
10	100	344	7	24	51
15	67	229	4	22	35
20	50	172	3	17	27

10

Abreviaturas:

	AcOH	ácido acético
	AcOEt	acetato de etilo
	Aib	ácido 2-aminoisobutírico
15	Bn	bencilo
	Boc	t-butiloxicarbonilo
	COMU	hexafluorofosfato de (1-Ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenamino)dimetilamino-morfolino-carbenio
	DBU	1,3-diazabicyclo[5.4.0]undeceno
	DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
20	DCM	diclorometano
	DIEA	diisopropiletilamina
	DMAP	dimetilamino-piridina
	DMF	N,N-dimetilformamida
	Dmob	2,4-dimetoxibencilo
25	DMSO	dimetilsulfóxido
	EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
	EDTA	ácido etilendiaminatetraacético
	eq	equivalente estequiométrico
30	ESI-MS	espectrometría de masas con ionización por electropulverización
	EtOH	etanol
	Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
	HATU	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
	HFIP	hexafluoroisopropanol
	HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
35	HOBt	N-hidroxibenzotriazol
	iPrOH	2-propanol
	LCMS	espectrometría de masas-cromatografía líquida acolada
	Mal	3-maleimido-propilo
40	Mal-PEG6-NHS	éster de NHS del ácido N-(3-maleimidopropil)-21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-heneicosanoico
	Me	metilo
	MeCN	acetonitrilo
	MeOH	metanol
	Mmt	4-metoxitritilo
45	MS	espectro de masas/espectrometría de masas
	MTBE	éter de metilo y <i>terc</i> -butilo
	MW	masa molecular
	n.d.	no determinado
	NHS	N-hidroxi-succinimida
50	OD	densidad óptica
	OBu	butiloxi
	OtBu	<i>terc</i> -butiloxi
	PEG	poli(etilenglicol)
	Phth	ftal-
55	PIBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio
	RP-HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa
	rpm	ciclos por minuto

	RT	temperatura ambiente
	SEC	cromatografía por exclusión de tamaños
	Su	succinimidilo
	TCP	resina de cloruro de 2-clorotritilo
5	TES	trietilsilano
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
	TMEDA	N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamina
	Tmob	2,4,6-trimetoxibencilo
10	Trt	trifenilmetilo, tritilo
	UPLC	cromatografía líquida de ultra rendimiento
	UV	ultravioleta
	VIS	visible

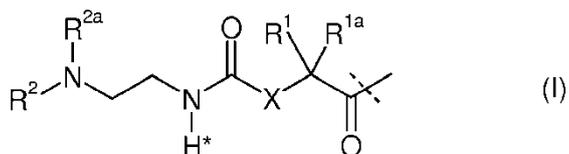
REIVINDICACIONES

5 1.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina en una concentración de al menos 10 mg/ml, caracterizada por tener un perfil farmacocinético in vivo sustancialmente sin aumento brusco del compuesto de insulina, y en donde el compuesto de insulina está completamente contenido en un depósito, y en donde el compuesto de insulina está unido covalentemente en el depósito,

en donde el compuesto de insulina es un profármaco o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, que es un conjugado de insulina-conector D-L, en donde

D representa el resto de insulina; y

-L es un resto conector biológicamente no activo -L1 representado por la fórmula (I),



10 en donde la línea de trazos indica la unión a uno de los grupos amino de la insulina por formación de un enlace amida;

X es C(R3R3a); o N(R3);

R1a, R3a se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, NH(R2b), N(R2b)C(O)R4 y alquilo C1-4;

15 R1, R2 R2a, R2b, R3, R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C1-4,

en donde L1 está sustituido con un L2-Z y opcionalmente sustituido adicionalmente, con la condición de que el hidrógeno marcado con un asterisco en la fórmula (I) no se sustituya por ningún sustituyente, y en donde

L2 es un enlace simple químico o un espaciador; y

Z es un hidrogel.

20 2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina según la reivindicación 1, en una concentración de al menos 11 mg/ml para administrar en una sola dosis de al menos 10 mg de compuesto de insulina.

3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la concentración del compuesto de insulina es al menos 11 mg/ml, tal como de 11 mg/ml a 35 mg/ml.

25 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizada porque presenta una relación de pico a valle menor de 2, tal como menor de 1,75, menor de 1,5 o menor de 1,25.

5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizada por una liberación continua de un compuesto de insulina estructuralmente intacta a lo largo del periodo de tiempo completo entre administraciones.

30 6. La composición de la reivindicación 5, en donde el periodo de tiempo completo entre administraciones es al menos aproximadamente 80 horas, tal como al menos aproximadamente 110 horas, típicamente al menos una semana.

7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizada porque se administra por inyección, tal como subcutánea o intramuscular.

35 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el compuesto de insulina se selecciona de insulina humana, insulina glargina, insulina detemir, insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina o un profármaco de las mismas.

9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la concentración máxima se alcanza en las primeras 24 horas de la administración, tal como en las primeras 12 horas de la administración, p. ej., en las primeras 6 horas de la administración.

40 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que además comprende un compuesto de GLP-1.

11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la deficiencia de insulina, en el que es beneficioso el

tratamiento o prevención con un compuesto de insulina, tal como hiperglucemia, prediabetes, tolerancia a la glucosa alterada, diabetes tipo I, diabetes tipo II, síndrome X.

12. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la composición farmacéutica está seca.
- 5 13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 12, en donde la composición farmacéutica se seca por liofilización.
14. Una composición según la reivindicación 12 o 13, en donde el profármaco de insulina-hidrogel tiene una dosis suficiente en la composición para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina durante al menos tres días en una aplicación.
- 10 15. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, 13-14, en donde es una composición de una sola dosis.
16. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, 12-14, en donde es una composición de múltiples dosis.
17. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, 12-16, caracterizada porque contiene uno o más agentes biológicamente activos adicionales, sea en su forma libre; como un profármaco, en especial un profármaco de hidrogel; y en donde el uno o más agentes biológicamente activos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en sulfonilureas, tales como, por ejemplo, clorpropamida, tolazamida, tolbutamida, gliburida, glipizida, glimepirida, y similares; meglitinidas, tales como, por ejemplo, repaglinida, péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y sus miméticos, péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y sus miméticos, exendina y sus miméticos, inhibidores de dipeptidilo proteasa (DPPIV); biguanidas, tales como, por ejemplo, metformina; tiazolidinonas, tales como, por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona, troglitazona, isaglitazona (conocida como MCC-555), ácido 2-[2-[(2R)-4-hexil-3,4-dihidro-3-oxo-2H-1,4-benzoxazin-2-il]etoxi]-benceno-acético, y similares; GW2570, y similares; moduladores de receptor retinoide-X (RXR), tales como, por ejemplo, targretina, ácido 9-cis-retinoico, y similares; otros agentes sensibilizadores de insulina, tales como, por ejemplo, INS-1, inhibidores de PTP-1B, inhibidores de GSK3, inhibidores de glucógeno fosforilasa α , inhibidores de fructosa-1,6-bisfosfatasa, y similares; insulinas, incluyendo insulinas de acción normal o corta, acción intermedia y acción prolongada, y análogos de insulina, tales como moléculas de insulina con diferencias menores en la secuencia de aminoácidos natural; moléculas pequeñas miméticas de insulina, que incluyen, pero no se limitan a L-783281, TE-17411, y similares; inhibidores del cotransportador de Na-glucosa, tales como T-1095, T-1095A, florizina, y similares; agonistas de amilina que incluyen, pero no se limitan a pramlintida, y similares; antagonistas de glucagón tales como AY-279955, y similares; agentes antiobesidad tales como orlistat, un inhibidor de lipasa pancreática; sibutramina; norepinefrina y dopamina; hormona del crecimiento, IGF-1, factor de liberación de la hormona del crecimiento; oxintomodulina y moduladores de grelina; supresores del apetito tales como benzfetamina, fenmetrazina, fentermina, dietilpropión, mazindol, sibutramina, fenilpropanolamina o, efedrina; supresores del apetito tales como quipazina, fluoxetina, sertralina, fenfluramina, o dexfenfluramina; agentes supresores del apetito tales como apomorfina; agentes supresores del apetito tales como miméticos de histamina, moduladores de receptor H3; potenciadores del gasto de energía tales como agonistas beta-3 adrenérgicos y estimuladores de la función de proteínas desacoplantes; leptina y miméticos de leptina (p. ej., metreleptina); antagonistas del neuropéptido Y; moduladores del receptor de melanocortina-1, 3 y 4; agonistas de colecistoquinina; miméticos y análogos del péptido similar al glucagón de tipo 1 por ejemplo exendina; andrógenos tales como deshidroepiandrosterona y derivados tales como eticolandiona; testosterona; esteroides anabólicos tales como oxandrolona, y hormonas esteroideas; antagonistas del receptor de galanina; agentes de citoquinas tales como factor neurotrófico ciliar; inhibidores de amilasa.
18. Un recipiente que contiene la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, 12-15.
- 45 19. Un recipiente según la reivindicación 18, en donde el recipiente es una jeringa de cámara doble.
20. Una suspensión que comprende la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, 13-17.
21. Un método de preparación de una suspensión de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende las etapas de reconstituir la composición farmacéutica seca según las reivindicaciones 12 o 13 por adición de solución de reconstitución.
- 50 22. Un kit de piezas que comprende una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, 12-17, y un recipiente para la administración de la composición.
23. Un kit de piezas que comprende una aguja y un recipiente que contiene solución de reconstitución, y la composición seca según la reivindicación 12 o 13, para usar con la aguja.
- 55 24. Un kit de piezas según la reivindicación 23, en donde el recipiente es una jeringa de cámara doble y en

donde una de las dos cámaras de la jeringa de cámara doble contiene la solución de reconstitución.

25. Un kit de piezas según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, donde la composición es inyectable mediante una aguja.
26. Un kit de piezas de la reivindicación 25, en donde la aguja tiene un diámetro interior menor de 300 μm .
- 5 27. Un kit de piezas de la reivindicación 25, en donde la aguja tiene un diámetro interior menor de 225 μm .
28. Un kit de piezas de la reivindicación 25, en donde la aguja tiene un diámetro interior menor de 175 μm .

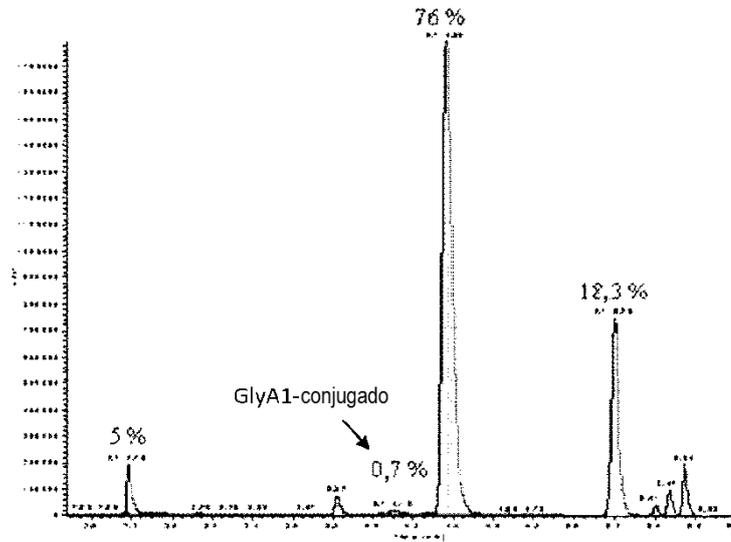


Fig. 1a

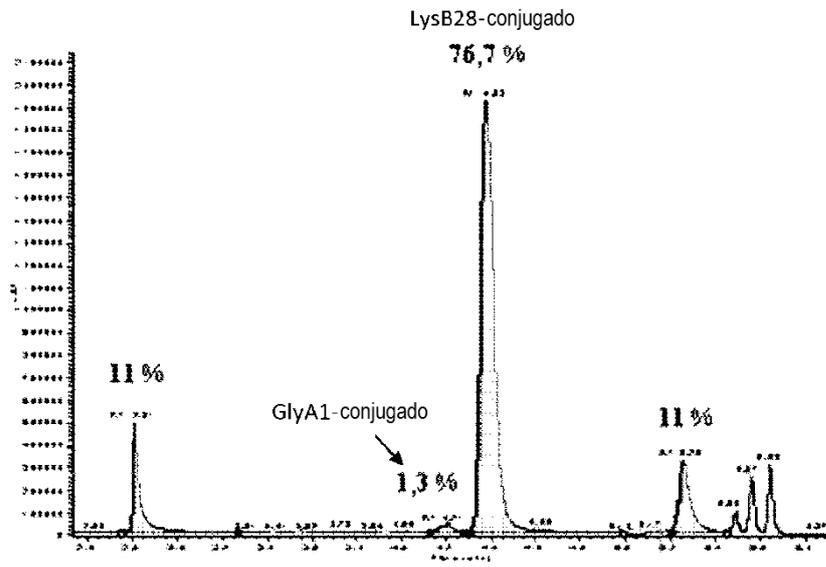


Fig. 1b

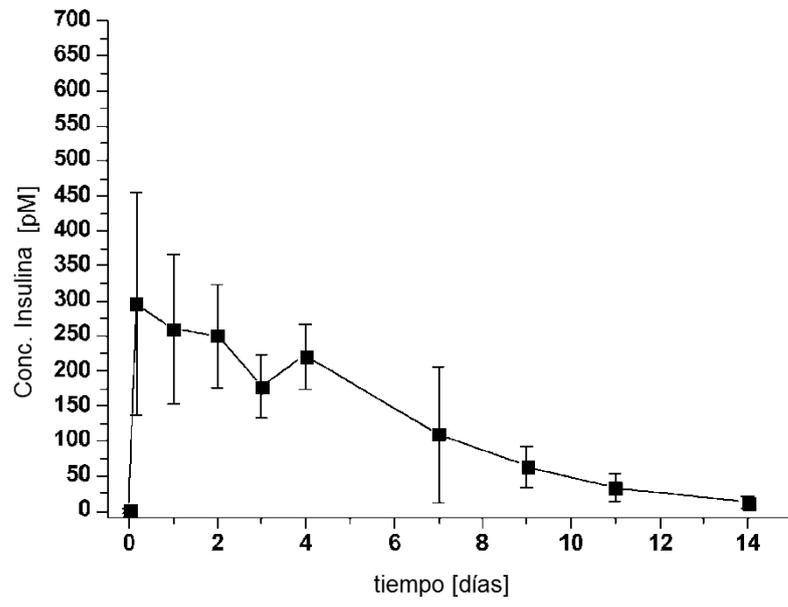


Fig. 2

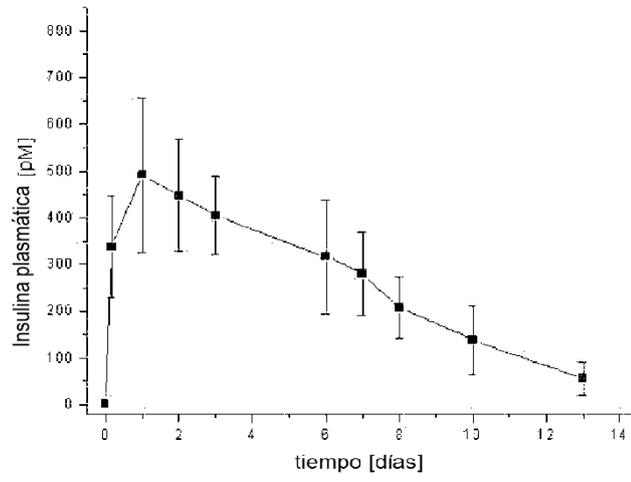


Fig. 3

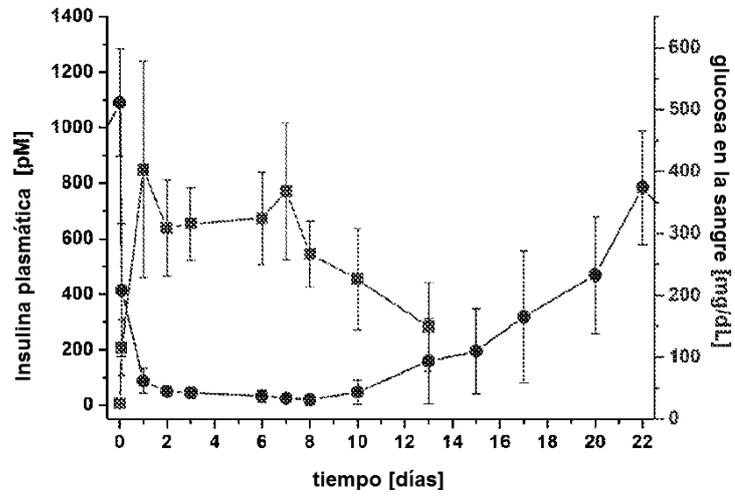


Fig. 4

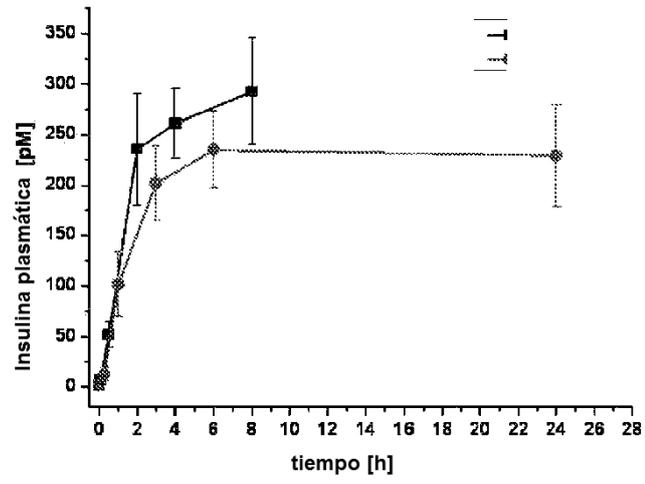


Fig. 5

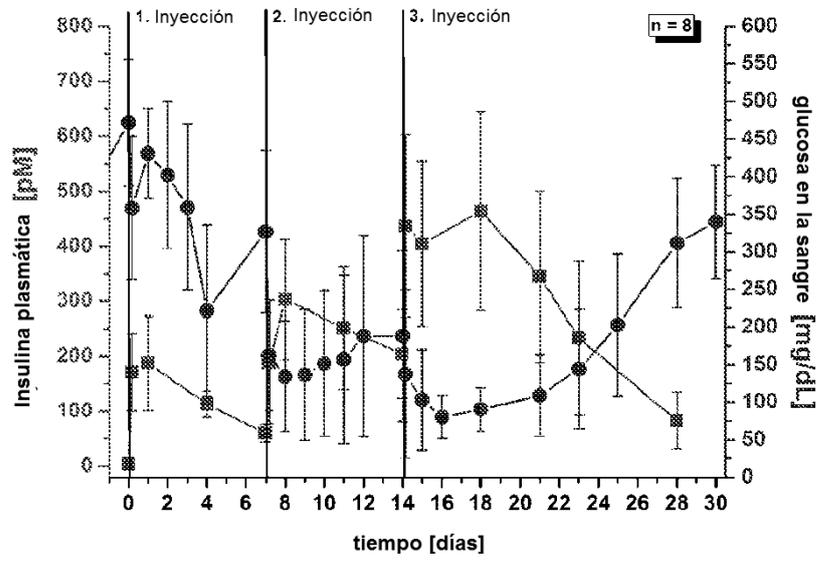


Fig. 6

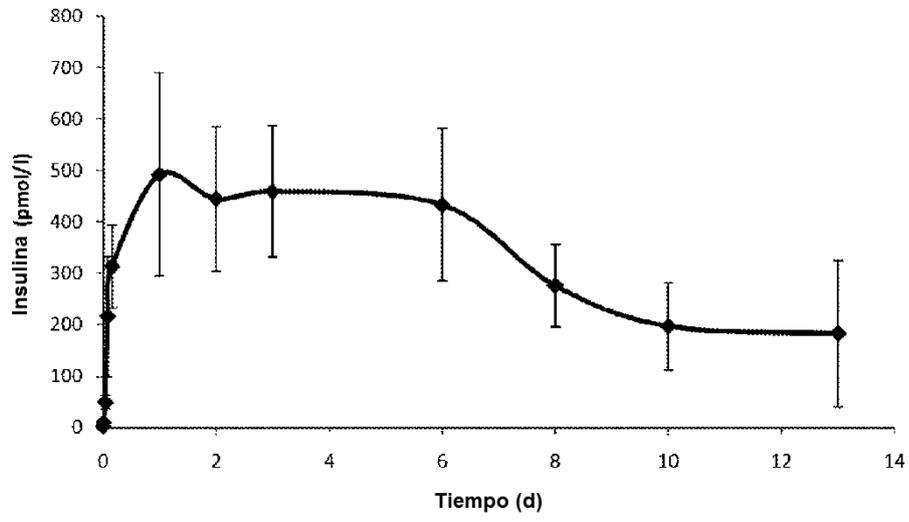


Fig.7

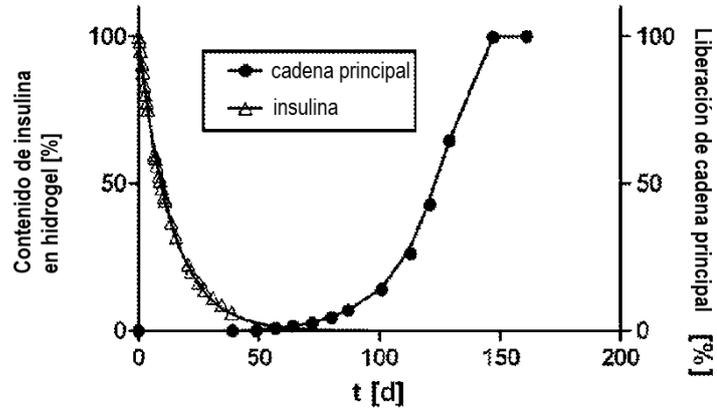


Fig. 8

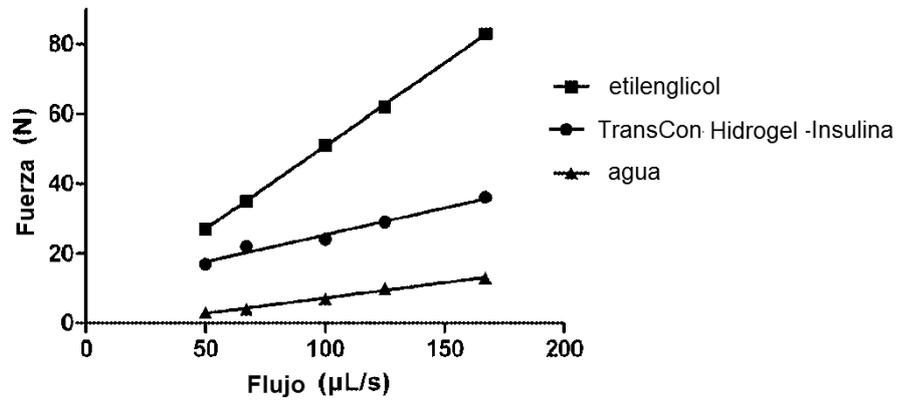


Fig. 9