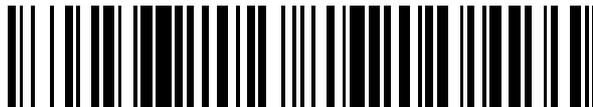


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 042**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 38/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2006 PCT/US2006/019119**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2006 WO06127361**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2006 E 06760032 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 1883394**

54 Título: **Constructo lipídico para la administración de insulina a un mamífero**

30 Prioridad:

**23.05.2005 US 683878 P**

**20.03.2006 US 384728**

**20.03.2006 US 384659**

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

**05.07.2018**

73 Titular/es:

**SDG, INC. (100.0%)  
10000 Cedar Avenue, Suite 6  
Cleveland, OH 44106, US**

72 Inventor/es:

**LAU, JOHN, R. y  
GEHO, W. BLAIR**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 675 042 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**

Constructo lipídico para la administración de insulina a un mamífero

**Antecedentes de la invención**

5 La diabetes es un trastorno que afecta a una gran cantidad de personas en todo el mundo. Los enfoques de gestión para controlar diabetes tipo I y tipo II tienen como objetivo principalmente normalizar la glucemia para prevenir complicaciones a corto y largo plazo. Muchos pacientes requieren múltiples inyecciones diarias de insulina para controlar su diabetes. Se han producido varios productos de insulina que controlan la glucemia a lo largo de distintos intervalos de tiempo. Varios productos combinan diversas formas de insulina en un intento por proporcionar una preparación que controle los niveles de glucosa a lo largo de un periodo de tiempo más amplio.

10 Los intentos previos por normalizar la glucemia en pacientes con diabetes tipo I y tipo II se centraron en la administración subcutánea de insulina en diversas formulaciones de liberación programada, tales como los productos farmacéuticos de insulina NPH Ultralente y Humulin. Estas formulaciones han intentado retardar y posteriormente controlar la biodistribución de insulina regulando la liberación de insulina en tejidos periféricos con las expectativas de que el control sostenido de la biodisponibilidad de insulina conducirá a un mejor control glucémico.

15 La insulina glargina es una forma de acción prolongada de insulina en la que se libera insulina desde el tejido subcutáneo alrededor del sitio de inyección al torrente sanguíneo a una tasa relativamente constante durante todo el día. Aunque la insulina glargina se libera a una tasa constante durante todo el día, la insulina liberada llega a una amplia gama de sistemas dentro del cuerpo en vez de administrarse a zonas dirigidas del cuerpo. Lo que se necesita es una composición de insulina en la que una parte de la insulina dosificada se libere a una tasa relativamente constante durante todo el día y otra parte de la insulina se libere de forma programada desde el sitio de administración y se dirija para la administración al hígado para controlar mejor la producción de glucosa.

25 Por tanto, existe una necesidad no satisfecha en la técnica de composiciones y métodos de control de la glucemia en pacientes con diabetes tipo I y tipo II. La presente invención cumple estas necesidades proporcionando una composición de acción prolongada que comprende insulina que está libre e insulina que está asociada con un constructo lipídico dirigido para la administración a hepatocitos. Un constructo lipídico es una partícula de lípido/fosfolípido en la que actúan conjuntamente moléculas de lípido individuales para crear una membrana lipídica bipolar que encierra y aísla una parte del medio en el que se formó. El constructo lipídico libera insulina libre a lo largo del tiempo así como dirige una parte de la insulina restante a los hepatocitos en el hígado para controlar mejor la producción y el almacenamiento de glucosa.

30 El documento US 4.603.044 A se refiere a un sistema de administración de fármacos dirigido que tiene especificidad por receptores hepatobiliares, que son las células metabólicas especializadas del hígado. Este sistema de administración dirigida preferido utiliza un lípido bipolar como componente mayoritario de la estructura de membrana vesicular. El sistema de administración comprende además un material de direccionamiento con especificidad por receptores hepatobiliares del hígado. El sistema de administración se une al receptor hepatobiliar, y libera su carga farmacológica. Esta divulgación específica que la unión del material de direccionamiento a la vesícula se realiza preferiblemente proporcionando en primer lugar una molécula conectora, que comprende una parte lipófila que se inserta en la pared de la vesícula y una parte hidrófila que se extiende hacia fuera de la pared de la vesícula.

40 El documento US 2002/061331 A1 da a conocer composiciones que comprenden, y métodos de preparación de, una estructura de bicapa para encapsular múltiples unidades de contención. Estas unidades de contención pueden obtener agentes terapéuticos, de diagnóstico o de formación de imágenes que pueden liberarse a través de la estructura de bicapa. Un ejemplo adecuado de una unidad de contención de este tipo es una vesícula unilaminar o multilaminar.

45 El documento US 4.863.896 A da a conocer que la insulina administrada de manera periférica no puede proporcionar la función de hormona hepática. Las vesículas dirigidas a hepatocitos con insulina encapsulada restaurarán la función hepática, pero no hay insulina no dirigida para sortear el hígado para uso periférico, como en la función corporal natural, sana. Cuando se divide una dosificación prescrita de insulina entre formas libre y dirigida a los hepatocitos encapsulada, una fracción muy pequeña de la dosis en forma encapsulada es suficiente para provocar una función hepática completa, y la insulina no dirigida satisface las necesidades del tejido y músculo corporal.

**Breve resumen de la invención**

50 En un aspecto, la presente invención incluye una composición que comprende una insulina libre y un constructo lipídico que comprende una insulina asociada con el constructo lipídico, un lípido anfipático y un lípido anfipático extendido, en la que el lípido anfipático extendido comprende restos proximal, medio y distal, en la que el resto proximal conecta el lípido anfipático extendido al constructo, el resto distal dirige el constructo a un receptor presentado por un hepatocito, y el resto medio conecta los restos proximal y distal, en la que el lípido anfipático comprende al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina, colesterol, fosfato de dicetilo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-[3-fosfo-rac-(1-glicero)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo), derivados de los mismos, y mezclas de

5 cualquiera de los compuestos anteriores; y en la que el lípido anfipático extendido se selecciona del grupo que consiste en N-hidroxisuccinimida (NHS)-biotina; sulfo-NHS-biotina; N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga; sulfo-N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga; D-biotina; biocitina; sulfo-N-hidroxisuccinimida-S-S-biotina; biotina-BMCC; biotina-HPDP; yodoacetil-LC-biotina; hidrazida de biotina; hidrazida de biotina-LC; hidrazida de biocitina; biotina-cadaverina; carboxibiotina; fotobiotina; trifluoroacetato de  $\rho$ -aminobenzoil-biocitina;  $\rho$ -diazobenzoil-biocitina; biotina-DHPE; biotina-X-DHPE; ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; éster succinimidílico del ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; S-biotinil-homocisteína; biocitina-X; hidrazida de biocitina X; biotina-etilendiamina; biotina-XL; biotina-X-etilendiamina; hidrazida de biotina-XX; biotina-XX-SE; biotina-XX, SSE; biotina-X-cadaverina;  $\alpha$ -(t-BOC)biocitina; N-(biotinil)-N'-(yodoacetil)etilendiamina; DNP-X-biocitina-X-SE; hidrazida de biotina-X; clorhidrato de norbiotinamina; 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina; ARP; sulfóxido de biotina-1; éster metílico de biotina; biotina-maleimida; biotina-poli(etilenglicol)amina; sal de sodio del ácido (+)-biotina-4-amidobenzoico; 2-N-acetilamino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido de biotina; biotina- $\alpha$ -D-N-acetilneuraminida;  $\alpha$ -L-fucósido de biotina; lacto-N-bióside de biotina; trisacárido de biotina-Lewis-A; tetrasacárido de biotina-Lewis-Y;  $\alpha$ -D-manopiranosido de biotina; y 6-O-fosfo- $\alpha$ -D-manopiranosido de biotina.

15 En todavía otro aspecto, la al menos una insulina se selecciona del grupo que consiste en insulina lispro, insulina aspart, insulina regular, insulina glargina, insulina-zinc, insulina humana-zinc extendida, insulina isofana, insulina regular tamponada humana, insulina glulisina, insulina regular humana recombinante, insulina isofana humana recombinante, combinaciones premezcladas de cualquiera de las insulinas mencionadas anteriormente, un derivado de las mismas, y una combinación de cualquiera de las insulinas mencionadas anteriormente.

20 En todavía otro aspecto, el constructo comprende una carga positiva, una carga negativa o combinaciones de las mismas.

En un aspecto adicional, el constructo lipídico comprende además acetato-hidrogenoftalato de celulosa.

En aún otro aspecto, el constructo lipídico comprende además al menos una molécula orgánica cargada unida a la insulina.

25 En un aspecto, la molécula orgánica cargada se selecciona del grupo que consiste en protaminas, derivados de polilisina, polímeros de aminoácidos altamente básicos, poli(Arg-Pro-Thr) $_n$  en una razón molar de 1:1:1, poli(DL-Ala-poli-L-Lys) $_n$  en una razón molar de 6:1, histonas, polímeros de azúcar que contienen una carga positiva a la que contribuyen un grupo amino primario, polinucleótidos con grupos amino primarios, polímeros carboxilados y aminoácidos poliméricos, fragmentos de proteínas que contienen grandes cantidades de residuos de aminoácido con grupos funcionales carboxilo (COO-) o sulfhidrilo (S-), derivado de proteínas con grupos carboxilo ácidos terminales cargados negativamente, polímeros ácidos, polímeros de azúcar que contienen grupos carboxilo cargados negativamente, derivados de los mismos y combinaciones de los compuestos mencionados anteriormente.

35 En otro aspecto, un método de fabricación de una composición que comprende insulina libre y un constructo lipídico que comprende una insulina asociada con el constructo lipídico, un lípido anfipático y un lípido anfipático extendido, en el que el lípido anfipático extendido comprende restos proximal, medio y distal, en el que el resto proximal conecta el lípido anfipático extendido al constructo, el resto distal dirige el constructo a un receptor presentado por un hepatocito, y el resto medio conecta los restos proximal y distal, en el que el lípido anfipático comprende al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol, fosfato de dicetilo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-[3-fosfo-rac-(1-glicero)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo), derivados de los mismos, y mezclas de cualquiera de los compuestos anteriores; y en el que el lípido anfipático extendido se selecciona del grupo que consiste en N-hidroxisuccinimida (NHS)-biotina; sulfo-NHS-biotina; N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga; sulfo-N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga; D-biotina; biocitina; sulfo-N-hidroxisuccinimida-S-S-biotina; biotina-BMCC; biotina-HPDP; yodoacetil-LC-biotina; hidrazida de biotina; hidrazida de biotina-LC; hidrazida de biocitina; biotina-cadaverina; carboxibiotina; fotobiotina; trifluoroacetato de  $\rho$ -aminobenzoil-biocitina;  $\rho$ -diazobenzoil-biocitina; biotina-DHPE; biotina-X-DHPE; ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; éster succinimidílico del ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; S-biotinil-homocisteína; biocitina-X; hidrazida de biocitina X; biotina-etilendiamina; biotina-XL; biotina-X-etilendiamina; hidrazida de biotina-XX; biotina-XX-SE; biotina-XX, SSE; biotina-X-cadaverina;  $\alpha$ -(t-BOC)biocitina; N-(biotinil)-N'-(yodoacetil)etilendiamina; DNP-X-biocitina-X-SE; hidrazida de biotina-X; clorhidrato de norbiotinamina; 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina; ARP; sulfóxido de biotina-1; éster metílico de biotina; biotina-maleimida; biotina-poli(etilenglicol)amina; sal de sodio del ácido (+)-biotina-4-amidobenzoico; 2-N-acetilamino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido de biotina; biotina- $\alpha$ -D-N-acetilneuraminida;  $\alpha$ -L-fucósido de biotina; lacto-N-bióside de biotina; trisacárido de biotina-Lewis-A; tetrasacárido de biotina-Lewis-Y;  $\alpha$ -D-manopiranosido de biotina; y 6-O-fosfo- $\alpha$ -D-manopiranosido de biotina, comprendiendo el método las etapas de:

- 55 a. crear una mezcla que comprende el lípido anfipático y un lípido anfipático extendido;
- b. formar una suspensión del constructo lipídico en medios acuosos; y
- c. introducir la insulina en el constructo lipídico.

En otro aspecto, la etapa de introducir la insulina en el constructo lipídico comprende introducción en equilibrio e introducción sin equilibrio.

5 En aún otro aspecto, la etapa de introducir la insulina en el constructo lipídico comprende añadir una disolución que contiene insulina libre a una mezcla del constructo lipídico en agua y permitir que la insulina permanezca en contacto con la mezcla hasta que se alcance el equilibrio.

En aún otro aspecto, el método comprende además la etapa de introducir de manera terminal la insulina en el constructo lipídico después de que la mezcla alcance el equilibrio, en el que la disolución que contiene insulina libre se retira del constructo, en el que además el constructo contiene insulina asociada con el constructo.

10 En un aspecto, el método comprende además la etapa de retirar la disolución que contiene insulina libre del constructo lipídico que contiene insulina asociada con el constructo mediante un proceso seleccionado del grupo que consiste en un procedimiento de filtración rápida, centrifugación, centrifugación por filtración y cromatografía usando una resina de intercambio iónico o gel de resina de afinidad de estreptavidina-agarosa que tiene afinidad por biotina, iminobiotina o derivados de las mismas.

15 En todavía otro aspecto, el método comprende además la etapa de añadir acetato-hidrogenofoalato de celulosa al constructo lipídico.

En aún otro aspecto, el método comprende además la etapa de recuperar del proceso al menos un material seleccionado del grupo que consiste en insulina, resina de intercambio iónico y gel de afinidad de estreptavidina-agarosa.

20 En otro aspecto, la etapa de introducir la insulina en el constructo lipídico comprende la etapa de añadir al menos una molécula orgánica cargada a la insulina antes de introducirse la insulina en el constructo lipídico.

En un aspecto, la invención incluye uso de un constructo lipídico de la presente invención para la preparación de una composición para aumentar la administración de insulina a los hepatocitos en el hígado de un paciente aquejado de diabetes.

25 En todavía otro aspecto del uso, la insulina está protegida dentro del constructo lipídico frente a la degradación hidrolítica al proporcionarse una disposición estructural tridimensional de moléculas de lípido de modo que se impida el acceso a la insulina por enzimas hidrolíticas.

En aún otro aspecto del uso, se añade el acetato-hidrogenofoalato de celulosa al constructo lipídico para que reaccione con moléculas de lípido individuales.

30 En todavía otro aspecto del uso, una forma de dosificación no solubilizada de insulina está comprendida dentro del constructo lipídico.

En un aspecto, la invención incluye un kit para su uso en el tratamiento de un mamífero aquejado de diabetes, comprendiendo el kit

- una composición que comprende insulina libre y un constructo lipídico,

- una disolución tampón fisiológica,

35 - un aplicador, y

- un material de instrucciones para el uso del mismo,

40 en el que el constructo lipídico que comprende una insulina asociada con el constructo lipídico, un lípido anfipático y un lípido anfipático extendido, en el que el lípido anfipático extendido comprende restos proximal, medio y distal, en el que el resto proximal conecta el lípido anfipático extendido al constructo, el resto distal dirige el constructo a un receptor presentado por un hepatocito, y el resto medio conecta los restos proximal y distal, en el que el lípido anfipático comprende al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol, fosfato de dicetilo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-[3-fosfo-rac-(1-glicero)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo), derivados de los mismos, y mezclas de cualquiera de los compuestos anteriores; y en el que el lípido anfipático extendido se selecciona del grupo que

45 consiste en N-hidroxisuccinimida (NHS)-biotina; sulfo-NHS-biotina; N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga; sulfo-N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga; D-biotina; biocitina; sulfo-N-hidroxisuccinimida-S-S-biotina; biotina-BMCC; biotina-HPDP; yodoacetil-LC-biotina; hidrazida de biotina; hidrazida de biotina-LC; hidrazida de biocitina; biotina-cadaverina; carboxibiotina; fotobiotina; trifluoroacetato de  $\rho$ -aminobenzoil-biocitina;  $\rho$ -diazobenzoil-biocitina; biotina-DHPE; biotina-X-DHPE; ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; éster succinidimílico del ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; S-biotinil-homocisteína; biocitina-X; hidrazida de biocitina X; biotina-etilendiamina; biotina-XL; biotina-X-etilendiamina; hidrazida de biotina-XX; biotina-XX-SE; biotina-XX, SSE; biotina-X-cadaverina;  $\alpha$ -(t-BOC)biocitina; N-(biotinil)-N'-(yodoacetil)etilendiamina; DNP-X-biocitina-X-SE; hidrazida de biotina-X; clorhidrato de norbiotina; 3-(N-maleimidipropionil)biocitina; ARP; sulfóxido de biotina-1; éster metílico de biotina; biotina-

50

maleimida; biotina-poli(etilenglicol)amina; sal de sodio del ácido (+)-biotina-4-amidobenzoico; 2-N-acetilamino-2-desoxi-β-D-glucopiranosido de biotina; biotina-α-D-N-acetilneuraminida; α-L-fucósido de biotina; lacto-N-biócido de biotina; trisacárido de biotina-Lewis-A; tetrasacárido de biotina-Lewis-Y; y α-D-manopiranosido de biotina.

- 5 En otro aspecto, la presente invención incluye un constructo lipídico de la presente invención para su uso en el aumento de la administración de insulina a los hepatocitos en el hígado de un paciente aquejado de diabetes.

**Breve descripción de los dibujos**

Con fines de ilustrar la invención, se representan en los dibujos determinadas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no se limita a las disposiciones e instrumentalidades precisas de las realizaciones representadas en los dibujos.

- 10 La figura 1 es una representación de un constructo lipídico de unión a insulina que comprende insulina, moléculas de lípido anfipático y un lípido anfipático extendido.

La figura 2 es una representación de una ruta para fabricar biocitina.

La figura 3 es una representación de una ruta para fabricar iminobiocitina.

- 15 La figura 4 es una representación de una ruta para fabricar benzoil-tioacetil-triglicina-iminobiocitina (BTA-3-Gly-iminobiocitina).

La figura 5 es una representación de una ruta para fabricar benzoil-tioacetil-triglicina.

La figura 6 es una representación de una ruta para fabricar benzoil-tioacetil-triglicina-sulfo-N-hidroxisiccinimida (BTA-3-Gly-sulfo-NHS).

- 20 La figura 7 es una representación de una ruta para fabricar benzoil-tioacetil-triglicina-iminobiocitina (BTA-3-Gly-iminobiocitina).

La figura 8 es una representación de una ruta para fabricar una molécula de unión al receptor de hepatocitos y de anclaje lipídico (LA-HRBM).

La figura 9 es una representación de posibles sitios para la unión entre acetato-hidrogenofalato de celulosa e insulina.

- 25 La figura 10 es una representación del cambio en la estructura de iminobiotina en condiciones ácidas frente a básicas.

La figura 11 es una representación de la estructura química de la insulina glargina.

La figura 12 es una representación de la estructura química de la insulina isofana humana recombinante y una proteína protamina.

- 30 La figura 13 es una representación de una composición farmacéutica que combina insulina libre e insulina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua.

La figura 14 es un esquema de un método de fabricación de un constructo lipídico de unión a insulina que comprende moléculas de lípido anfipático y un lípido anfipático extendido.

- 35 La figura 15 es un esquema del método de fabricación de una composición farmacéutica dirigida a hepatocitos que combina insulina glargina libre e insulina glargina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua.

La figura 16 es un esquema del método de fabricación de una composición farmacéutica dirigida a hepatocitos que combina insulina isofana humana recombinante libre e insulina isofana humana recombinante asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua que contiene una parte de insulina regular humana recombinante que está tanto libre como asociada con un constructo lipídico.

- 40 La figura 17 indica la concentración de glucógeno presente en el hígado de ratas tratadas con diversas composiciones dirigidas a hepatocitos.

La figura 18 es una gráfica de las concentraciones de glucosa en sangre de pacientes individuales tratados una vez antes del desayuno con HDV-insulina glargina.

- 45 La figura 19 es una gráfica del efecto de una dosis única de HDV-insulina glargina sobre las concentraciones de glucemia promedio en pacientes que consumen tres comidas durante el día.

La figura 20 es una gráfica del efecto de HDV-insulina glargina sobre las concentraciones de glucemia a lo largo del tiempo con relación a las concentraciones de glucemia en estado de ayuno.

La figura 21 es una gráfica de las concentraciones de glucosa en sangre de pacientes individuales tratados una vez antes del desayuno con HDV-insulina Humulin NPH.

La figura 22 es una gráfica del efecto de una dosis única de HDV-insulina Humulin NPH sobre las concentraciones de glucemia promedio en pacientes que consumen tres comidas durante el día.

- 5 La figura 23 es una gráfica del efecto de HDV-insulina Humulin NPH sobre las concentraciones de glucemia a lo largo del tiempo con relación a las concentraciones de glucemia en estado de ayuno.

### Descripción detallada de la invención

10 Se da a conocer una composición farmacéutica dirigida a los hepatocitos en la que está asociada insulina con un complejo de molécula diana insoluble en agua dentro del constructo y la composición se dirige a los hepatocitos en el hígado de un paciente para proporcionar un medio eficaz de controlar la diabetes.

15 La invención incluye una composición que comprende insulina libre y un constructo lipídico tal como se definen en la reivindicación 1 que comprende insulina, un lípido anfipático y un lípido anfipático extendido (una molécula de unión a receptor). El lípido anfipático extendido comprende restos proximal, medio y distal. El resto proximal conecta la molécula de lípido extendido al constructo, el resto distal dirige el constructo a un receptor presentado por un hepatocito, y el resto medio conecta los restos proximal y distal.

Un constructo lipídico es una partícula esférica de lípido y fosfolípido en la que moléculas de lípido individuales interaccionan de manera cooperativa para crear una membrana lipídica bipolar que encierra y aísla una parte del medio en el que se formó. El constructo lipídico puede dirigir la administración de insulina a los hepatocitos en el hígado y proporcionar una liberación sostenida de insulina para controlar mejor la diabetes.

20 También se da a conocer una composición farmacéutica dirigida a hepatocitos que combina insulina libre e insulina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua dirigido a los hepatocitos en el hígado de un paciente para proporcionar un medio eficaz de controlar la glucemia. Cuando una mezcla de diferentes formas de insulina se asocia con un complejo de molécula diana para crear una mezcla única de moléculas de insulina, se logra un beneficio terapéutico añadido una vez que se combinan estas insulinas en un constructo lipídico dirigido a hepatocitos. La composición puede administrarse por diversas vías, incluyendo por vía subcutánea o por vía oral, con el fin de tratar a mamíferos aquejados de diabetes.

25 La invención proporciona además un método de fabricación de una composición que comprende insulina libre y un constructo lipídico que comprende insulina, un lípido anfipático y un lípido anfipático extendido tal como se definen en la reivindicación 7. La molécula de lípido anfipático extendido comprende restos proximal, medio y distal. El resto proximal conecta el lípido extendido al constructo. El resto distal dirige el constructo a un receptor presentado por un hepatocito, y el resto medio conecta los restos proximal y distal.

30 También se da a conocer un método de fabricación de una composición que comprende insulina libre e insulina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua dentro del constructo lipídico que dirige la administración del complejo a los hepatocitos. El complejo de molécula diana comprende una matriz de constructo lipídico que contiene múltiples unidades individuales unidas de una estructura formada por un complejo de metal.

35 Adicionalmente, la invención proporciona uso del constructo lipídico de la presente invención para la preparación de una composición para aumentar la administración de insulina a los hepatocitos en el hígado de un paciente aquejado de diabetes.

40 Además, la invención proporciona un constructo lipídico de la presente invención para su uso en el aumento de la administración de insulina a los hepatocitos en el hígado de un paciente aquejado de diabetes.

Además se dan a conocer métodos de tratamiento de un paciente con insulina a la que se une un compuesto orgánico polar, o mezcla de compuestos, cambiando de ese modo el punto isoeléctrico de la insulina. Este cambio en el punto isoeléctrico cambiará la liberación de insulina en el cuerpo de paciente tratado con la composición.

45 Adicionalmente se dan a conocer métodos de control de la glucemia en individuos con diabetes tipo I y tipo II administrando una dosis eficaz de una composición farmacéutica dirigida a hepatocitos que combina insulina libre e insulina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua dirigido para la administración a hepatocitos. La combinación de insulina libre e insulina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua crea un proceso de equilibrio dinámico entre las dos formas de insulina que se producen *in vivo* para ayudar a controlar el movimiento de la insulina libre hasta los sitios receptores de la acción hormonal, tal como el tejido muscular y adiposo de un paciente diabético a lo largo de un periodo de tiempo designado. La insulina dirigida a hepatocitos también se administra al hígado de un paciente diabético a lo largo de un periodo de tiempo designado diferente que la insulina libre introduciendo de ese modo nuevos perfiles farmacodinámicos de insulina cuando se libera insulina libre desde el constructo lipídico. Además, una parte de insulina que está asociada con el constructo lipídico se dirige al hígado. Este nuevo perfil farmacodinámico del producto proporciona no sólo insulina basal de acción  
50 prolongada para tejidos periféricos, sino también estimulación de insulina hepática a las horas de las comidas para  
55

5 el control del almacenamiento de glucosa hepática durante una comida. Se libera insulina libre desde el sitio de administración y se distribuye por todo el cuerpo. Se administra insulina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua al hígado, donde se libera a lo largo del tiempo desde el complejo. La tasa de liberación de insulina asociada con el complejo de molécula diana es diferente de la tasa de liberación de insulina libre desde el sitio de administración. Estas tasas de liberación diferentes de administración de insulina, combinadas con la administración dirigida de insulina asociada con un constructo lipídico al hígado, proporcionan la normalización de las concentraciones de glucosa en pacientes con diabetes tipo I y tipo II. La composición dirigida a hepatocitos también puede comprender otros tipos de insulina, o una combinación de otros tipos de insulina.

Definiciones

10 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen generalmente el mismo significado que entiende normalmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención. Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio de química orgánica y química de proteínas se conocen bien y se emplean normalmente en la técnica.

15 Los artículos “un(o)” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

El término “principio activo” se refiere a insulina isofana humana recombinante, insulina regular humana recombinante y otras insulinas.

20 Tal como se usa en el presente documento, los aminoácidos se representan mediante el nombre completo de los mismos, mediante el código de tres letras así como el código de una letra correspondientes a los mismos, tal como se indica en la siguiente tabla:

Nombre completo	Código de 1 letra	Código de 3 letras	Nombre completo	Código de 1 letra	Código de 3 letras
Alanina	Ala	A	Leucina	Leu	L
Arginina	Arg	R	Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N	Metionina	Met	M
Ácido aspártico	Asp	D	Fenilalanina	Phe	F
Cisteína	Cys	C	Prolina	Pro	P
Cistina	Cys-Cys	C-C	Serina	Ser	S
Ácido glutámico	Glu	E	Treonina	Thr	T
Glutamina	Gln	Q	Triptófano	Trp	W
Glicina	Gly	G	Tirosina	Tyr	Y
Histidina	His	H	Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I			

El término “inferior” significa que el grupo que describe contiene de 1 a 6 átomos de carbono.

25 El término “alquilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa, a menos que se establezca de otro modo, un hidrocarburo de cadena lineal, ramificada o cíclica que tiene el número de átomos de carbono designado (es decir C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> significa de uno a seis carbonos) e incluye grupos de cadena lineal, ramificada o cíclicos. Los ejemplos incluyen: metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, neopentilo, hexilo, ciclohexilo y ciclopropilmetilo. El más preferido es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), particularmente etilo, metilo e isopropilo.

30 El término “alquileno”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa, a menos que se establezca de otro modo, un hidrocarburo de cadena lineal, ramificada o cíclica que tiene dos sitios de sustitución, por ejemplo, metileno (-CH<sub>2</sub>-), etileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), isopropileno (-CH(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>), etc.

35 El término “arilo”, empleado solo o en combinación con otros términos, significa, a menos que se establezca de otro modo, una estructura de anillo de carbono cíclica, con o sin saturación, que contienen uno o más anillos (normalmente uno, dos o tres anillos) en la que tales anillos pueden unirse entre sí de manera colgante, tal como un bifenilo, o pueden condensarse, tal como naftaleno. Los ejemplos incluyen fenilo; antracilo; y naftilo. La estructura puede tener uno o más sitios de sustitución en los que se unen grupos funcionales, tales como alcohol, alcoxilo, amidas, amino, cianuros, halógeno y nitro.

El término “aril-alquilo inferior” significa un grupo funcional en el que se une un grupo arilo a un grupo alquileno inferior, por ejemplo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-fenilo.

40 El término “alcoxilo” empleado solo o en combinación con otros términos significa, a menos que se establezca de otro modo, un grupo alquilo o un grupo alquilo que contiene un sustituyente tal como un grupo hidroxilo, que tiene el número designado de átomos de carbono conectados a la parte restante de la molécula mediante un átomo de oxígeno, tal como, por ejemplo, -OCHOH-, -OCH<sub>2</sub>OH, metoxilo (-OCH<sub>3</sub>), etoxilo (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-propoxilo (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-propoxilo (isopropoxilo), butoxilo (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), pentoxilo (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), y los

homólogos e isómeros superiores.

El término “acilo” significa un grupo funcional de fórmula general  $-C(=O)-R$ , en la que  $-R$  es hidrógeno, hidrocarbilo, amino o alcoxilo. Los ejemplos incluyen acetilo ( $-C(=O)CH_3$ ), propionilo ( $-C(=O)CH_2CH_3$ ), benzoilo ( $-C(=O)C_6H_5$ ), fenilacetilo ( $-C(=O)CH_2C_6H_5$ ), carboetoxilo ( $-CO_2-CH_2CH_3$ ) y dimetilcarbamoilo ( $-C(=O)N(CH_3)_2$ ).

- 5 Los términos “halo” o “halógeno” por sí mismos o como parte de otro sustituyente significan, a menos que se establezcan de otro modo, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo.

10 El término “heterociclo” o “heterociclilo” o “heterocíclico” por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa, a menos que se establezca de otro modo, un sistema de anillos heterocíclico mono o multicíclico, estable, no sustituido o sustituido que comprende átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que comprende N, O y S, y en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse opcionalmente, y el átomo de nitrógeno puede cuaternizarse opcionalmente. El sistema heterocíclico puede unirse, a menos que se establezca de otro modo, en cualquier heteroátomo o carbono átomo que proporcione una estructura estable. Los ejemplos incluyen pirrol, imidazol, bencimidazol, ftaleína, pirideno, piranilo, furanilo, tiazol, tiofeno, oxazol, pirazol, 3-pirrolina, pirrolideno, pirimidina, purina, quinolina, isoquinolina, carbazol, etc.

15 El término “complejo de molécula diana de cromo” se refiere a un complejo que comprende varias unidades individuales, en el que cada unidad comprende átomos de cromo (Cr) que pueden aceptar hasta seis ligandos a los que contribuyen moléculas multivalentes, tales como ligandos de numerosas moléculas de ácido N-(2,6-diisopropilfenilcarbamoil-metil)iminodiacético. Las unidades individuales se unen entre sí formar una complicada estructura polimérica unida en una disposición tridimensional. El complejo polimérico es insoluble en agua pero  
20 soluble en disolventes orgánicos.

El término “constructo lipídico” se refiere a una partícula de lípido y/o fosfolípido en la que moléculas de lípido individuales interaccionan de manera cooperativa para crear una membrana lipídica bipolar que encierra y aísla una parte del medio en el que reside el constructo.

El término “lípido anfipático” significa una molécula de lípido que tiene un extremo polar y uno apolar.

25 El término “lípido anfipático extendido” significa una molécula anfipática con una estructura que, cuando forma parte de un constructo lipídico, se extiende desde el constructo lipídico hacia los medios alrededor del constructo, y puede unirse o interaccionar con un receptor.

30 Un “agente complejante” es un compuesto que formará un complejo polimérico con un agente de formación de puente de metal seleccionado, por ejemplo una sal de cromo, zirconio, etc., que presenta propiedades poliméricas en las que el complejo polimérico es sustancialmente insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos.

Por “medios acuosos” quiere decirse agua o tampón o sal que contiene agua.

35 Por “sustancialmente soluble” quiere decirse que el material, tal como el complejo de molécula diana de cromo polimérico resultante u otros complejos de direccionamiento de metal que pueden ser de composición cristalina o amorfa que se forman a partir de agentes complejantes, presentan la propiedad de ser insoluble en agua a temperatura ambiente. Un complejo polimérico de este tipo o una forma disociada del mismo cuando se asocia con una matriz de constructo lipídico forma un agente de transporte que funciona para portar y administrar insulina a hepatocitos en el hígado de un huésped de sangre caliente.

40 Por “sustancialmente insoluble” quiere decirse que un complejo polimérico, tal como un complejo polimérico de molécula diana de cromo u otros complejos de direccionamiento de metal, presenta la propiedad de ser insoluble en agua a temperatura ambiente. Un complejo polimérico de este tipo, que puede ser de composición cristalina, amorfa, o una forma disociada del mismo, cuando se asocia con un constructo lipídico forma un agente de transporte que porta y administra insulina a hepatocitos en el hígado.

Mediante el uso del término “asociado con” quiere decirse que el material al que se hace referencia se incorpora en o sobre la superficie de, o dentro de, la matriz de constructo lipídico.

45 El término “insulina” se refiere a formas naturales o recombinantes de insulina, y derivados de las insulinas mencionadas anteriormente. Los ejemplos de insulina incluyen, pero no se limitan a insulina lispro, insulina aspart, insulina regular, insulina glargina, insulina-zinc, insulina humana-zinc extendida, insulina isofana, insulina regular tamponada humana, insulina glulisina, insulina regular humana recombinante e insulina isofana humana recombinante. También están incluidas insulinas animales, tales como insulina bovina o porcina.

50 El término “insulina libre” se refiere a una insulina que no está asociada con un complejo de molécula diana.

Los términos “glargina” e “insulina glargina” se refieren ambos a un análogo de insulina humana recombinante que difiere de la insulina humana en que el aminoácido asparagina en la posición A21 se reemplaza por glicina y se añaden dos argininas al extremo C-terminal de la cadena B. Químicamente, es  $21^A\text{-Gly-30}^B\text{a-L-Arg-30}^B\text{b-L-Arg-Insulina humana}$  y tiene la fórmula empírica  $C_{267}H_{404}N_{72}O_{78}S_6$  y un peso molecular de 6063. La fórmula estructural

de la insulina glargina se proporciona en la figura 11.

El término “insulina distinta de glargina” se refiere a todas las insulinas, o bien naturales o bien recombinantes que no son insulina glargina. El término incluye restos similares a insulina, incluyendo fragmentos de moléculas de insulina, que tienen la actividad biológica de las insulinas.

- 5 El término “insulina isofana humana recombinante” se refiere a una insulina humana que se ha tratado con protamina. Las fórmulas estructurales para insulina isofana humana recombinante y protamina se proporcionan en la figura 12.

10 El término “al menos una insulina que no es insulina isofana humana recombinante” se refiere a todas las insulinas, o bien naturales o bien recombinantes, que no son insulina isofana humana recombinante. El término incluye restos similares a insulina, incluyendo fragmentos de moléculas de insulina que tienen la actividad biológica de las insulinas.

15 “HDV” (*hepatocyte delivery vehicle*) o “vehículo de administración a hepatocitos”, es un complejo de molécula diana insoluble en agua que comprende una matriz de constructo lipídico que contiene múltiples unidades individuales unidas de una estructura formada por la combinación de un agente de formación de puente de metal y un agente complejante. “HDV” se describe en el documento WO 99/59545, Targeted Liposomal Drug Delivery System.

20 “HDV-glargina” es una designación para una composición dirigida a hepatocitos que comprende una mezcla de insulina glargina libre e insulina glargina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua, en la que el complejo comprende múltiples unidades individuales unidas de cromo y ácido N-(2,6-diisopropilfenilcarbamoilmetil)iminodiacético, formadas por la combinación de un agente de formación de puente de metal y un agente complejante y una matriz de constructo lipídico.

25 “HDV-NPH” es una designación para una composición dirigida a hepatocitos que comprende una mezcla de insulina isofana humana recombinante libre, insulina libre distinta de Humulin, e insulina isofana humana recombinante e insulina distinta de Humulin que están asociadas con un complejo de molécula diana insoluble en agua, en la que el complejo comprende múltiples unidades individuales unidas de cromo y ácido N-(2,6-diisopropilfenilcarbamoilmetil)iminodiacético, formadas por la combinación de un agente de formación de puente de metal y un agente complejante y una matriz de constructo lipídico.

El término “biodisponibilidad” se refiere a una medición de la tasa y extensión con las que la insulina llega a la circulación sistémica y está disponible en los sitios de acción.

30 El término “punto isoeléctrico” se refiere al pH al que las concentraciones de cargas positivas y negativas en la proteína son iguales y, como resultado, la proteína expresará una carga neta nula. En el punto isoeléctrico, existirá una proteína casi completamente en forma de un zwitterión, o híbrido entre formas de la proteína. Las proteínas son lo menos estables en sus puntos isoeléctricos, y se coagulan o precipitan más fácilmente a este pH. Sin embargo, las proteínas no se desnaturalizan tras la precipitación isoeléctrica puesto que este proceso es esencialmente reversible.

35 Tal como se usa el término en el presente documento, “modular” o “modulación de” un proceso o estado biológico o químico se refiere a la alteración del transcurso normal del proceso biológico o químico, o el cambio del estado del proceso biológico o químico a un nuevo estado que es diferente del presente estado. Por ejemplo, la modulación del punto isoeléctrico de un polipéptido puede implicar un cambio que aumenta el punto isoeléctrico del polipéptido. Alternativamente, la modulación del punto isoeléctrico de un polipéptido puede implicar un cambio que disminuye el punto isoeléctrico de un polipéptido.

“Estructura estadística” indica una estructura formada a partir de moléculas que pueden migrar de un constructo lipídico a otro y la estructura está presente en una pluralidad de tamaños de partícula que pueden estar representados por una distribución gaussiana.

45 “Unión multidentada” es un proceso de unión química que utiliza múltiples sitios de unión dentro del constructo lipídico, tal como acetato-hidrogenofalato de celulosa, fosfolípidos e insulina. Estos sitios de unión fomentan los enlaces de hidrógeno, interacciones ion-dipolo y dipolo-dipolo en el que las moléculas individuales actúan en tándem para formar asociaciones no covalentes que sirven para unir o conectar dos o más moléculas.

Tal como se usa en el presente documento, “tratar” significa reducir la frecuencia con la que un paciente experimenta síntomas de una enfermedad, un trastorno, o estado adverso, y similares.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “portador farmacéuticamente aceptable” significa una composición química con la que puede combinarse el principio activo y que, tras la combinación, puede usarse para administrar el principio activo a un sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fisiológicamente aceptable” significa que el componente no es perjudicial para el sujeto al que se va a administrarse la composición.

Descripción – Composición

Construtto lipídico

Una representación de un construtto lipídico de unión a insulina que comprende insulina, un lípido anfipático y un lípido anfipático extendido se muestra en la figura 1. El lípido anfipático extendido, también conocido como molécula de unión a receptor, comprende restos proximal, medio y distal, en el que el resto proximal conecta la molécula de lípido extendido al construtto, el resto distal dirige el construtto a un receptor presentado por un hepatocito, y el resto medio conecta los restos proximal y distal. Los lípidos anfipáticos adecuados comprenden generalmente un grupo de cabeza polar y un grupo de cola apolar que se unen entre sí a través de una estructura principal de glicerol.

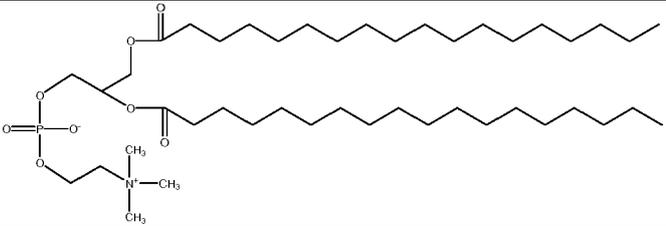
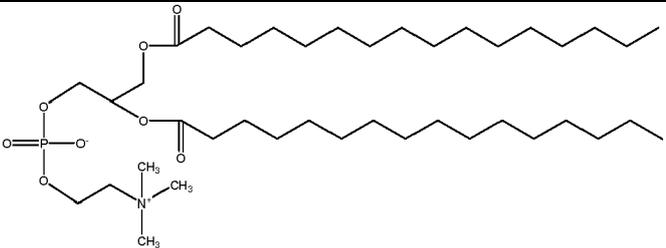
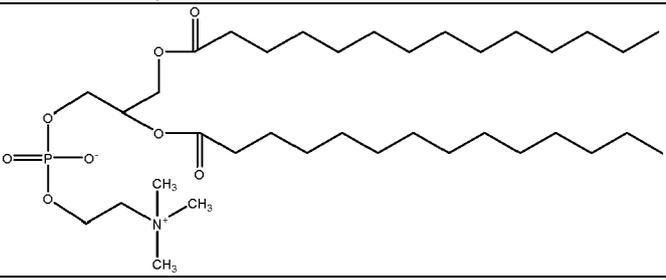
Los lípidos anfipáticos adecuados incluyen 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol, oleato de colesterol, fosfato de dicetilo, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Cap-biotinilo), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (sal de sodio), fosfato de trietilamonio-2,3-diacetoxipropilo y 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etilo y una mezcla de cualquiera de los lípidos anteriores o derivados apropiados de estos lípidos.

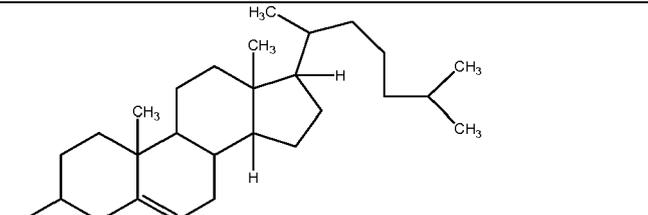
Las moléculas de lípido anfipático pueden incluir 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol, fosfato de dicetilo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Cap-biotinilo); 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (sal de sodio), fosfato de trietilamonio-2,3-diacetoxipropilo y 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etilo y una mezcla de cualquiera de los lípidos anteriores.

La molécula de lípido anfipático extendido, también conocida como molécula de unión a receptor, comprende restos proximal, medio y distal. El resto proximal conecta la molécula de lípido extendido al construtto, y el resto distal dirige el construtto a un receptor presentado por un hepatocito. Los restos proximal y distal se conectan a través de un resto medio. La composición de diversas moléculas de unión a receptor se describe a continuación. Dentro de un construtto lipídico, pueden estar presentes moléculas de unión a receptor de hepatocitos de uno o más de los grupos enumerados a continuación para unir el construtto a receptores en los hepatocitos.

Un grupo de moléculas de unión a receptor de hepatocitos comprende un resto biotina o iminobiotina terminal, así como derivados de los mismos. Las fórmulas estructurales de biotina, iminobiotina, carboxibiotina y biocitina se muestran en la tabla 1.

30 Tabla 1

1	<p>1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina</p> <p>fosfato de 2,3-bis(estearoiloxi)propilo y 2-(trimetilamonio)-etilo</p>	
2	<p>1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina</p> <p>fosfato de 2,3-bis(palmitoiloxi)propilo y 2-(trimetilamonio)-etilo</p>	
3	<p>1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina</p> <p>fosfato de 2,3-bis(tetradecanoiloxi)propilo y 2-(trimetilamonio)-etilo</p>	

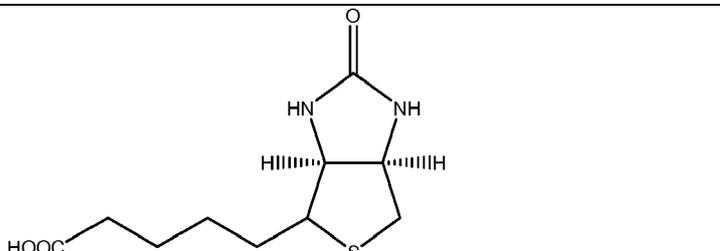
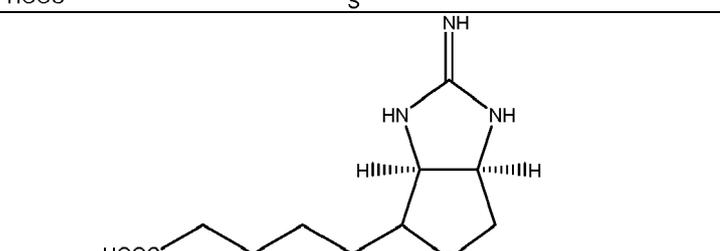
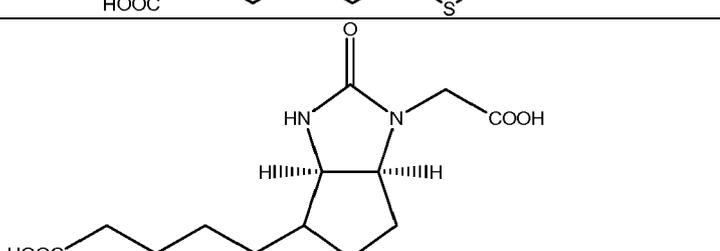
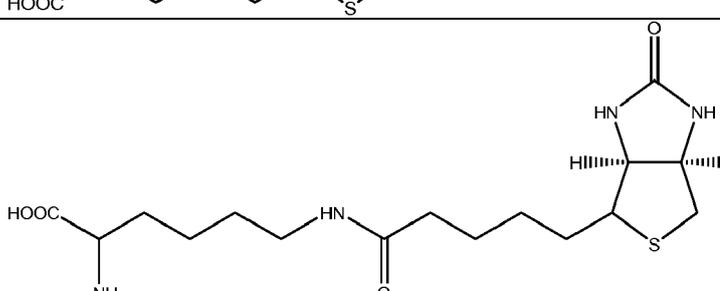
<p>4</p>	<p>Colesterol</p> <p>10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol</p>	
----------	--	--

Estas moléculas pueden unirse a una molécula de fosfolípido usando una variedad de técnicas para crear moléculas de anclaje de lípido que pueden intercalarse en un constructo lipídico. Estas moléculas de unión a receptor de hepatocitos comprenden una parte de anclaje ubicada en la posición proximal con respecto al constructo lipídico. La parte de anclaje comprende dos cadenas hidrocarbonadas lipófilas que pueden asociarse y unirse con otras cadenas hidrocarbonadas lipófilas en moléculas de fosfolípido dentro del constructo lipídico.

5

Un segundo grupo de moléculas de unión a receptor de hepatocitos pueden comprender un resto biotina o iminobiotina terminal ubicado en la posición distal con respecto al constructo lipídico. Las estructuras de tales compuestos se facilitan en la tabla 2.

Tabla 2.

<p>1</p>	<p>Biotina</p> <p>ácido 5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoico</p>	
<p>2</p>	<p>Iminobiotina</p> <p>ácido 5-((3aS,6aR)-2-iminohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoico</p>	
<p>3</p>	<p>Carboxibiotina</p> <p>ácido 5-((3aS,6aR)-1-(carboximetil)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoico</p>	
<p>4</p>	<p>Biocitina</p> <p>ácido 2-amino-6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanoico</p>	

10 Tanto biotina como iminobiotina contienen una estructura de anillos bicíclica levemente lipófila unida a una cadena de ácido valérico de cinco carbonos en la posición del carbono 4 en el anillo bicíclico. Puede unirse de manera covalente el aminoácido L-lisina al grupo funcional carboxilo C-terminal del ácido valérico haciendo reaccionar el grupo carboxilo en el ácido valérico con o bien el grupo  $\alpha$ -amino N-terminal o bien el grupo  $\epsilon$ -amino de L-lisina. Esta reacción de acoplamiento se realiza usando métodos de conjugación de carbodiimida y da como resultado la formación de un enlace amida entre L-lisina y biotina, tal como se ilustra en la figura 2.

15

Un tercer grupo de moléculas de unión a receptor de hepatocitos comprenden iminobiotina, carboxibiotina y biocitina con la cadena lateral de ácido valérico unida mediante un enlace amida o bien al grupo  $\alpha$ -amino o bien al grupo  $\varepsilon$ -amino del aminoácido L-lisina. Puede usarse iminobiotina para formar un resto iminobiocitina tal como se muestra en la figura 3. Durante la síntesis de la molécula de unión a receptor de hepatocitos, puede reaccionar el grupo  $\alpha$ -amino de iminobiocitina con la benzoil-tioacetil-triglicina-sulfo-N-hidroxisuccinimida activada con éster (BTA-3-Gly-sulfo-NHS) para formar la molécula de unión a hepatocitos activa (BTA-3-Gly-iminobiocitina) tal como se muestra en la figura 4. BTA-3-Gly-iminobiocitina funciona como espaciador molecular que expresa, en última instancia, un grupo funcional sulfhidrilo nucleófilo activo que puede usarse en posteriores reacciones de acoplamiento. El espaciador está ubicado en la posición media en relación con el constructo lipídico y permite que el resto iminobiocitina terminal se extienda aproximadamente treinta ángstroms desde la superficie del constructo lipídico para desarrollar una orientación óptima y no restringida de iminobiocitina para la unión al receptor de hepatocitos. El espaciador medio puede incluir otros derivados que proporcionen la orientación estereoquímica correcta al resto biotina terminal. La principal función del espaciador medio es conectar de manera covalente y de manera apropiada los restos proximal y distal en una disposición lineal.

La parte de BTA-3-Gly-sulfo-NHS de la molécula de unión a receptor de hepatocitos puede sintetizarse mediante varios medios y unirse en etapas posteriores a biocitina o iminobiocitina. La etapa inicial comprende añadir cloruro de benzoilo a ácido tioacético para formar mediante adición nucleófila un grupo protector para la funcionalidad tio activa. Los productos de reacción son el complejo de ácido benzoil-acético y ácido clorhídrico, tal como se muestra en la figura 5. Etapas adicionales en la síntesis implican hacer reaccionar el ácido benzoil-acético con sulfo-N-hidroxisuccinimida usando dicitohexilcarbodiimida o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida como agente de acoplamiento para formar benzoil-tioacetil-sulfo-N-hidroxisuccinimida (BTA-sulfo-NHS), tal como se representa en la figura 5. Entonces se hace reaccionar la benzoil-tioacetil-sulfo-N-hidroxisuccinimida con el polímero de aminoácidos (glicina-glicina-glicina). Tras el ataque nucleófilo por el grupo  $\alpha$ -amino de triglicina, se forma benzoil-tioacetil-triglicina-(BTA-3-Gly) mientras que se solubiliza el grupo saliente sulfo-N-hidroxisuccinimida por los medios acuosos, tal como se muestra en la figura 5. Se hace reaccionar de nuevo la benzoil-tioacetil-triglicina con dicitohexilcarbodiimida o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida para formar un enlace éster con sulfo-N-hidroxisuccinimida, tal como se muestra en la figura 6. Entonces se hace reaccionar el éster de sulfo-N-hidroxisuccinimida de benzoil-tioacetil-triglicina-(BTA-3-Gly-sulfo-NHS) activado con el grupo  $\alpha$ -amino de la funcionalidad L-lisina de biocitina o iminobiocitina para formar el resto de unión a receptor de hepatocitos, la molécula de lípido anfipático extendido de benzoil-tioacetil-triglicina-iminobiocitina (BTA-3-Gly-iminobiocitina) ilustrada en la figura 7.

Se ilustra una segunda reacción principal de acoplamiento para la síntesis de una molécula de unión a receptor de hepatocitos en la que se une de manera covalente benzoil-tioacetil-triglicina-iminobiocitina a través de un enlace tioéter a una N-para-maleimidofenilbutirato-fosfatidiletanolamina, una molécula de anclaje de fosfolípido preferida. Esta reacción da como resultado una molécula que proporciona la separación molecular correcta entre el anillo de iminobiocitina terminal y el constructo lipídico. Se representa un esquema de reacción completo para formar una molécula de unión a receptor de hepatocitos que funciona como molécula de lípido anfipático extendido en la figura 8. Antes de hacer reaccionar benzoil-tioacetil-triglicina-iminobiocitina con N-para-maleimidofenilbutirato-fosfatidiletanolamina para formar una unión tioéter, se elimina el grupo protector benzoilo calentando con el fin de exponer la funcionalidad sulfhidrilo libre. Debe realizarse la reacción en un entorno libre de oxígeno para minimizar la oxidación de los sulfhidrilos al disulfuro. Además la oxidación podría conducir a la formación de un derivado de sulfona, sulfóxido, ácido sulfénico o ácido sulfónico.

El resto de anclaje de la molécula puede contener un par de cadenas hidrocarbonadas de acilo que forman una parte de lípido de la molécula. Esta parte de la molécula se une de manera no covalente dentro de los dominios de lípido del constructo lipídico. El resto de anclaje puede producirse a partir de N-para-maleimidofenilbutirato-fosfatidiletanolamina. Pueden usarse otras moléculas de anclaje. Las moléculas de anclaje pueden incluir tio-colesterol, oleato de colesterol, fosfato de dicetilo; 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (sal de sodio), y mezclas, de los mismos. Se muestra toda la estructura molecular de la molécula de unión al receptor de hepatocitos y de anclaje lipídico totalmente desarrollada designada como LA-HRBM en la figura 8.

Un cuarto grupo de molécula de unión a receptor de hepatocitos comprende moléculas orgánicas anfipáticas que tienen tanto un resto soluble en agua como un resto insoluble en agua. El resto insoluble en agua reacciona con un resto medio o conector mediante reacciones químicas de coordinación y bioconjugación, mientras que el resto insoluble en agua se une al receptor de unión a hepatocitos en el hígado. La molécula contiene un componente distal que comprende o bien mediante una estructura de anillo de benceno derivatizada apolar, tal como un derivado de 2,6-diisopropilbenceno, o bien mediante una estructura de anillos heterobíciclica lipófila. Toda la molécula de unión a receptor de hepatocitos presenta cargas fijas o transitorias, o bien positivas o bien negativas, o diversas combinaciones de las mismas. Estas moléculas contienen al menos un grupo carbonilo ubicado a una distancia igual a o menor de, pero no mayor de, aproximadamente 13,5 ángstroms desde el extremo terminal del resto distal, y al menos un resto carbamoilo que contiene un grupo carbonilo y un grupo de amina secundaria. La presencia de un resto o restos carbamoilo potencia la estabilidad molecular de la molécula orgánica. Una pluralidad de aminas secundarias pueden estar presentes dentro de la molécula. Estas aminas secundarias contienen un par de

electrones no compartidos que permiten interacciones de unión ion-dipolo y dipolo-dipolo con otras moléculas dentro del constructo. Estas aminas potencian la estabilidad molecular y proporcionan una carga negativa parcialmente creada que interacciona con el resto distal para fomentar la especificidad y unión al receptor de hepatocitos. Un ejemplo de este grupo de moléculas de unión a receptor es policromo-poli(bis)-[ácido N-(2,6-(diisopropilfenil)carbamoil-metil)iminodiacético]. El cromo III puede estar ubicado en la posición media de la molécula de unión a receptor de hepatocitos. El resto proximal de la molécula de unión específica a hepatocitos contiene estructuras hidrófobas y/o apolares que permiten que se intercalen las moléculas en, y posteriormente se unan dentro de, el constructo lipídico. Los restos medio y proximal también permiten la orientación estereoquímica correcta de la parte distal de la molécula de unión a receptor de hepatocitos.

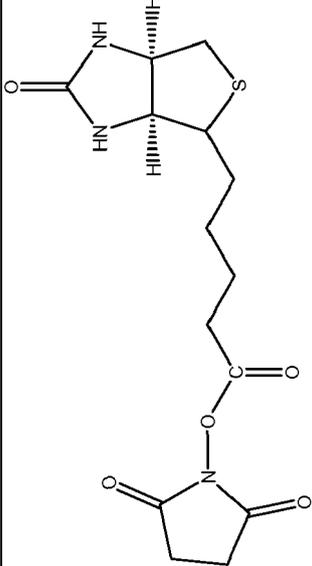
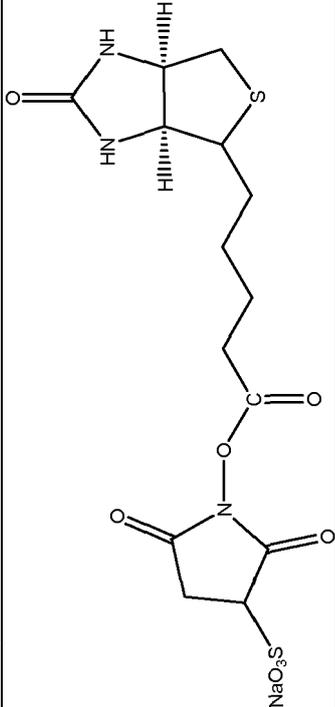
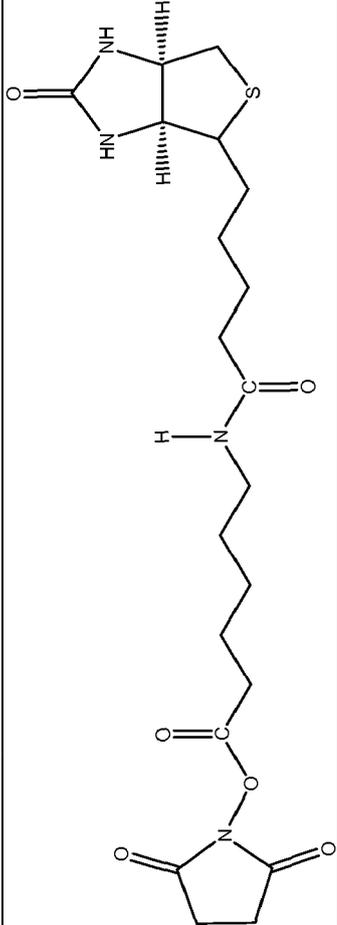
La estructura y las propiedades del constructo lipídico están regidas por la estructura de los lípidos y la interacción entre lípidos. La estructura de los lípidos está regida principalmente por enlaces covalentes. Los enlaces covalentes es la fuerza de unión molecular necesaria para retener la integridad estructural de las moléculas que comprenden los constituyentes individuales del constructo lipídico. A través de interacciones no covalentes entre lípidos, el constructo lipídico se mantiene en una conformación tridimensional.

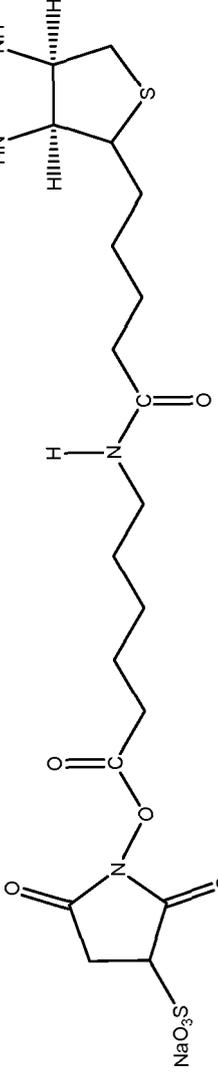
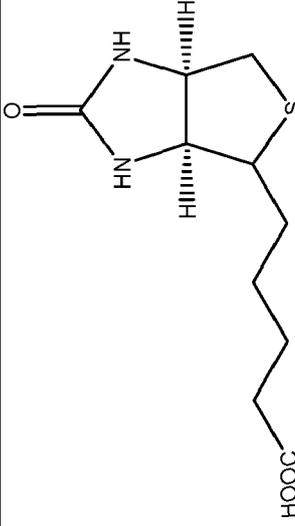
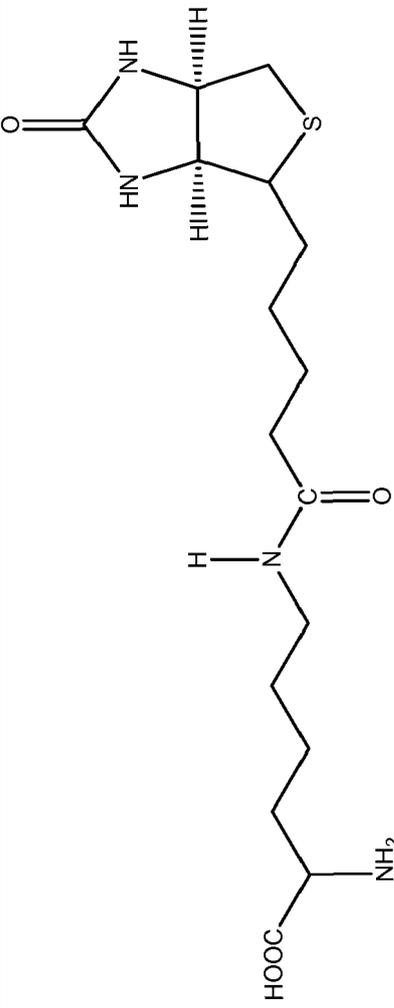
El enlace no covalente puede representarse en términos generales mediante un enlace ion-dipolo o ion-dipolo inducido, y mediante los enlaces de hidrógeno asociados con los diversos grupos polares en la cabeza del lípido. Pueden generarse enlaces hidrófobos e interacciones de van der Waals a través de asociaciones de dipolo inducido entre las cadenas de acilo de lípido. Estos mecanismos de unión son de naturaleza transitoria y dan como resultado un proceso de formación de enlaces y de ruptura de enlaces que se produce en un intervalo de tiempo por debajo de los femtosegundos. Por ejemplo, surgen interacciones de van der Waals de un cambio momentáneo en el momento dipolar que surge de un breve desplazamiento de electrones de orbitales de un lado de un átomo o molécula, creando un desplazamiento similar en átomos o moléculas adyacentes. El protón adopta una carga  $\delta^+$  y el electrón individual una carga  $\delta^-$ , formando así un dipolo. Se producen interacciones dipolares con gran frecuencia entre las cadenas de acilo hidrocarbonadas de moléculas de lípido anfipático. Una vez que se forman dipolos individuales, pueden inducir momentáneamente una nueva formación de dipolos en átomos vecinos que contienen una funcionalidad metilénica (-CH<sub>2</sub>-). Una pluralidad de interacciones dipolares inducidas de manera transitoria se forman entre cadenas lipídicas de acilo en la totalidad del constructo lipídico. Estas interacciones dipolares inducidas duran sólo una fracción de un femtosegundo ( $1 \times 10^{-15}$  s) pero ejercen una fuerza intensa cuando funcionan colectivamente. Estas interacciones están cambiando constantemente y tienen una fuerza de aproximadamente una veinteaava parte de la intensidad de un enlace covalente. No obstante, son responsables de los enlaces transitorios entre moléculas covalentes estables que determinan la estructura estadística tridimensional del constructo y la orientación molecular estereoespecífica de moléculas dentro del constructo lipídico.

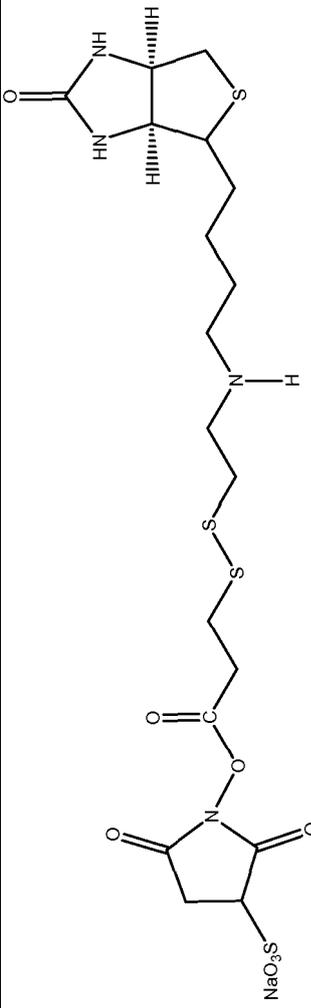
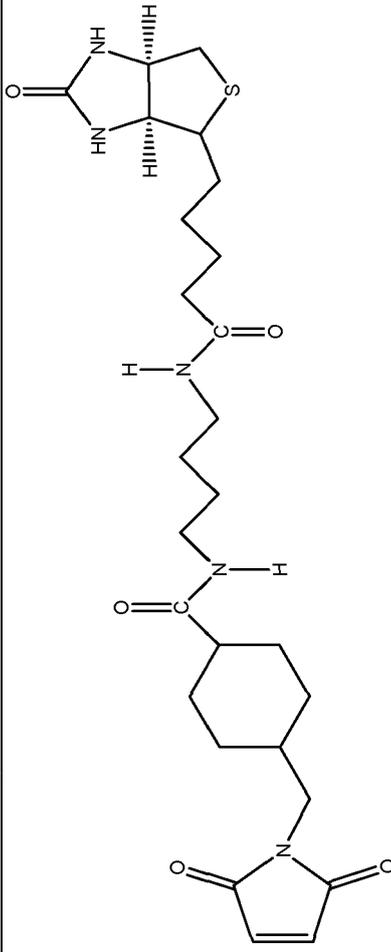
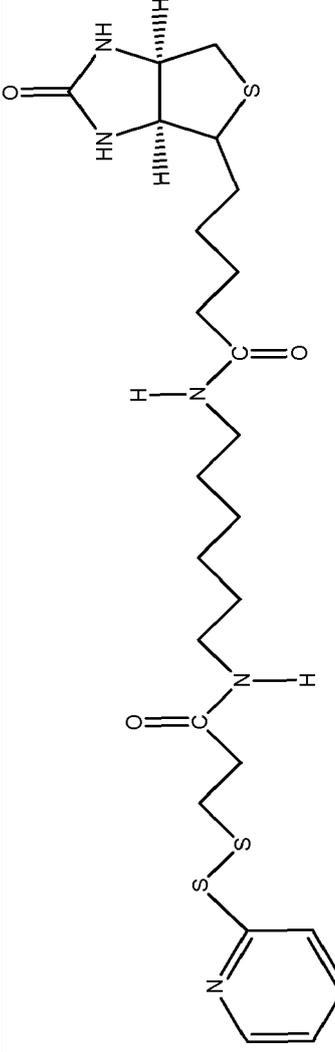
Como consecuencia de estas interacciones dipolares inducidas, la estructura del constructo lipídico se mantiene mediante el intercambio de componentes lipídicos entre constructos. Aunque la composición de los componentes individuales del constructo es fija, los componentes individuales de los constructos lipídicos están sujetos a reacciones de intercambio entre constructos. Estos intercambios están regidos inicialmente por una cinética de orden cero cuando un componente lipídico sale de un constructo lipídico. Después de liberarse el componente lipídico del constructo lipídico, puede volver a captarse por un constructo lipídico vecino. La recaptación del componente liberado está controlada por una cinética de reacción de segundo orden, que se ve afectada por la concentración del componente liberado en medios acuosos alrededor del constructo que capta el componente y la concentración del constructo lipídico que capta el componente liberado.

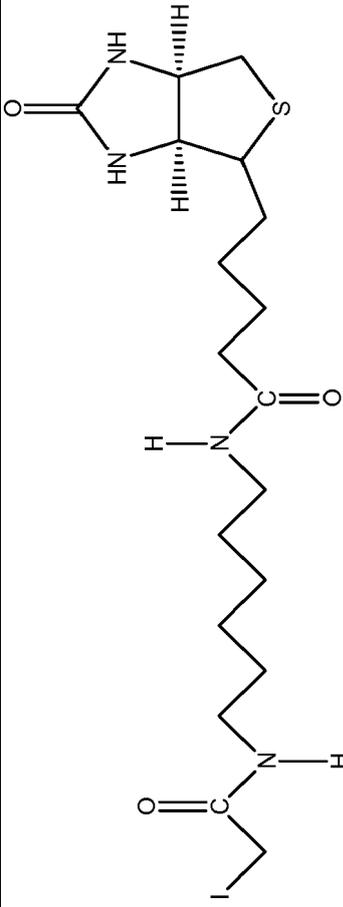
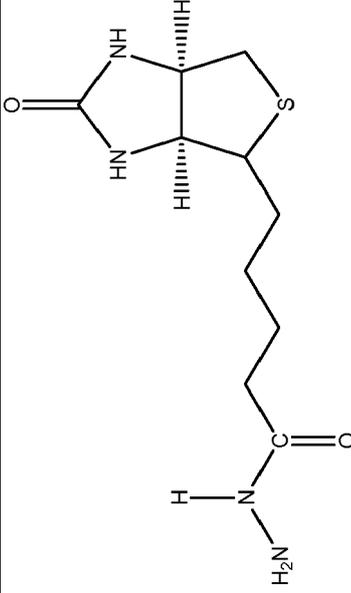
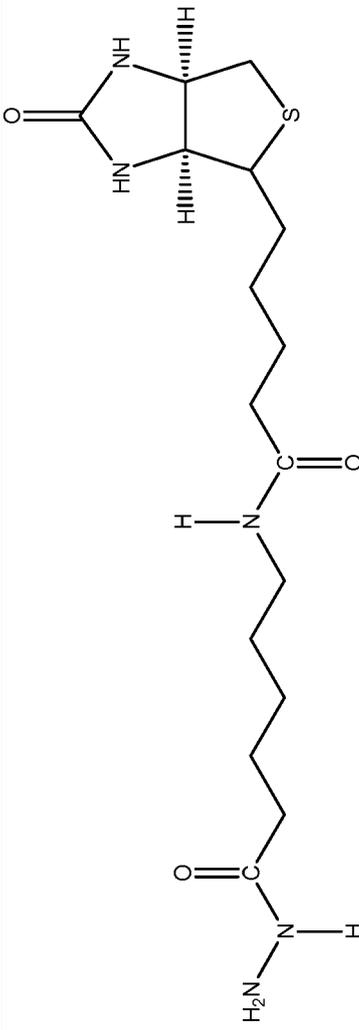
Ejemplos de lípidos anfipáticos extendidos, junto con sus identificadores respectivos, mostrados en la tabla 3 junto con sus nombres químicos, son: N-hidroxisuccinimida (NHS)-biotina [1]; sulfo-NHS-biotina [2]; N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga [3], sulfo-N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga [4]; D-biotina [5]; biocitina [6]; sulfo-N-hidroxisuccinimida-S-S-biotina [7]; biotina-BMCC [8]; biotina-HPDP [9]; yodoacetil-LC-biotina [10]; hidrazida de biotina [11]; hidrazida de biotina-LC [12]; hidrazida de biocitina [13]; biotina-cadaverina [14]; carboxibiotina [15]; fotobiotina [16]; trifluoroacetato de *p*-aminobenzoil-biocitina [17]; *p*-diazobenzoil-biocitina [18]; biotina-DHPE [19]; biotina-X-DHPE [20]; ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico [21]; éster succinidimílico del ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico [22]; S-biotinil-homocisteína [23]; biocitina-X [24]; hidrazida de biocitina X [25]; biotina-etilendiamina [26]; biotina-XL [27]; biotina-X-etilendiamina [28]; hidrazida de biotina-XX [29]; biotina-XX-SE [30]; biotina-XX, SSE [31]; biotina-X-cadaverina [32];  $\alpha$ -(t-BOC)biocitina [33]; N-(biotinil)-N'-(yodoacetil)etilendiamina [34]; DNP-X-biocitina-X-SE [35]; hidrazida de biotina-X [36]; clorhidrato de norbiotinamina [37]; 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina [38]; ARP [39]; sulfóxido de biotina-1 [40]; éster metílico de biotina [41]; biotina-maleimida [42]; biotina-poli(etilenglicol)amina [43]; sal de sodio del ácido (+)-biotina-4-amidobenzoico [44]; 2-N-acetilamino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido de biotina [45]; biotina- $\alpha$ -D-N-acetilneuraminida [46];  $\alpha$ -L-fucósido de biotina [47]; lacto-N-bióside de biotina [48]; trisacárido de biotina-Lewis-A [49]; tetrasacárido de biotina-Lewis-Y [50];  $\alpha$ -D-manopiranosido de biotina [51]; 6-O-fosfo- $\alpha$ -D-manopiranosido de biotina [52]; y ácido policromo-poli(bis)-[N-(2,6-(diisopropilfenil)carbamoil-metil)imino]diacético [53].

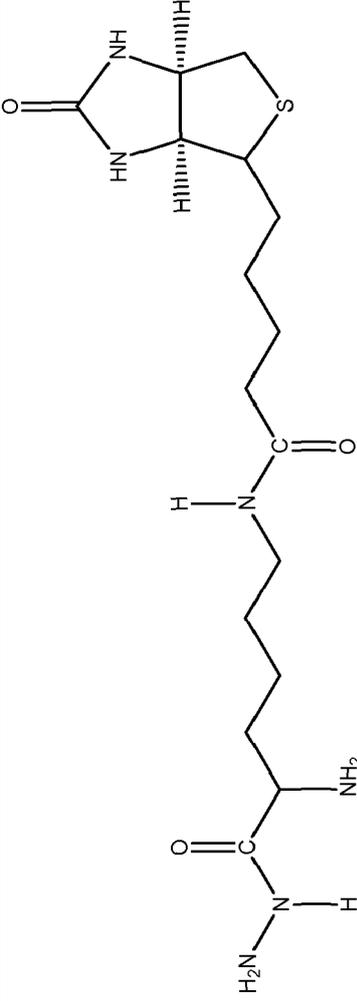
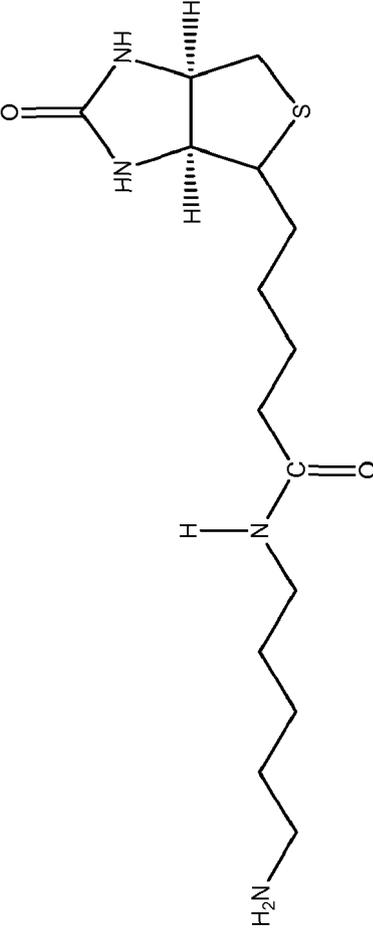
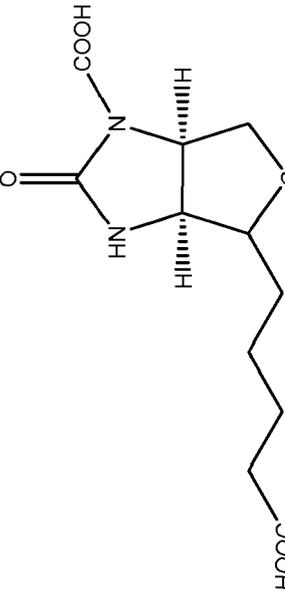
Tabla 3.

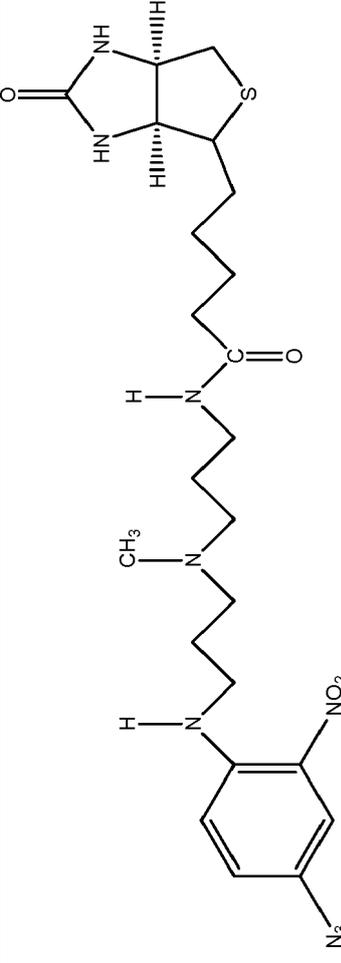
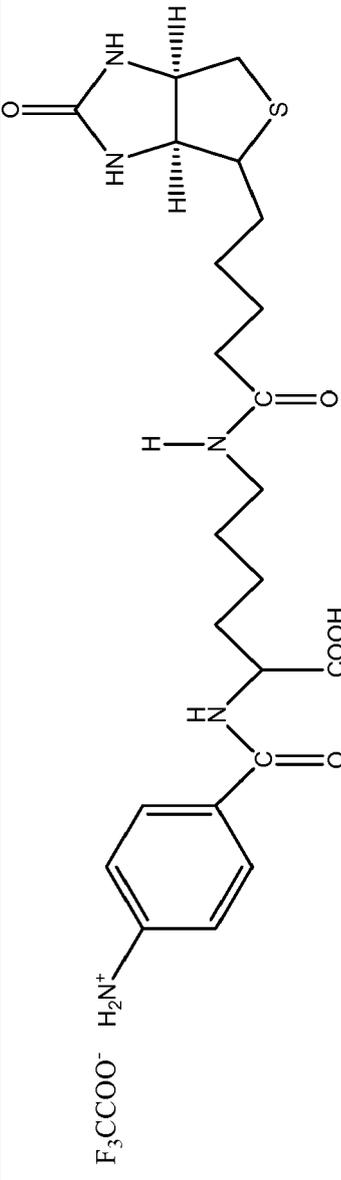
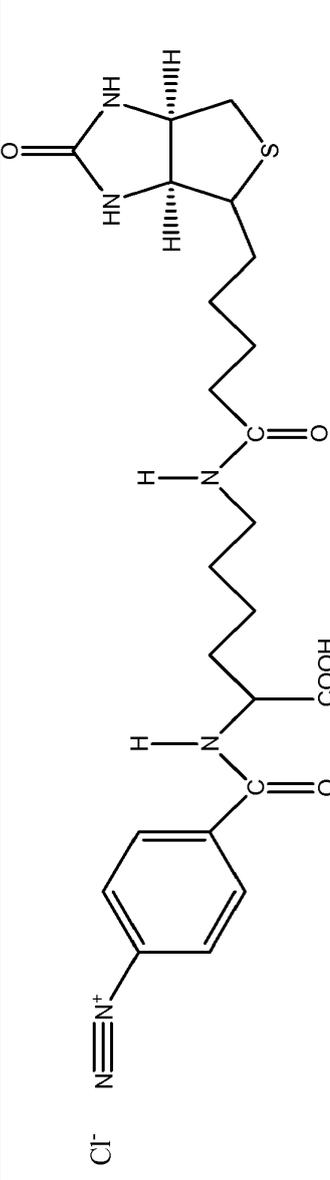
1	<p>N-hidroxisuccinimida (NHS)-biotina</p> <p>5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo</p>	
2	<p>sulfo-NHS-biotina</p> <p>2,5-dioxo-3-(trioxidanilitio)pirrolidin-1-il-5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de sodio</p>	
3	<p>N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga</p> <p>6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo</p>	

<p>4</p>	<p>sulfo-N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga</p> <p>2,5-dioxo-3-(trioxidantilitio)pirrolidin-1-il-6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanoato de sodio</p>	
<p>5</p>	<p>D-biotina</p> <p>ácido 5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoico</p>	
<p>6</p>	<p>Biotitina</p> <p>ácido 2-amino-6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanoico</p>	

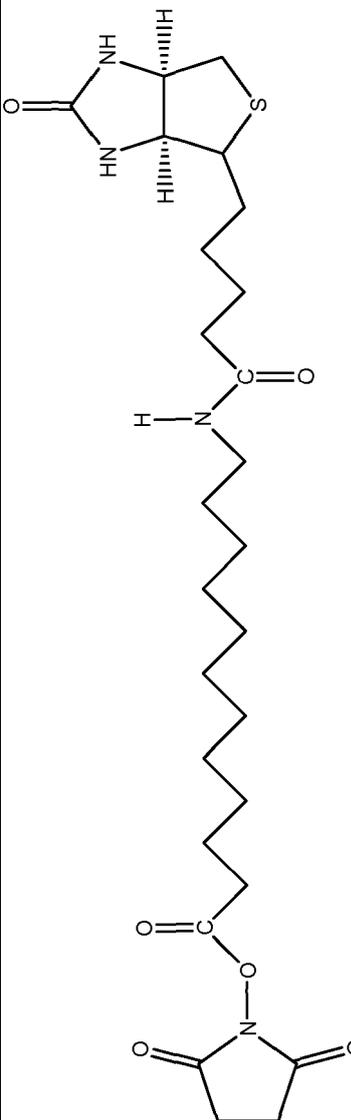
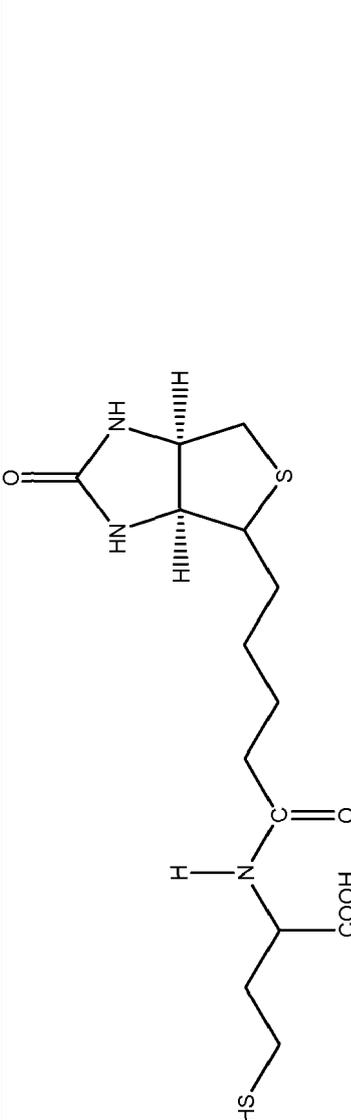
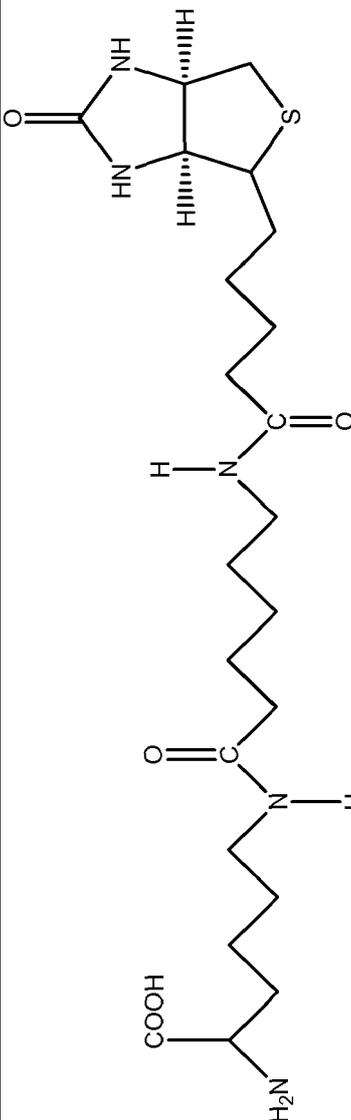
<p>7</p> <p>sulfio-N-hidroxisuccinimida-S-S-biotina</p> <p>2,5-dioxo-3-(trioxidanyl)pirrolidin-1-il-3-((2-(4-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)butilamino)etil)-disulfanil)propanoato de sodio</p>	
<p>8</p> <p>biotina-BMCC</p> <p>4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-N-(4-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)butil)ciclohexanocarboxamida</p>	
<p>9</p> <p>biotina-HPDP</p> <p>5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)-N-(6-(3-(piridin-2-il)disulfanil)propanamido)hexil)pentanamida</p>	

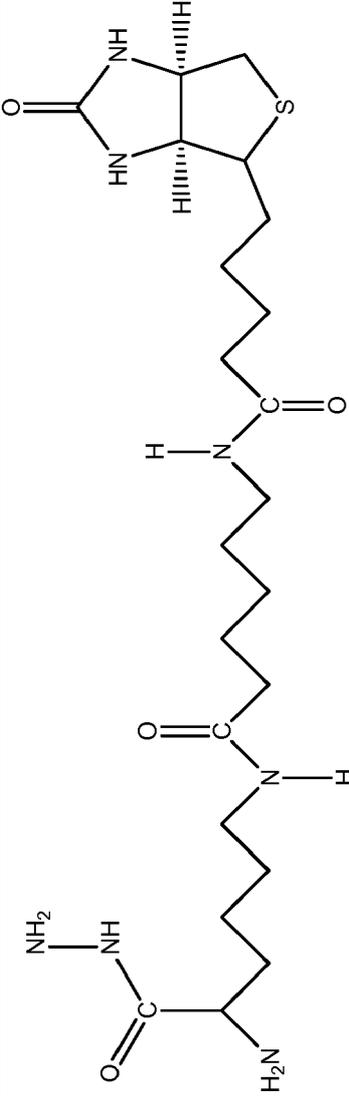
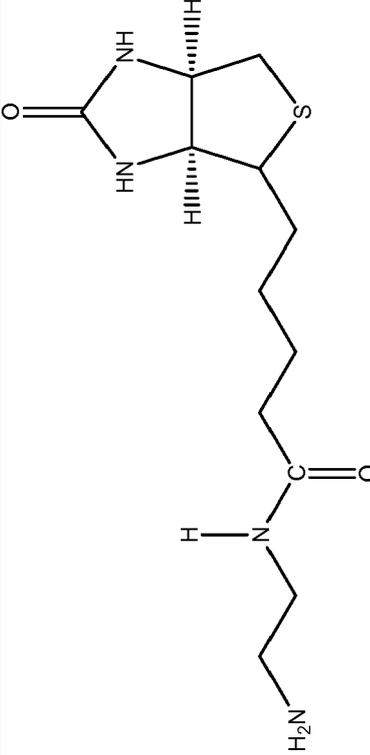
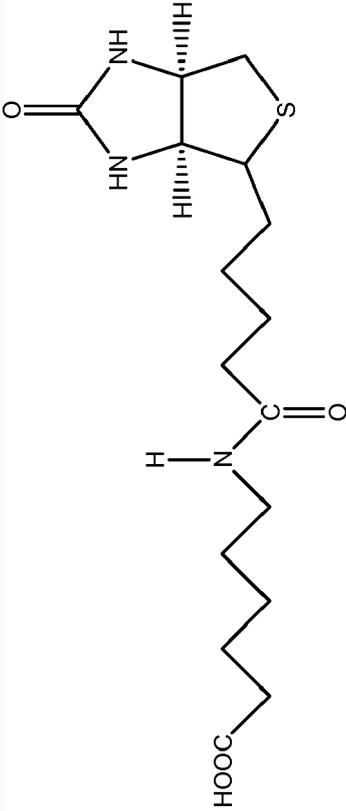
10	<p>yodoacetil-L-C-biotina</p> <p>N-(6-(2-yodoacetamido)hexil)-5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida</p>	
11	<p>hidrazida de biotina</p> <p>5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanohidrazida</p>	
12	<p>hidrazida de biotina-LC</p> <p>N-(6-hidrazinil-6-oxohexil)-5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida</p>	

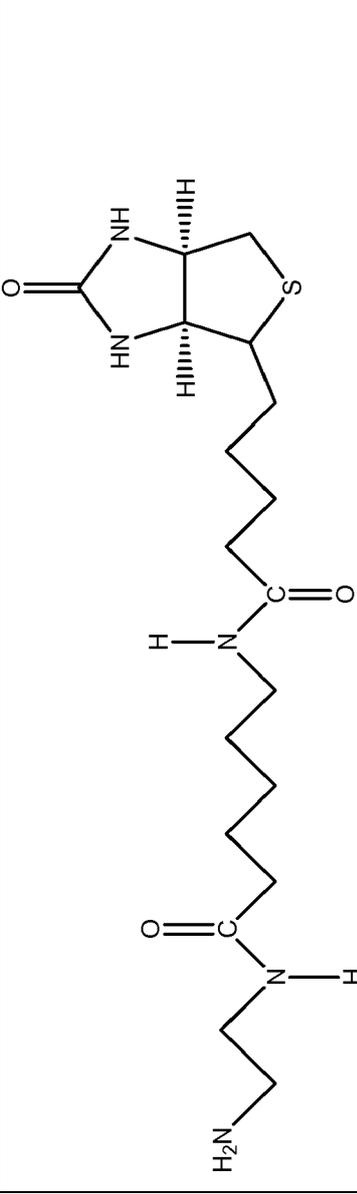
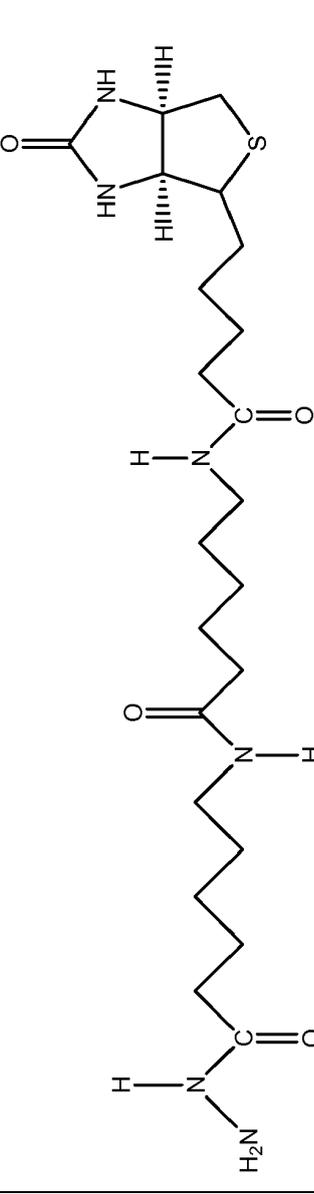
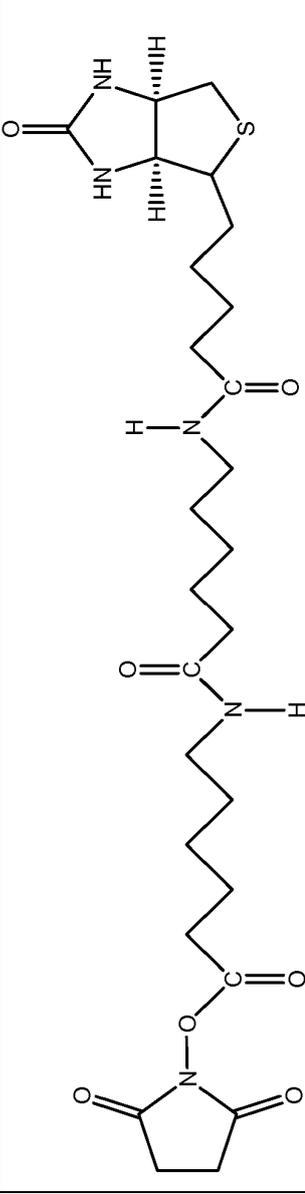
<p>13 hidrazida de biocitina</p> 	<p>N-(5-amino-6-hidrazinil-6-oxohexil)-5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida</p>
<p>14 biotina-cadaverina</p> 	<p>N-(5-aminopentil)-5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida</p>
<p>15 Carboxibiotina</p> 	<p>ácido (3aS,6aR)-4-(4-carboxibutil)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-1-carboxílico</p>

16	<p>Fotobiotina</p> <p>N-(3-(3-(4-azido-2-nitrofenilamino)propil)(metil)amino)propil)-5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida</p>	
17	<p>trifluoroacetato de <i>p</i>-aminobenzoil-biotina</p> <p>2,2,2-trifluoroacetato del ácido 2-(4-aminobenzamido)-6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanoico</p>	
18	<p><i>p</i>-diazobenzoil-biotina</p> <p>cloruro de 4-(1-carboxi-5-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)pentilcarbamoil)benzenodiazonio</p>	

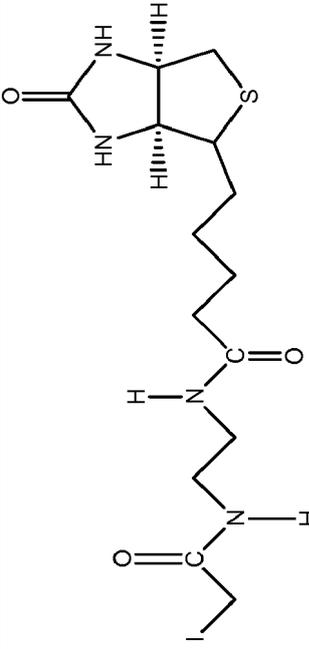
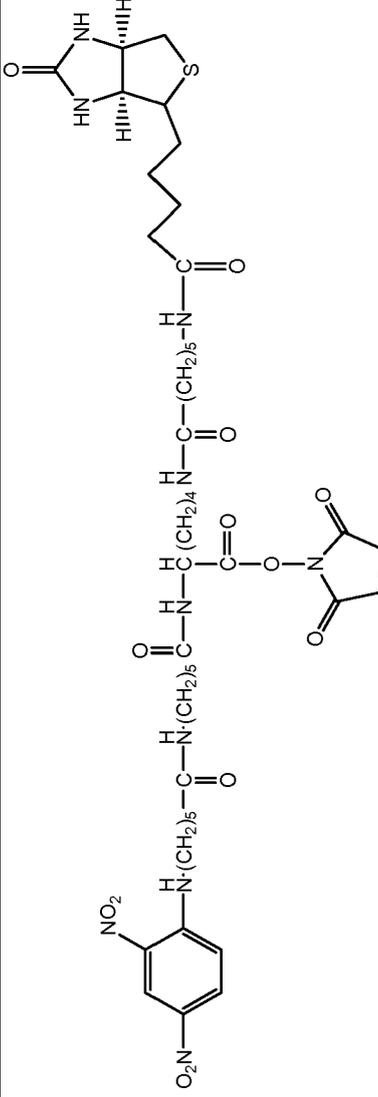
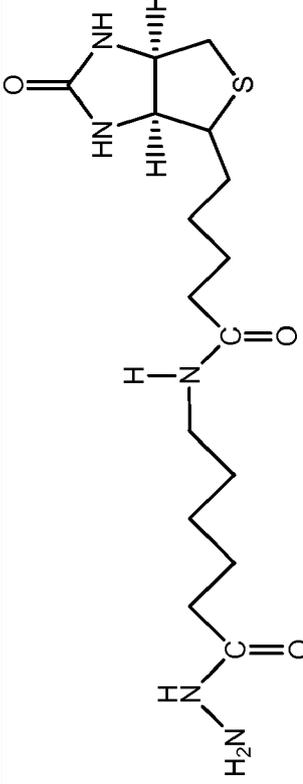
19	<p>biotina-DHPE</p> <p>fosfato de trietilamnio-2,3-diacetoxipropilo y 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etilo</p>	
20	<p>biotina-X-DHPE</p> <p>fosfato de trietilamnio-2,3-diacetoxipropilo y 2-(6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)etilo</p>	
21	<p>ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico</p> <p>ácido 12-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)dodecanoico</p>	

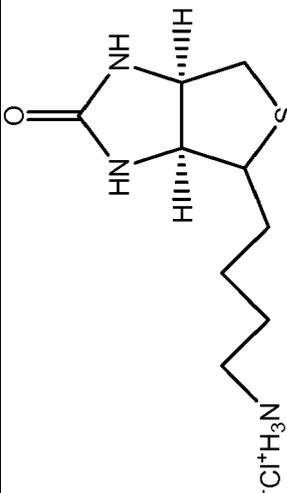
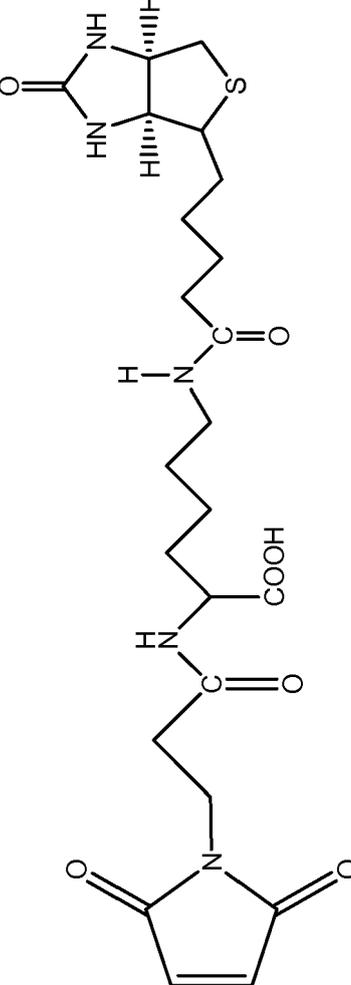
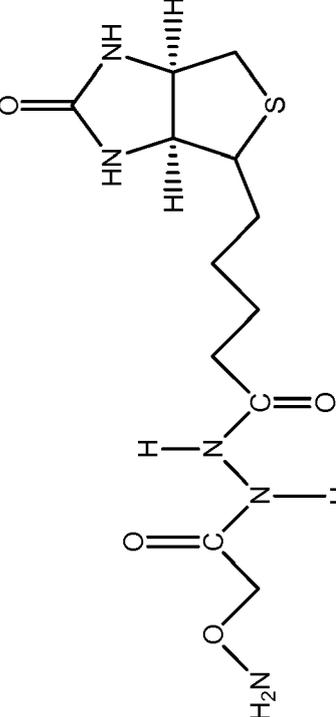
22	<p>éster succinimidílico del ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico</p> <p>12-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)dodecanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo</p>	
23	<p>S-biotinil-homocisteína</p> <p>ácido 4-mercapto-2-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)butanoico</p>	
24	<p>biocitina-X</p> <p>ácido 2-amino-6-(6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)hexanoico</p>	

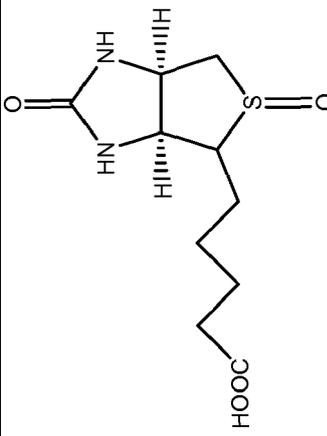
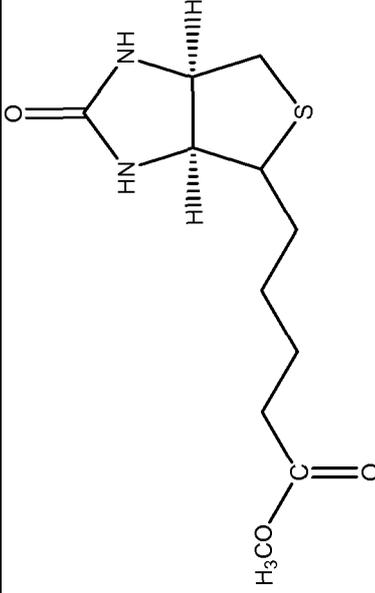
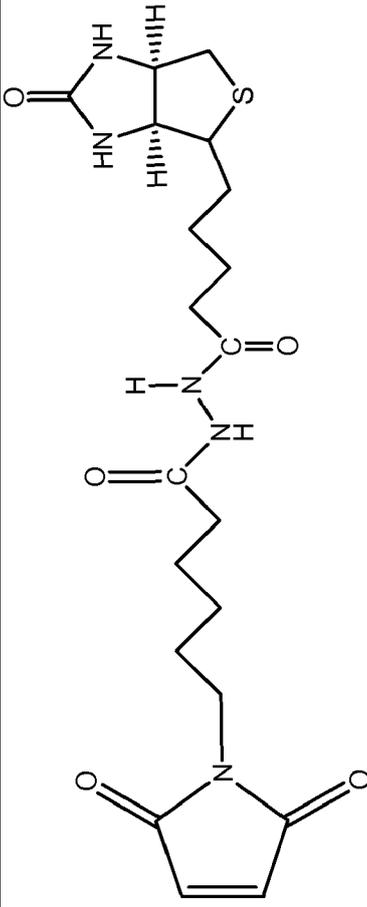
25	<p>hidrazida de biocitina X</p> <p>N-(5-amino-6-hidrazinil-6-oxohexil)-6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamida</p>	
26	<p>Biotina-etilendiamina</p> <p>N-(2-aminoetil)-5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida</p>	
27	<p>biotina-X</p> <p>ácido 6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanoico</p>	

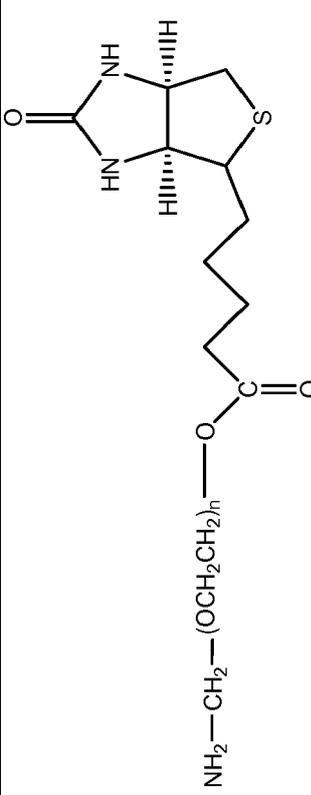
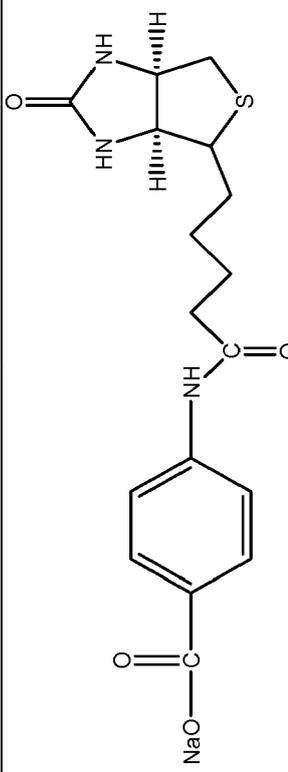
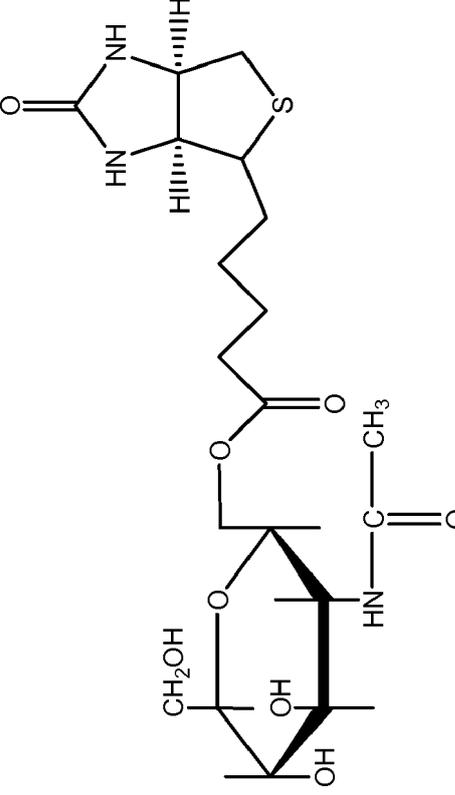
28	<p>biotina-X-etilendiamina</p> <p>N-(2-aminoetil)-6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-ii)pentanamido)hexanamida</p>	
29	<p>hidrazida de biotina-XX</p> <p>N-(6-hidrazinil-6-oxohexil)-6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-ii)pentanamido)hexanamida</p>	
30	<p>biotina-XX-SE</p> <p>6-(6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-ii)pentanamido)hexanamido)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo</p>	

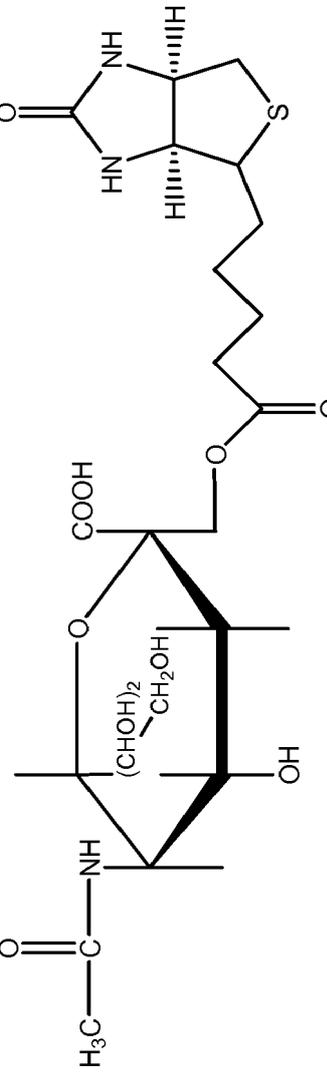
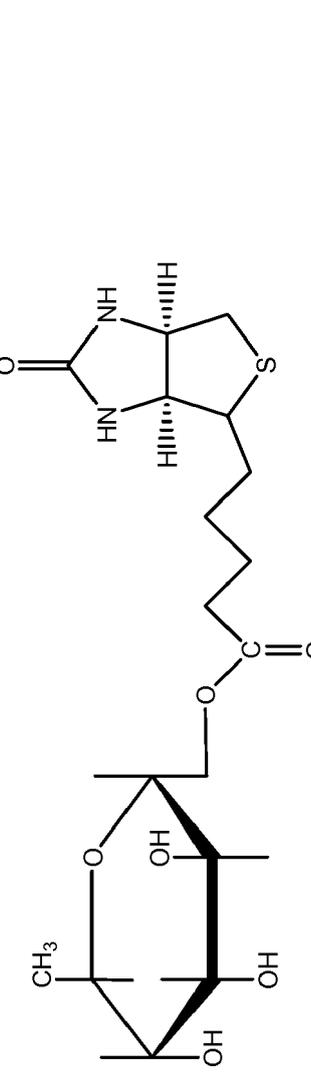
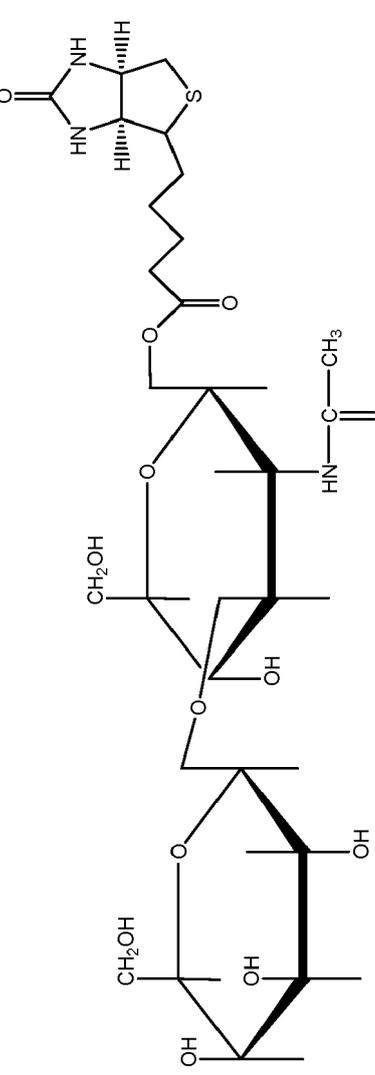


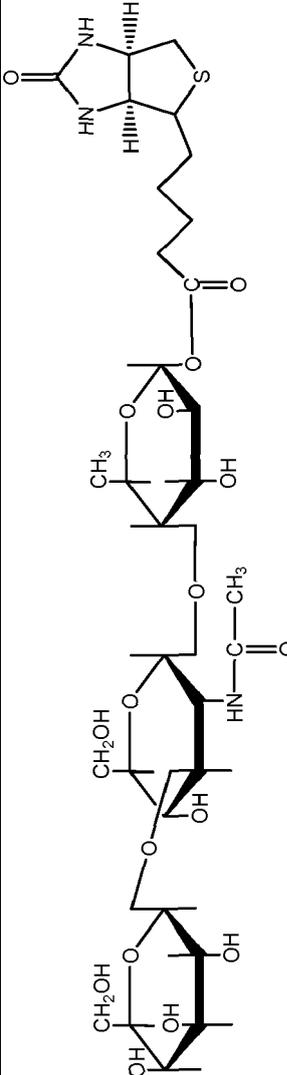
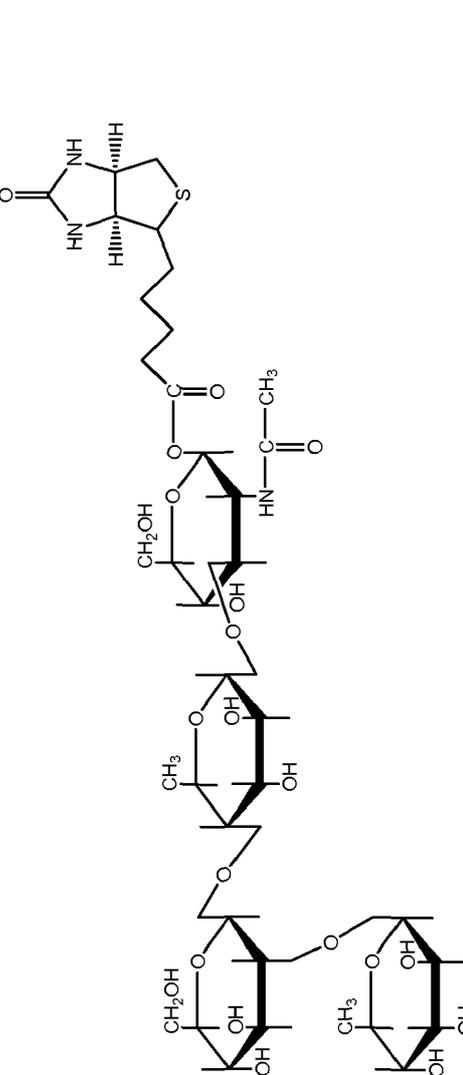
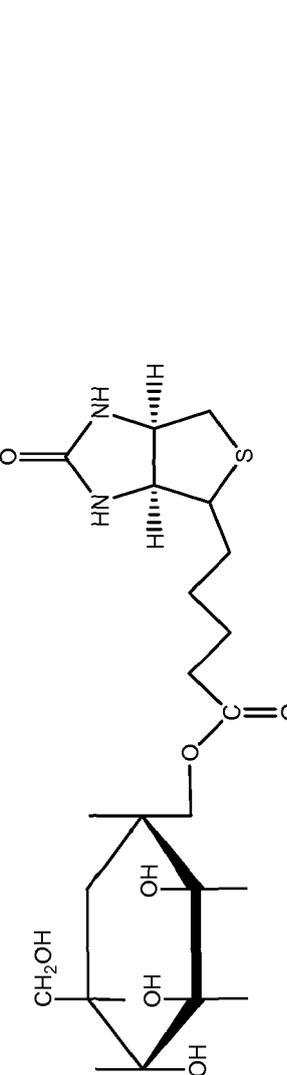
<p>34 N-(biotinil)-N'-(yodoacetil)etilendiamina N-(2-(2-yodoacetamido)etil)-5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida</p>	
<p>35 DNP-X-biotina-X-SE 2-(6-(6-(2,4-dinitrofenilamino)hexanamido)hexanamido)-6-(6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo</p>	
<p>36 hidrazida de biotina-X N-(6-hidrazinil-6-oxohexil)-5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida</p>	

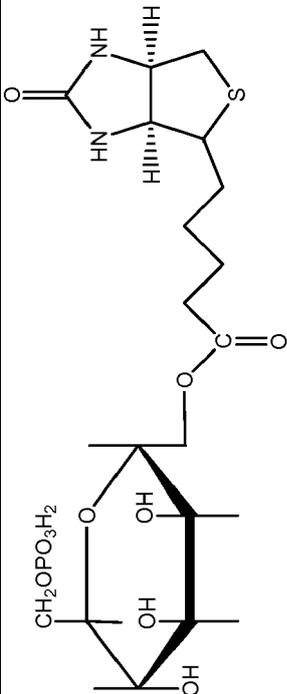
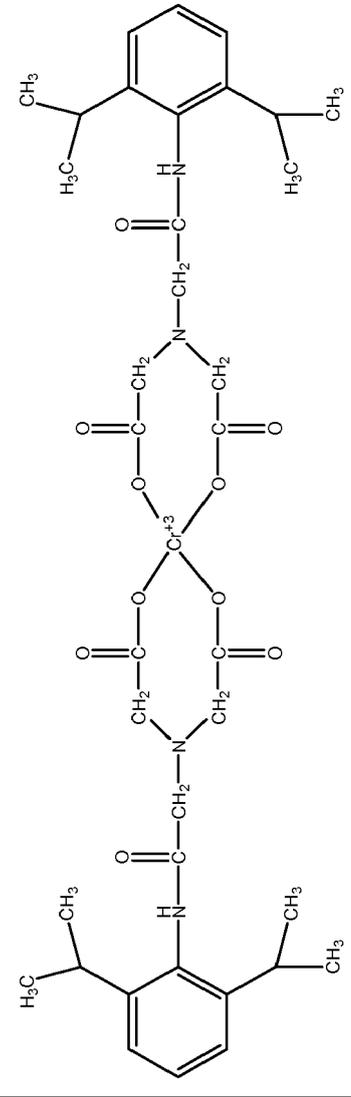
<p>37</p> <p>clorhidrato de norbiotinamina</p> <p>cloruro de 4-((3a<i>S</i>,6a<i>R</i>)-2-oxohexahidro-1<i>H</i>-tieno[3,4-<i>d</i>]imidazol-4-<i>il</i>)butan-1-aminio</p>	
<p>38</p> <p>3-(<i>N</i>-maleimidilpropionil)biotina</p> <p>ácido 2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1<i>H</i>-pirrol-1-<i>il</i>)propanamido)-6-(5-((3a<i>S</i>,6a<i>R</i>)-2-oxohexahidro-1<i>H</i>-tieno[3,4-<i>d</i>]imidazol-4-<i>il</i>)pentanamido)hexanoico</p>	
<p>39</p> <p>ARP;</p> <p><i>N</i>'-(2-(aminoxil)acetil)-5-((3a<i>S</i>,6a<i>R</i>)-2-oxohexahidro-1<i>H</i>-tieno[3,4-<i>d</i>]imidazol-4-<i>il</i>)pentanoimidrazida</p>	

<p>40</p> <p>sulfóxido de biotina-1</p> <p>sulfóxido del ácido 5-((3a<i>S</i>,6a<i>R</i>)-2-oxohexahidro-1<i>H</i>-tieno[3,4-<i>d</i>]imidazol-4-<i>il</i>)pentanoico</p>	
<p>41</p> <p>éster metílico de biotina</p> <p>5-((3a<i>S</i>,6a<i>R</i>)-2-oxohexahidro-1<i>H</i>-tieno[3,4-<i>d</i>]imidazol-4-<i>il</i>)pentanoato de metilo</p>	
<p>42</p> <p>biotina-maleimida</p> <p>6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1<i>H</i>-pirrol-1-<i>il</i>)-<i>N</i>'-(5-((3a<i>S</i>,6a<i>R</i>)-2-oxohexahidro-1<i>H</i>-tieno[3,4-<i>d</i>]imidazol-4-<i>il</i>)pentanoil)hexanoimidazida</p>	

43	<p>biotina-poli(etilenglicol)amina</p> <p>5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de aminometil-poli(etileno)</p>	
44	<p>sal de sodio del ácido (+)-biotina-4-amidobenzoico</p> <p>4-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)benzoato de sodio</p>	
45	<p>2-N-acetilamino-2-desoxi-β-D-glucopiranosido de biotina</p> <p>5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de ((2R,5S)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-2,3,4,5,6-pentametiltetrahidro-2H-piran-2-il)metilo</p>	

46	<p>biotina-<math>\alpha</math>-D-N-acetilneuraminida</p> <p>ácido (2S,5R)-5-acetamido-4-hidroxi-3,3,4,5,6-pentametil-2-((5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoiloxi)metil)-6-(1,2,3-trihidroxipropil)tetrahidro-2H-piran-2-carboxílico</p>	
47	<p><math>\alpha</math>-L-fucósido de biotina</p> <p>5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de ((2R,5S)-3,4,5-trihidroxi-2,3,4,5,6,6-hexametiltetrahidro-2H-piran-2-il)metilo</p>	
48	<p>lacto-N-biótido de biotina</p> <p>Para su nombre, véase el final de la tabla</p>	

<p>49</p>	<p>triacárido de biotina-Lewis-A Para su nombre, véase el final de la tabla</p>	
<p>50</p>	<p>tetrasacárido de biotina-Lewis-Y Para su nombre, véase el final de la tabla</p>	
<p>51</p>	<p><math>\alpha</math>-D-manopiranosido de biotina 5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de ((1R,4R)-2,3,4-trihidroxi-5-(hidroximetil)-1,2,3,4,5-pentametilciclohexil)metilo</p>	

52	<p>6-O-fosfo-<math>\alpha</math>-D-manopiranosido de biotina</p> <p>5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de ((2R,5S)-3,4,5-trihidroxi-2,3,4,5,6-pentametil-6-(fosfonooximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)metilo</p>	
53	<p>polícromo-poli(bis)-ácido (diisopropilfenil)carbamoil-metil)iminodiacético</p> <p>N-(2,6-</p>	

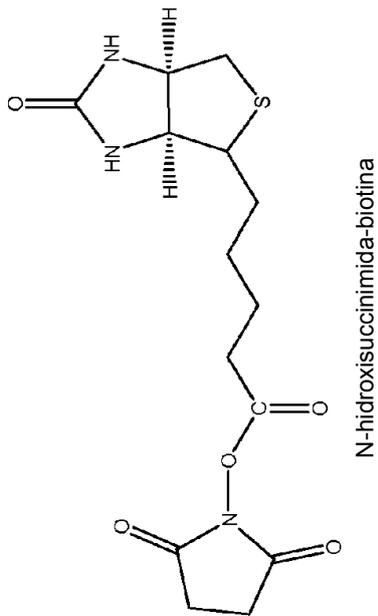
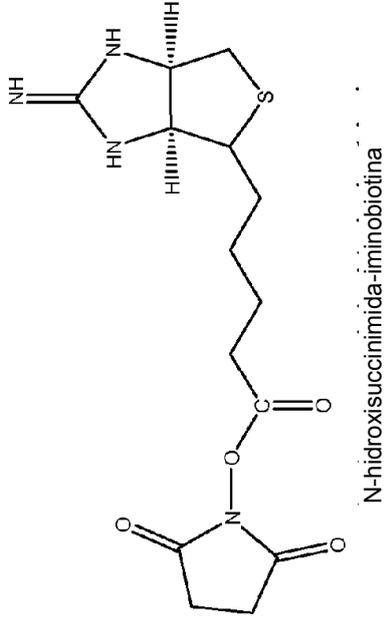
5 Nombres de los compuestos 48-50.

48. 5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato ((2R,5S)-3-acetamido-5-hidroxi-6-(hidroximetil)-2,3,4,6-tetrametil-4-(((2S,5R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)-2,3,4,5,6-pentametiltetrahidro-2H-piran-2-il)metilo y 5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de ((2R,5S)-3-acetamido-5-hidroxi-6-(hidroximetil)-2,3,4,6-tetrametil-4-(((2S,5R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)-2,3,4,5,6-pentametiltetrahidro-2H-piran-2-il)metoxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)metilo

49. 5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de (2R,3R,5S)-5-(((2S,3S,5S)-3-acetamido-5-hidroxi-6-(hidroximetil)-2,4,6-trimetil-4-(((2S,5R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)-2,3,4,5,6-pentametiltetrahidro-2H-piran-2-il)metoxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)metoxi)metil)-3,4,5,6-pentametiltetrahidro-2H-piran-2-ilo

50. 5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de (2S,5S)-3-acetamido-4-(((2R,5S)-5-(((2R,5S)-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-2,3,4,5,6-pentametil-3-(((2S,5S)-3,4,5-trihidroxi-2,3,4,5,6-hexametiltetrahidro-2H-piran-2-il)metoxi)metil)tetrahidro-2H-piran-2-il)metoxi)metil)-3,4,5,6-hexametiltetrahidro-2H-piran-2-il)metoxi)metil)-5-hidroxi-6-(hidroximetil)-2,3,4,5,6-pentametiltetrahidro-2H-piran-2-ilo

No se muestran las estructuras de los compuestos de iminobiotina en la tabla 3. Las estructuras de iminobiotina son análogos de la estructura de biotina en la que el grupo biotina se reemplaza por un grupo iminobiotina. Se muestra un ejemplo a continuación con los análogos N-hidroxisuccinimida-biotina y N-hidroxisuccinimida-iminobiotina.



Puede incorporarse un polímero de acetato-hidrogenofterato de celulosa en el constructo lipídico en el que pueden unirse grupos funcionales hidrófilos en la molécula de insulina y proteger a la insulina frente a la degradación hidrolítica. El acetato-hidrogenofterato de celulosa comprende dos moléculas de glucosa con uniones beta (1→4) en una disposición polimérica en la que algunos de los átomos de hidrógeno en los grupos hidroxilo del polímero se reemplazan por una funcionalidad acetilo (un grupo metilo unido a un grupo carbonilo) o un grupo fterato (representado por un anillo de benceno con dos grupos carboxilo en las posiciones primera y segunda del anillo de benceno). La fórmula estructural del polímero de acetato-hidrogenofterato de celulosa se muestra en la figura 9. Sólo un grupo carboxilo en la estructura de anillo de fterato participa en una unión éster covalente a la molécula de acetato de celulosa. El otro grupo carboxilo, que contiene un carbono carbonilo y una funcionalidad hidroxilo, participa en enlaces de hidrógeno con dipolos vecinos de carga negativa y positiva que residen en la insulina y diversas moléculas de lípido.

El polímero de acetato-hidrogenofterato de celulosa puede interactuar con los lípidos a través de enlaces ion-dipolo con moléculas de fosfato de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina y fosfato de dicetilo. Los enlaces ion-dipolo se producen entre el hidrógeno  $\delta^+$  en los grupos hidroxilo de celulosa y el átomo de oxígeno cargado negativamente en el resto fosfato de las moléculas de fosfolípido. Los grupos funcionales con el principal papel en la interacción ion-dipolo son los átomos de oxígeno cargados negativamente en los grupos fosfato de las moléculas de fosfolípido, los átomos de hidrógeno en los grupos hidroxilo y los átomos de hidrógeno en enlaces amida de las moléculas de insulina. Los grupos funcionales cargados negativamente forman sitios para interacciones ion-dipolo y para la reacción con el átomo de hidrógeno  $\delta^+$  en grupos hidroxilo individuales y los grupos hidroxilo de las funcionalidades carboxilo en acetato-hidrogenofterato de celulosa. Pueden formarse interacciones ion-dipolo entre las aminas cuaternarias cargadas en las funcionalidades fosfocolina y el oxígeno  $\delta$ -carbonilo hallado en acetato-hidrogenofterato de celulosa e insulina. Las moléculas de azúcar que comprenden estructuras hidrófilas ramificadas en insulina pueden participar en enlaces de hidrógeno e interacciones ion-dipolo.

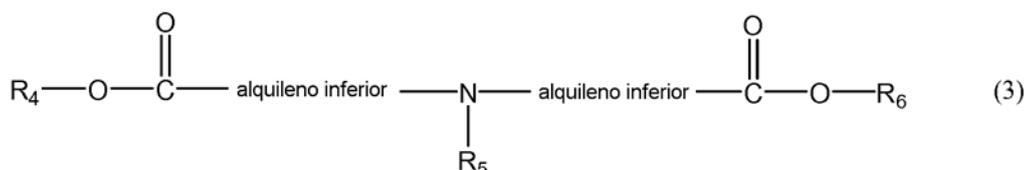
La configuración molecular y el tamaño del polímero (con un peso molecular aproximado de 15.000 o más) permiten que el acetato-hidrogenofterato de celulosa recubra moléculas de fosfolípido individuales del constructo lipídico en la región del grupo de cabeza hidrófilo. Este recubrimiento protege a la insulina dentro del constructo lipídico del medio ácido del estómago. Existen varios modos en que puede unirse el acetato-hidrogenofterato de celulosa a la superficie de moléculas dentro del constructo lipídico. Un medio preferido de unión de acetato-hidrogenofterato de celulosa a la superficie del constructo lipídico es unir la especie celulósica polimérica a una cola de una molécula de insulina que presenta un azúcar que sobresale desde la superficie del constructo lipídico. Esto protege la cola proteica de la insulina frente a la hidrólisis enzimática.

Un lípido anfipático extendido comprende una variedad de sitios de unión multidentada para la unión al receptor. Unión multidentada, tal como se define en el presente documento, requiere una pluralidad de posibles sitios de unión en la superficie de insulina y sus restos de azúcar acompañantes, así como en el constructo lipídico que pueden hacer de superficie de contacto con grupos funcionales carbonilo, carboxilo y hidroxilo en el polímero de acetato-hidrogenofterato de celulosa. Esto permite que el polímero de acetato-hidrogenofterato de celulosa se una a una pluralidad de regiones hidrófilas no sólo en el constructo lipídico sino también en moléculas de insulina con el fin de establecer un blindaje de protección hidrolítica para el constructo lipídico. De esta manera, tanto la insulina como el constructo lipídico se protegen del entorno ácido del estómago tras la administración oral de la forma de dosificación de insulina. Aunque el acetato-hidrogenofterato de celulosa cubra o blinde las moléculas de lípido individuales dentro de y en la superficie del constructo lipídico cuando pasan a través del estómago, una vez que el constructo migra a la región alcalina del intestino delgado, el acetato-hidrogenofterato de celulosa se degrada de manera hidrolítica. Después de retirarse el acetato-hidrogenofterato de celulosa de la superficie de las moléculas del constructo lipídico, una molécula de unión a receptor de hepatocitos-de anclaje de lípido, tal como 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Cap-biotinilo), queda expuesta y entonces está disponible para unirse con el receptor. El empleo de un recubrimiento de acetato-hidrogenofterato de celulosa en insulina y el constructo lipídico es necesario para garantizar que se logra una mayor biodisponibilidad de insulina.

#### Complejo de molécula diana

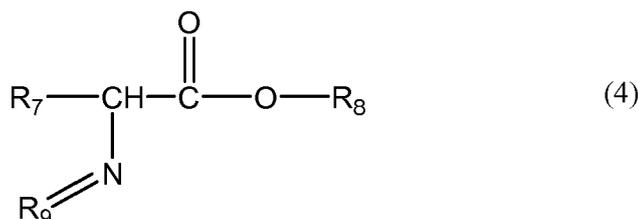
Se da a conocer un constructo lipídico que comprende un complejo de molécula diana que comprende múltiples unidades individuales unidas formadas mediante complejación de un componente de formación de puente con un agente complejante. El componente de formación de puente es una sal agua soluble de un metal que puede formar un complejo coordinado insoluble en agua con un agente complejante. Se selecciona un metal adecuado de los metales de transición y de transición interna o vecinos de los metales de transición. Los metales de transición y de transición interna de los que se selecciona el metal: Sc (escandio), Y (itrio), La (lantano), Ac (actinio), la serie de los actínidos; Ti (titanio), Zr (zirconio), Hf (hafnio), V (vanadio), Nb (niobio), Ta (tántalo), Cr (cromo), Mo (molibdeno), W (tungsteno), Mn (manganeso), Tc (tecnecio), Re (renio), Fe (hierro), Co (cobalto), Ni (níquel), Ru (rutenio), Rh (rodio), Pd (paladio), Os (osmio), Ir (iridio) y Pt (platino). Los vecinos de los metales de transición de los que puede seleccionarse el metal son: Cu (cobre), Ag (plata), Au (oro), Zn (zinc), Cd (cadmio), Hg (mercurio), Al (aluminio), Ga (galio), In (indio), Tl (talio), Ge (germanio), Sn (estaño), Pb (plomo), Sb (antimonio) y Bi (bismuto) y Po (polonio). Los ejemplos de compuestos de metal útiles como agentes de formación de puente incluyen cloruro (III) de cromo hexahidratado; fluoruro de cromo (III) tetrahidratado; bromuro de cromo (III) hexahidratado; complejo de citrato de zirconio (IV) y amonio; cloruro de zirconio (IV); fluoruro de zirconio (IV) hidratado; yoduro de zirconio (IV); bromuro de





Los compuestos de fórmula (3) adecuados incluyen: ácido N'-(2-acetilnaftil)iminodiacético (NAIDA); ácido N'-(2-naftilmetil)iminodiacético (NMIDA); complexona de iminodicarboximetil-2-naftilcetona y ftaleína; 3 (ácido 3:7a:12a:trihidroxi-24-norcolanil-23-iminodiacético); ácido bencimidazol-metiloiminodiacético; y ácido N-(5, pregnen-3-p-ol-2-ol-carbamoilmetil)iminodiacético.

Un agente complejante se selecciona de la familia de aminoácidos de fórmula (4),

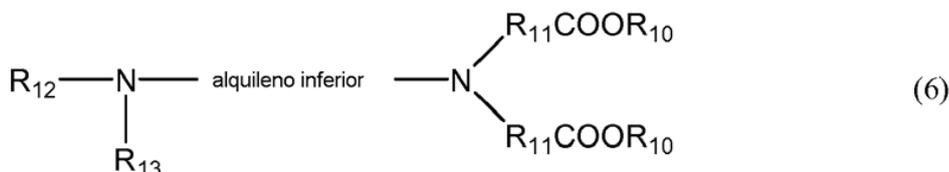


en la que R<sub>7</sub> es una cadena lateral de aminoácido, R<sub>8</sub> es alquilo inferior, arilo, aril-alquilo inferior, y R<sub>9</sub> es piridoxilideno.

10 Aminoácidos adecuados de fórmula (4) son aminoácidos alifáticos, incluyendo, pero sin limitarse a: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina; hidroxiaminoácidos, incluyendo serina y treonina; aminoácidos dicarboxílicos y sus amidas, incluyendo ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina; aminoácidos que tienen funciones básicas, incluyendo lisina, hidroxilisina, histidina, arginina; aminoácidos aromáticos, incluyendo fenilalanina, tirosina, triptófano, tiroxina; y aminoácidos que contienen azufre, incluyendo cistina, metionina.

15 Un agente complejante se selecciona de derivados de aminoácido incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a ácido (3-alanina-y-amino)butírico, O-diazoacetilserina (azaserina), homoserina, ornitina, citrulina, penicilamina y miembros de la clase de compuestos del piridoxilideno que incluyen, pero no se limitan a: piridoxiliden-glutamato; piridoxiliden-isoleucina; piridoxiliden-fenilalanina; piridoxiliden-triptófano; piridoxiliden-5-metil-triptófano; piridoxiliden-5-hidroxitriptamina; y piridoxiliden-5-butiltriptamina.

20 Un agente complejante se selecciona de la familia de diaminas de fórmula general (6),



en la que R<sub>10</sub> es hidrógeno, alquilo inferior o arilo; R<sub>11</sub> es alquileo inferior o aril-alquilo inferior; R<sub>12</sub> y R<sub>13</sub> son independientemente hidrógeno, alquilo inferior, alquilo, arilo, aril-alquilo inferior, acil-heterocíclico, tolueno, sulfonilo o tosilato.

25 Algunas diaminas adecuadas de fórmula (6) adecuadas incluyen, pero no se limitan a, ácido etilendiamina-N,N-diacético; etilendiamina-N,N-bis(2-hidroxi-5-bromofenil)acetato; ácido N'-acetiletildiamina-N,N-diacético; ácido N'-benzoil-etilendiamina-N,N-diacético; ácido N'-(p-toluenosulfonil)etilendiamina-N,N-diacético; ácido N'-(p-t-butylbenzoil)etilendiamina-N,N-diacético; ácido N'-(bencenosulfonil)etilendiamina-N,N-diacético; ácido N'-(p-clorobencenosulfonil)etilendiamina-N,N-diacético; ácido N'-(p-etilbencenosulfonil)etilendiamina-N,N-diacético; ácido N'-acilo y N'-sulfonilo etilendiamina-N,N-diacético; ácido N'-(p-n-propilbencenosulfonil)etilendiamina-N,N-diacético; ácido N'-(naftalen-2-sulfonil)etilendiamina-N,N-diacético; y ácido N'-(2, 5-dimetilbencenosulfonil)etilendiamina-N,N-diacético.

Otros agentes o complejos complejantes adecuados incluyen, pero no se limitan a: penicilamina; ácido p-mercaptisobutírico; ácido dihidrotióctico; 6-mercaptopurina; cetoxal-bis(tiosemicarbazona); complejos de aminas hepatobiliares, 1-hidrazinofalazina (hidralazina); sulfonil-urea; complejos de base de Schiff de aminoácidos hepatobiliares; piridoxiliden-glutamato; piridoxiliden-isoleucina; piridoxiliden-fenilalanina; piridoxiliden-triptófano; piridoxiliden-5-metil-triptófano; piridoxiliden-5-hidroxitriptamina; piridoxiliden-5-butiltriptamina; tetraciclina; 7-carboxi-p-hidroxiquinolina; fenolftaleína; eosina I azulada; eosina I amarillenta; verografina; ácido 3-hidroxi-4-formil-piridén-glutámico; Ácido iminodiacético azo-sustituido; complejos de colorantes hepatobiliares, tales como rosa de Bengala; rojo Congo; bromosulfoftaleína; azul de bromofenol; azul de toluidina; y verde de indocianina; agentes de contraste

hepatobiliares, tales como yodipamida; y ácido ioglicámico; sales biliares, tales como bilirrubina; colglicilyodohistamina; y tiroxina; tiocomplejos hepatobiliares, tales como penicilamina; ácido p-mercaptoisobutírico; ácido dihidrotiocítico; 6-mercaptapurina; y cetoxal-bis(tiosemicarbazona); complejos de aminas hepatobiliares, tales como 1-hidrazinofalazina (hidralazina); y sulfonil-urea; complejos de base de Schiff de aminoácidos hepatobiliares, incluyendo piridoxiliden-5-hidroxitriptamina; y piridoxiliden-5-butiltriptamina; complejos de proteínas hepatobiliares, tales como protamina; ferritina; y asialo-orosomucoide; y asialocomplejos, tales como albúmina lactosaminada; inmunoglobulinas, G, IgG; y hemoglobina.

El complejo de molécula diana tridimensional compuesto por la combinación de agentes de formación de puente y agentes complejantes se describe en el documento WO 99/59545. El agente de formación de puente puede ser una sal de metal, tal como cloruro de cromo hexahidratado, que puede formar un complejo coordinado con agentes complejantes, tales como ácido N-(2,6-diisopropilfenilcarbamoilmetil)iminodiacético. El agente de formación de puente y los agentes complejantes se combinan para formar un complejo que se compone de múltiples unidades unidas en una disposición tridimensional. El complejo puede componerse de múltiples unidades de cromo-(bis)[ácido N-(2,6-(diisopropilfenil)carbamoil-metil)iminodiacético] unidas entre sí. La sustancia del complejo de molécula diana de cromo puede ser soluble en una mezcla de lípidos que contienen 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina, fosfato de dicetilo y colesterol. El complejo se incorpora dentro de un constructo lipídico formado por los grupos de lípidos descritos previamente.

#### Modificación del punto isoeléctrico de la insulina

El punto isoeléctrico de una proteína puede afectar a la liberación y distribución de la proteína en el cuerpo de un paciente tratado con la proteína. Al cambiar el punto isoeléctrico de una proteína, puede alterarse la tasa de liberación de la proteína desde el sitio de administración y puede cambiarse la farmacocinética de la proteína.

Un método de alteración del punto isoeléctrico de la insulina es alterar su estructura molecular sustituyendo o añadiendo diversos aminoácidos. Dos ejemplos de alteración de la estructura de la insulina para obtener propiedades diferentes son insulina glargina e insulina aspart. Estas dos insulinas difieren en la composición de aminoácidos con respecto a la insulina regular humana recombinante. La insulina regular humana recombinante tiene un punto isoeléctrico a 5,30 - 5,35. La insulina glargina sustituye glicina por asparagina en la posición A21 y se añaden dos argininas en el extremo C-terminal de la cadena B. Los puntos isoeléctricos de la glicina y asparagina son 5,97 y 5,41, respectivamente. La sustitución de glicina por asparagina tiene escaso o ningún efecto sobre el punto isoeléctrico de la insulina glargina. Sin embargo, la adición de dos residuos de aminoácido de arginina altamente básicos, con los puntos isoeléctricos de 10,76, eleva significativamente el punto isoeléctrico de la insulina glargina a pH 5,8 - 6,2.

La insulina aspart sustituye ácido aspártico por prolina en la posición B-28. Los puntos isoeléctricos del ácido aspártico y la prolina son 2,97 y 6,10, respectivamente. Con esta única sustitución de aminoácidos ácidos, el punto isoeléctrico de la insulina aspart se desplaza significativamente hacia menor pH, más ácido.

Estos dos ejemplos de insulinas disponibles comercialmente ilustran cómo un número relativamente pequeño de sustituciones de aminoácidos pueden o bien elevar o bien reducir significativamente los puntos isoeléctricos de la insulina glargina o insulina aspart con respecto a insulina regular humana recombinante. Al alterar las propiedades químicas de la insulina, también se cambian la biodisponibilidad y los perfiles farmacodinámicos. Cuando se administra una insulina con una estructura modificada a un paciente diabético para mejorar la biodisponibilidad, las nuevas respuestas farmacológicas proporcionan nuevos beneficios terapéuticos.

El punto isoeléctrico de las insulinas puede modificarse no sólo mediante reestructuración molecular interna de las secuencias de aminoácidos primarias de insulina, sino también mediante la unión de moléculas orgánicas cargadas a insulina. Las moléculas orgánicas cargadas pueden unirse a la superficie, o dentro de la estructura de la insulina. El punto isoeléctrico de la insulina nativa puede cambiarse de pH 5,3 a pH 7,2 añadiendo entre 1,0 y 1,5 mg de una mezcla de proteínas altamente básicas a 1,0 ml de una disolución de insulina que contiene 100 unidades o 3,65 mg de insulina/ml. Las protaminas son un ejemplo de un grupo de proteínas altamente básicas simples que pueden usarse para alterar el punto isoeléctrico de la insulina. Las protaminas producen numerosos aminoácidos básicos en la hidrólisis, presentan un alto contenido de nitrógeno y se producen de manera natural, combinadas con ácido nucleico, en el esperma de pescado. Por ejemplo, las protaminas salmína, clupeína, iridina, esturina y escombrina se aíslan de esperma de salmón, arenque, trucha, esturión y caballa, respectivamente. Estas proteínas básicas, o bien individualmente o bien como mezcla, se asocian con insulina y aumentan el punto isoeléctrico de la insulina.

Los compuestos que alteran la carga de superficie de la insulina incluyen derivados de polilisina y otros polímeros de aminoácidos altamente básicos, tales como poliornitina, polihidroxilisina, poliarginina y polihistidina o combinaciones de los mismos. Otros polímeros incluyen poli(Arg-Pro-Thr)*n* en una razón molar de 1:1:1 con un intervalo de peso molecular de unos cuantos cientos a varios miles o poli(DL-Ala-poli-L-Lys)*n* en una razón molar de 6:1 con un intervalo de peso molecular de unos cuantos cientos a varios miles. La histonas, proteínas básicas que existen en varios subtipos que contienen cantidades diferentes y variables de arginina, lisina y otros aminoácidos básicos que pueden unirse iónicamente a grupos carboxilo de la insulina, y fragmentos de histonas, también se usan para proporcionar una carga positiva. También están incluidos polímeros tales como poliglucosamina, poligalactosamina y

otros diversos polímeros de azúcar que contienen una carga positiva a la que contribuye un grupo amino primario. También se usan polinucleótidos tales como poliadenina, policitosina o poliguanina que proporcionan una carga positiva a través de la ionización de su grupo amino primario. Todas las especies poliméricas anteriores cuando se unen a insulina proporcionan un aumento de carga positiva que está acompañado de un aumento del punto isoelectrico de la insulina. Se añaden pequeñas cantidades de estos compuestos poliméricos, tales como unos pocos microgramos de polímero/ml de insulina, para cambiar el punto isoelectrico de la insulina en una mínima cantidad, generalmente menor de una unidad de pH. Pueden añadirse cantidades más grandes, generalmente mayores de un miligramo a dos, de compuestos orgánicos básicos por ml de insulina a 100 unidades/ml para aumentar progresivamente el punto isoelectrico de la insulina hasta más de dos unidades de pH más allá de su punto isoelectrico nativo.

A la inversa, el punto isoelectrico de la insulina puede reducirse de modo similar añadiendo polímeros carboxilados y aminoácidos poliméricos tales como poli(ácido aspártico), poli(ácido glutámico), proteínas o fragmentos de proteínas que contienen grandes cantidades de residuos de aminoácidos con grupos funcionales carboxilo (COO-) o sulfhidrilo (S-). Pueden cambiarse proteínas altamente básicas a proteínas altamente ácidas haciéndolas reaccionar con un anhídrido apropiado, tal como anhídrido acético, para formar un grupo carboxilo ácido terminal cargado negativamente en lugar de un grupo amino primario básico cargado positivamente. Pueden añadirse otros polímeros ácidos, tales como polímeros cargados con sulfato, a insulina para reducir el punto isoelectrico de la insulina. Pueden usarse polímeros de azúcar tales como poli(ácido galacturónico), poli(ácido glucónico), poli(ácido glucurónico) o poli(ácido glucárico) que contienen grupos carboxilo cargados negativamente para reducir el punto isoelectrico de la proteína.

El cambio del punto isoelectrico de una insulina altera no sólo el carácter iónico de la molécula de insulina nativa, sino también la naturaleza de la envuelta iónica, conocida como la doble capa de Hemholtz, que rodea la insulina y se extiende a los medios acuosos de la fase principal alrededor de la insulina. El entorno iónico que rodea a la insulina tiende a existir en capas con una capa de contraiones asociada con las moléculas orgánicas cargadas participantes que se unen a insulina. Existe un potencial eléctrico en las moléculas de insulina modificadas que se mantienen en una suspensión coloidal de los medios de la fase principal debido a la presencia de iones en la superficie de la insulina. Aquella parte del potencial eléctrico que existe entre la capa de contraiones fijados asociada con las moléculas orgánicas unidas y la de los medios de fase principal se conoce como el potencial electrocinético o zeta ( $\xi$ ). El potencial zeta contribuye significativamente a las propiedades eléctricas y la estabilidad de sistemas coloidales tales como insulina en medios acuosos.

Como resultado de formar una estructura química diferente mediante la adición de material para cambiar el punto isoelectrico, la estabilidad de la proteína insulina en suspensión coloidal se altera de manera intrínseca. La insulina experimenta un desplazamiento en cuanto a la estabilidad al punto isoelectrico recién modificado debido a un menor potencial zeta. La insulina es menos estable cuando está en forma zwitteriónica, o híbrida, en la que los grupos funcionales cargados negativamente equilibran de manera precisa los grupos funcionales cargados positivamente y crean una carga neta global en la proteína. Aunque la carga neta global sea nula, quedan cavidades de carga negativa y cavidades de carga positiva en la totalidad de la estructura de la proteína. Cuando el pH de una disolución de insulina alcanza su punto isoelectrico, su solubilidad disminuye y la insulina puede precipitar a partir de la disolución. Durante la precipitación isoelectrica de la insulina, se superan las propiedades aislantes y dieléctricas de los medios de tampón acuoso de fase principal y se fractura la atmósfera iónica de la doble capa de Hemholtz de modo que pueden asociarse cargas distintas entre partículas coloidales lo que conduce a una suspensión coloidal de proteína con inestabilidad creciente. Estos efectos dan como resultado eventualmente la coagulación y posterior precipitación de la proteína en el punto isoelectrico. El intervalo ideal para la precipitación isoelectrica es dos o tres unidades de pH por encima o por debajo del punto isoelectrico de la insulina a pH 5,3. Sin embargo, los puntos isoelectricos que se extienden más allá de este intervalo de pH pueden formularse a través del uso de información por un experto en la técnica.

A medida que cambia el pH con respecto al punto isoelectrico, aumenta la solubilidad y puede resolubilizarse la insulina que precipitó en el punto isoelectrico. Esto se produce porque a medida que aumenta o disminuye el pH con respecto al punto isoelectrico, hay una acumulación respectiva de carga negativa (por encima del punto isoelectrico) o una acumulación de carga positiva (por debajo del punto isoelectrico) que se regula mediante el pKa de los grupos funcionales representativos. Se produce resolubilización a medida que la proteína desarrolla una mayor disparidad de carga aumentando de ese modo el potencial zeta de la proteína, lo que mejora a su vez la estabilidad de la proteína. Estos efectos dan como resultado el nuevo desarrollo de una envuelta iónica que rodea la proteína, lo que facilita una mayor dispersión coloidal de las moléculas de insulina.

El punto isoelectrico de la insulina nativa, que se produce a pH 5,3, puede elevarse progresivamente añadiendo proteínas, fragmentos peptídicos, polímeros o fragmentos de polímero que se unen a la insulina y alteran el carácter iónico de la insulina. El efecto global de añadir grupos funcionales básicos es elevar el punto isoelectrico de la insulina y crear una insulina que tiene una aparición más lenta de la acción farmacológica al tener la transición de insulina entre una forma soluble a una forma insoluble, y luego a una nueva forma soluble. Modificando el punto isoelectrico de la insulina nativa, especialmente en presencia de HDV-insulina, puede regularse la biodisponibilidad de ambas formas de insulina.

Las insulinas en las que se alteró el punto isoeléctrico cambiando la secuencia de aminoácidos pueden incorporarse en un constructo lipídico. Puede incorporarse insulina glargina en un complejo de molécula diana que comprende un lípido y múltiples unidades individuales unidas formadas mediante complejación de un componente de formación de puente con un agente complejante. Una descripción del complejo de molécula diana y sus componentes se describió previamente en el presente documento. La estructura de la insulina glargina se proporciona en la figura 11. La insulina glargina difiere de la insulina humana en que la insulina glargina tiene una estructura molecular que reemplaza asparagina por glicina en el extremo C-terminal de la cadena A de la insulina humana y añade el dipéptido de arginina en el extremo C-terminal de la cadena B de la insulina humana. El punto isoeléctrico de un compuesto es el pH al que la carga global del compuesto es neutra. Sin embargo, todavía quedan regiones de cargas negativas y positivas dentro del compuesto. El punto isoeléctrico de la insulina humana es a pH 5,3. El punto isoeléctrico de la insulina glargina es mayor que en la insulina humana debido a que las sustituciones de aminoácidos en la insulina glargina elevan el punto isoeléctrico de la insulina glargina a pH 5,8-6,2. Los compuestos son generalmente menos solubles en disoluciones acuosas en intervalos de pH alrededor del punto isoeléctrico. Un compuesto es generalmente más soluble en sistemas acuosos en los que el pH de la disolución es aproximadamente 1-2 unidades de pH mayor o menor que el punto isoeléctrico. El mayor punto isoeléctrico permite que la insulina glargina siga siendo soluble en un entorno levemente ácido a lo largo de un intervalo de pH más amplio.

Una forma comercial de insulina glargina, LANTUS® (inyección de insulina glargina [origen de ADN<sub>r</sub>]), es una disolución estéril de insulina glargina para su uso como insulina inyectable para pacientes diabéticos para el posterior control de los niveles de glucosa *in vivo*. La insulina glargina es un análogo de insulina humana recombinante, es decir un agente hipoglucemiante parenteral de acción prolongada (duración de acción de hasta 24 horas). LANTUS® se produce mediante tecnología de ADN recombinante utilizando una cepa de laboratorio no patógena de *Escherichia coli* (K12) como organismo de producción. LANTUS consiste en insulina glargina disuelta en un fluido acuoso transparente. Cada mililitro de LANTUS (inyección de insulina glargina) contiene 100 U.I. (3,6378 mg) de insulina glargina, 30 mcg de zinc, 2,7 mg de m-cresol, 20 mg de glicerol al 85% y agua para inyección. El pH de la insulina LANTUS disponible comercialmente puede ajustarse mediante la adición de disoluciones acuosas de ácidos, bases o tampones que son fisiológicamente compatibles. LANTUS tiene un pH de aproximadamente 4.

Una representación de una composición farmacéutica que combina insulina libre e insulina asociada con un complejo de molécula diana se muestra en la figura 13. Una composición farmacéutica puede comprender dos o más insulinas. El complejo de molécula diana comprende múltiples unidades individuales unidas formadas mediante complejación de un componente de formación de puente con un agente complejante. El componente de formación de puente es una sal soluble en agua de un metal que puede formar un complejo coordinado insoluble en agua con un agente complejante. Se selecciona un metal adecuado de los metales de transición y de transición interna o vecinos de los metales de transición. Una descripción del complejo de molécula diana y sus componentes se describió previamente en el presente documento. Se da a conocer una composición farmacéutica que comprende una mezcla de insulina libre e insulina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua. La insulina libre no está asociada con el complejo de molécula diana y es soluble en agua. La otra forma de insulina en la composición está asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua.

El ajuste del pH de una disolución acuosa que rodea el constructo lipídico que contiene el complejo de molécula diana, mediante la adición de ácidos, bases o tampones, da como resultado una carga negativa en la estructura del constructo lipídico. El intervalo de pH al que se produce esto depende de la composición de los lípidos. Un sistema de lípidos puede ser una mezcla de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina, colesterol y fosfato de dicetilo. Esta mezcla forma una estructura de constructo lipídico cargada negativamente en condiciones fisiológicas. El constructo lipídico presenta especificidad de direccionamiento a hepatocitos, es decir es específico para hepatocitos celulares, permitiendo de ese modo que el constructo se dirija al hígado.

Se ha descubierto que cuando los componentes lipídicos apropiados se formulan en un complejo de molécula diana insoluble en agua usando agua para inyección estéril, USP (SWI) cuyo pH se ha ajustado de manera terminal a pH  $3,95 \pm 0,2$ , la carga electrónica global en el complejo de molécula diana es predominantemente negativa. La insulina glargina tiene una carga neta positiva a pH  $5,2 \pm 0,5$ , que está por debajo del punto isoeléctrico de la proteína. La carga positiva en la insulina glargina a pH  $5,2 \pm 0,5$  permite la interacción de la parte cargada positivamente de la insulina glargina con la parte cargada negativamente del complejo de molécula diana. Esto da como resultado que la insulina glargina cargada positivamente se ve atraída al complejo de molécula diana cargado negativamente. Se asocian partes de la insulina glargina cargada con cargas en los lípidos y la insulina glargina cargada se mueve dentro de los lípidos, mientras que otras moléculas de insulina glargina cargada quedan secuestradas dentro del volumen nuclear del constructo lipídico después del reparto a través de los diversos restos lipídicos del constructo lipídico.

Existe un equilibrio entre la insulina glargina libre en disolución y la insulina glargina asociada con el complejo de molécula diana insoluble en agua. Debido a que las interacciones entre la insulina glargina y el complejo de molécula diana implican equilibrios, a lo largo del tiempo la insulina glargina libre puede unirse además y repartirse en los dominios de lípido y/o el volumen nuclear central del complejo de molécula diana insoluble en agua. La insulina glargina libre puede transformarse en derivados lipídicos transitorios mediante adsorción sobre, o reacción

con, moléculas de lípido individuales que están en equilibrio con el complejo de molécula diana insoluble en agua. Estos derivados se asocian con los lípidos del complejo de molécula diana insoluble en agua y entran en el volumen nuclear del complejo, afectando por tanto a la actividad farmacológica del producto.

5 Las insulinas en las que se alteró el punto isoeléctrico mediante la unión de moléculas orgánicas cargadas a la insulina pueden incorporarse en un constructo lipídico. La insulina isofana humana recombinante puede incorporarse en un complejo de molécula diana que comprende un lípido y múltiples unidades individuales unidas formadas mediante complejación de un componente de formación de puente con un agente complejante.

10 La estructura de la insulina isofana humana recombinante y protamina se proporcionan en la figura 12. La insulina isofana humana recombinante difiere de la insulina humana en que la insulina humana recombinante se ha tratado con protamina de tal manera que protamina forma un recubrimiento sobre la insulina. El punto isoeléctrico de la insulina isofana humana recombinante (pH 7,2) es mayor que en la insulina humana (pH 5,3) porque la adición de protamina a la insulina isofana humana recombinante eleva el punto isoeléctrico de la proteína. El mayor punto isoeléctrico permite que la insulina isofana humana recombinante siga siendo insoluble a pH fisiológico. El producto de insulina Humulin NPH comercializado actualmente existe como suspensión lechosa en la que la insulina isofana humana recombinante sedimenta en el fondo del vial.

15 Una composición farmacéutica puede comprender una mezcla de insulina isofana humana recombinante libre e insulina regular humana recombinante libre e insulina isofana humana recombinante e insulina regular humana recombinante que está asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua. La insulina isofana humana recombinante libre es el material representado en la figura 12. La insulina isofana humana recombinante libre no está asociada con el complejo de molécula diana y es insoluble a pH fisiológico de aproximadamente 7,2, el punto isoeléctrico de la insulina NPH. La insulina regular humana recombinante es soluble a pH 7,2.

20 Para cada una de las insulinas, existe un equilibrio entre la forma libre de insulina en disolución o suspensión y las formas de insulina asociada con el complejo de molécula diana insoluble en agua. Dado que las interacciones entre cada forma de insulina y el complejo de molécula diana implican equilibrios, a lo largo del tiempo las formas libres de las insulinas se unen y reparten en los dominios de lípido y/o el volumen nuclear central del complejo de molécula diana insoluble en agua. La insulina isofana humana recombinante libre y la insulina regular humana recombinante pueden transformarse en derivados lipídicos transitorios mediante adsorción sobre, o reacción con, moléculas de lípido individuales que están en equilibrio con el complejo de molécula diana insoluble en agua. Estos derivados se asocian con los lípidos del complejo de molécula diana insoluble en agua y entran en el volumen nuclear del complejo, afectando por tanto a la actividad farmacológica del producto.

#### Descripción - Método de fabricación del constructo lipídico

25 La figura 14 demuestra un esquema para el proceso para fabricar un constructo lipídico que comprende un lípido anfipático, un lípido anfipático extendido e insulina. La fabricación de la composición comprende tres etapas globales: preparar una mezcla de un lípido anfipático y un lípido anfipático extendido, preparar un constructo lipídico a partir de la mezcla de un lípido anfipático y un lípido anfipático extendido y combinar la insulina en el constructo lipídico.

30 Se producen e introducen los lípidos mediante los métodos dados a conocer en el presente documento, y aquellos métodos descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 4.946.787; 4.603.044; y 5.104.661, y las referencias citadas en esos documentos. Normalmente, las formulaciones acuosas de constructo lipídico de la invención comprenden del 0,1% al 10% de agente activo en peso (es decir, 1-10 mg de fármaco por ml), y del 0,1% al 4% de lípido en peso en una disolución acuosa, que contiene opcionalmente sales y tampones, en una cantidad para componer el 100% en volumen. Se prefieren formulaciones que comprenden del 0,1% al 5% de agente activo. La más preferida es una formulación que comprende del 0,01% al 5% de agente activo en peso y hasta el 2% en peso de un componente lipídico en una cantidad de disolución acuosa suficiente (c. s.) para producir el 100% en volumen.

35 El constructo lipídico puede prepararse mediante el siguiente procedimiento. Se mezclan constituyentes lipídicos individuales entre sí en un sistema de disolventes orgánicos en el que el disolvente se había secado sobre tamices moleculares durante aproximadamente dos horas para retirar cualquier cantidad de agua residual que puede haber acompañado al disolvente. El sistema de disolventes puede comprender una mezcla de cloroformo y metanol en la razón 2:1 en volumen. Otros disolventes orgánicos que pueden eliminarse fácilmente de una mezcla de lípidos secados también pueden usarse. El uso de una adición en una sola etapa de los constituyentes lipídicos en el procedimiento de mezclado inicial obvia la necesidad de introducir ninguna reacción de acoplamiento adicional que complicaría innecesariamente la estructura del constructo lipídico y requeriría procedimientos de separación adicionales. Los componentes lipídicos y la molécula de unión a receptor de hepatocitos se disuelven en el disolvente, luego se elimina el disolvente a alto vacío hasta que se forma una mezcla seca de los lípidos. El disolvente puede eliminarse a vacío usando un rotoevaporador, u otros métodos conocidos en la técnica, con giro lento a aproximadamente 60°C durante aproximadamente dos horas. Esta mezcla de lípidos puede almacenarse para uso adicional, o usarse directamente.

El constructo lipídico se prepara a partir de la mezcla seca de lípidos anfipáticos y un lípido anfipático extendido.

La mezcla secada de lípidos se añade a una cantidad apropiada de medios acuosos tamponados, luego se agita la mezcla para formar una suspensión homogénea. Entonces se calienta la mezcla de lípidos con mezclado a aproximadamente 80°C durante aproximadamente 30 minutos bajo una atmósfera de nitrógeno seco. La suspensión homogénea calentada se transfiere inmediatamente a un microfluidizador precalentado hasta aproximadamente 70°C. Se hace pasar la suspensión a través del microfluidizador. La suspensión puede requerir pases adicionales a través del microfluidizador para obtener una microsuspensión homogénea de lípidos. Puede usarse un microfluidizador modelo n.º M-110 EHI en el que la presión en el primer pase es de aproximadamente 9.000 psig. Puede ser necesario un segundo pase de la suspensión de lípidos a través del microfluidizador para producir un producto que presenta las propiedades de una microsuspensión homogénea de lípidos. Este producto se define estructural y morfológicamente como un constructo lipídico tridimensional que contiene una molécula de unión a receptor de hepatocitos.

La insulina se introduce en los constructos lipídicos usando uno de dos métodos: introducción en equilibrio e introducción sin equilibrio. La introducción en equilibrio de la insulina comienza cuando la insulina se añade a una suspensión de los constructos lipídicos. A lo largo del tiempo, las moléculas de insulina entran y salen del constructo lipídico. El movimiento está regido por el equilibrio de reparto, en el que el movimiento al interior del constructo lipídico después de la introducción inicial de la insulina en la suspensión.

La introducción sin equilibrio de la insulina en los constructos lipídicos localiza la insulina dentro del constructo lipídico. Tras la introducción en equilibrio de la insulina libre en el constructo lipídico, se retiran los medios de fase principal que contienen la insulina libre. El procedimiento de introducción sin equilibrio es un proceso dirigido por vector que comienza en el instante que se retiran los medios de fase principal externa. El potencial en gradiente para la insulina que migra fuera de los constructos lipídicos se elimina cuando la fase acuosa que contiene la insulina se ha retirado. El proceso global da como resultado una mayor concentración de insulina dentro del constructo lipídico final debido a que se elimina el movimiento de la insulina desde dentro del constructo. La introducción en equilibrio de la insulina es un fenómeno dependiente del tiempo mientras que el procedimiento de introducción sin equilibrio es prácticamente instantáneo. La introducción sin equilibrio puede iniciarse mediante una variedad de procesos en los que el material en disolución se separa del constructo lipídico. Los ejemplos de tales procesos incluyen, pero no se limitan a: filtración, filtración en Centricon, centrifugación, cromatografía de afinidad de tipo discontinuo, cromatografía en gel de afinidad de estreptavidina-agarosa o cromatografía de intercambio iónico de tipo discontinuo. Puede utilizarse cualquier medio que elimine el potencial en gradiente para la difusión y fuga de insulina y haga que la insulina quede retenida por el constructo lipídico.

Cuando se usa cromatografía de tipo discontinuo, el gel de afinidad o intercambio iónico se mezcla rápidamente con la mezcla de la insulina y el constructo. La unión al medio de cromatografía se produce rápidamente y se retira el medio de cromatografía de los medios acuosos mediante decantación de la fase acuosa o usando técnicas de filtración clásicas tales como el uso de papel de filtro y un embudo Büchner.

El constructo lipídico contiene una cantidad discreta de insulina introducida ubicada no sólo en el interior, sino también dentro de y en la superficie del constructo lipídico. El constructo lipídico creado es una nueva y novedosa composición de materia y se convierte en una composición para administrar una cantidad eficaz de insulina como resultado de la introducción sin equilibrio. La introducción de insulina en este constructo lipídico y la posterior retirada de la insulina de fase principal da como resultado una alta concentración de insulina en un constructo lipídico mediante el acortamiento del período de tiempo necesario para la retirada de los medios de fase externa. Sería difícil lograr este nivel de introducción de insulina en el constructo usando procedimientos dependientes del tiempo, tales como cromatografía de intercambio iónico o de filtración en gel, puesto que estos procedimientos requieren una infusión constante de tampón que comprende altas concentraciones de insulina. Por ejemplo, la introducción de la insulina en el constructo usando cromatografía en columna a pequeña escala requiere aproximadamente veinte minutos para retirar los medios de fase principal externa que contienen insulina del constructo que contiene insulina. Se restablecen condiciones de equilibrio durante este período de tiempo mediante el movimiento de la insulina desde el constructo. El mantenimiento de una alta concentración de insulina en y sobre el constructo lipídico es uno de los efectos positivos de usar la introducción sin equilibrio.

En una extensión del proceso de introducción sin equilibrio, se añade acetato-hidrogenoftalato de celulosa al constructo lipídico durante la etapa de introducción de insulina en el constructo lipídico después de haberse sometido la insulina a introducción en equilibrio pero antes de iniciarse el proceso de introducción sin equilibrio. La naturaleza y estructura de la molécula de insulina permite que se intercale en el constructo lipídico en el que se dispersa la insulina en la totalidad del constructo lipídico. Partes hidrófilas de la insulina, así como azúcares complejos ramificados y grupos funcionales adicionales, se extienden en los medios de fase principal desde la superficie del constructo lipídico. Estas partes hidrófilas extendidas de la insulina pueden participar en enlaces de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e ion-dipolo en la superficie del constructo lipídico con los grupos hidroxilo, grupos carboxilo y funcionalidades carbonilo de acetato-hidrogenoftalato de celulosa tal como se ilustra en la figura 9. El acetato-hidrogenoftalato de celulosa ofrece un medio único de combinación con las moléculas del constructo lipídico para proporcionar un blindaje excelente para enmascarar el contenido del constructo lipídico frente al medio digestivo del estómago. Los procesos digestivos en el estómago dan como resultado la escisión hidrolítica de sustratos proteicos mediante la enzima pepsina así como escisión mediante hidrólisis ácida. El entorno ácido del estómago degrada la insulina libre y puede hidrolizar los enlaces éster que mantienen las cadenas hidrocarbonadas

de acilo en la estructura principal de glicerol en las moléculas de fosfolípido. También puede producirse escisión hidrolítica a ambos lados de la funcionalidad fosfato en el grupo fosfocolina. El sistema digestivo cambia de la región ácida del estómago a una región alcalina del intestino delgado en la que se produce la acción enzimática de tripsina y quimotripsina. Las enzimas de lisis de aminoácidos, tales como alfa-aminopeptidasas, pueden degradar proteínas tales como insulina del extremo N-terminal. La presencia de acetato-hidrogenofofalo de celulosa en el constructo lipídico protege a la insulina frente a la degradación hidrolítica. A medida que el entorno alcalino del intestino delgado degrada hidrolíticamente el blindaje de acetato-hidrogenofofalo de celulosa del constructo lipídico la molécula de unión a receptor de hepatocitos pasa a estar disponible para la unión directa del constructo al receptor de unión a hepatocitos. Aunque no se desea restringirse a ninguna teoría particular, existe una sinergia de la protección hidrolítica tras la adición de acetato-hidrogenofofalo de celulosa en el punto final de la introducción sin equilibrio. La protección se distribuye no sólo a la insulina y moléculas de lípido individuales, sino también a todo el constructo lipídico. Esta sinergia proporciona protección molecular colectiva así como individual frente a la hidrólisis enzimática y ácido.

El acetato-hidrogenofofalo de celulosa puede unirse de manera covalente o bien a la insulina o bien al constructo lipídico usando una variedad de métodos. Por ejemplo, un método implica el acoplamiento de los grupos hidroxilo en el acetato-hidrogenofofalo de celulosa con las funcionalidades amina o bien en 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina o bien en el grupo  $\epsilon$ -amino de las diez L-lisinas en la molécula de insulina utilizando la reacción de Mannich.

El acetato-hidrogenofofalo de celulosa puede introducirse en el constructo lipídico durante la introducción en equilibrio de la insulina en el constructo. Las funcionalidades hidroxilo y carbonilo del acetato-hidrogenofofalo de celulosa hidrógeno se unen con moléculas de lípido en un constructo lipídico. Se forman concurrentemente enlaces de hidrógeno entre el acetato-hidrogenofofalo de celulosa y el constructo a medida que se introduce la insulina en condiciones de equilibrio en el constructo lipídico creando un blindaje alrededor de la insulina y alrededor del constructo.

Se recupera HDV-insulina y se recircula desde los medios acuosos mediante la unión del mismo a estreptavidina-agarosa-iminobiotina. La estreptavidina unida de manera covalente a agarosa activada por bromuro de cianógeno proporciona un medio para separar un constructo lipídico basado en iminobiotina de la insulina en los medios acuosos al final de la introducción sin equilibrio de la insulina en el constructo. Un derivado de iminobiotina puede formar el resto de parte de unión al receptor de hepatocitos del fosfolípido dentro del constructo lipídico. La parte soluble en agua de la molécula de anclaje de lípido se extiende aproximadamente 30 ángstroms desde la superficie del lípido para facilitar la unión del resto de parte de unión al receptor de hepatocitos del fosfolípido con un receptor de hepatocitos y para ayudar en la unión del constructo lipídico a estreptavidina.

La estreptavidina se une de manera reversible a iminobiotina a valores de pH de 9,5 y superior, en los que el grupo funcional guanidino no cargado de la iminobiotina se une con intensidad a uno de los cuatro sitios de unión en la estreptavidina ubicados aproximadamente nueve ángstroms por debajo de la superficie de la proteína. Un constructo lipídico que contiene iminobiotina se retira de medios tamponados elevando el pH de una mezcla acuosa del constructo hasta pH 9,5 mediante la adición de un tampón carbonato de sodio 20 mM-bicarbonato de sodio. A este pH, los medios de fase principal contienen la insulina libre que se recupera y separa del constructo lipídico usando una variedad de procedimientos incluyendo, pero sin limitarse a filtración, centrifugación o cromatografía.

La mezcla a pH 9,5 se mezcla entonces con perlas reticuladas de estreptavidina-agarosa, en las que el constructo se adsorbe sobre la estreptavidina. Las perlas, que tienen aproximadamente 120 micrómetros de diámetro, se separan de la disolución mediante filtración. El constructo lipídico se libera del gel de afinidad de estreptavidina-agarosa reduciendo el pH desde pH 9,5 hasta pH 4,5 mediante la adición de un tampón acetato de sodio 20 mM-ácido acético a pH 4,5. A pH 4,5 el grupo guanidino de la iminobiotina se protona y se carga positivamente, tal como se muestra en la figura 10. El constructo lipídico se libera y se separa de la perla de estreptavidina-agarosa mediante filtración. La perla de estreptavidina-agarosa se recupera para uso adicional. Por tanto se conservan tanto la insulina libre como la estreptavidina-agarosa y pueden reutilizarse.

Además se da a conocer una composición que proporciona la liberación extendida de insulina que se produce cuando se introducen en constructos lipídicos de iminobiotina o iminobiotina la insulina usando perlas de estreptavidina-agarosa. Cuando se ajusta el pH del constructo mencionado anteriormente desde pH 9,5 hasta pH 4,5 la insulina precipitará dentro del constructo lipídico a aproximadamente pH 5,9. El punto isoeléctrico de la insulina es a pH 5,9 y representa el pH al que la insulina tiene su menor solubilidad en agua. A lo largo de un intervalo de pH de desde pH 5,9 hasta pH 6,7 la insulina sigue siendo esencialmente insoluble y presenta propiedades que se atribuyen habitualmente a la materia particulada. La insulina no solubilizada dentro de un constructo lipídico crea una formulación de insulina novedosa que proporciona la liberación temporal de moléculas de insulina cuando se administra mediante inyección subcutánea o a través de dosificación oral. Se inicia la solubilización de la insulina cuando el pH del constructo lipídico se aproxima a pH 7,4.

El constructo lipídico se liofiliza o se mantiene en un entorno no acuoso antes de la dosificación. En una forma de dosificación acuosa de la insulina, el pH de la disolución de insulina se mantiene a aproximadamente pH 6,5 para mantener la insulina en la forma insoluble. Cuando la insulina se expone a un gradiente de pH externo *in vivo* la

insulina se solubiliza y se mueve desde el constructo lipídico, suministrando de ese modo la insulina a otros tejidos que albergan virus. La insulina que queda con el constructo lipídico mantiene la capacidad de dirigirse al receptor de unión a hepatocitos en los hepatocitos en el hígado. Por tanto, se producen dos formas de insulina a partir de este constructo lipídico particular. En una práctica *in vivo*, se generan insulina libre y asociada a lípidos de manera dependiente del tiempo. Se prevé que la solubilización de la insulina que está asociada a lípidos, tal como se describió previamente, pueda fabricarse para liberar la insulina a lo largo de un periodo de liberación temporal designado. Esto podría conducir a pautas posológicas menos frecuentes para pacientes aquejados de diabetes.

Las moléculas de insulina pueden moverse al interior del constructo lipídico y quedar secuestradas dentro de los dominios de lípido del constructo lipídico introducido. Se emplea un proceso dirigido por vector para mover las moléculas de insulina en una dirección durante la fase final del procedimiento de introducción de insulina cuando se perturba el equilibrio químico. Durante la fase final de la introducción de insulina, el tampón o los medios acuosos se retiran rápidamente de modo que las moléculas de insulina asociadas con el constructo lipídico se privan de un medio externo al que migrar. La retirada del medio externo extingue eficazmente el equilibrio entre la insulina asociada con el constructo lipídico y la insulina solubilizada en el medio externo. Este proceso se denomina introducción sin equilibrio, tal como se describe en otra parte en el presente documento.

En un constructo lipídico puede introducirse insulina usando métodos de equilibrio, se selecciona una concentración de insulina de 273.000 unidades de insulina por microgramo de proteína para iniciar el procedimiento de introducción. La introducción en equilibrio continúa hasta que se satura el constructo lipídico con insulina.

El proceso final de introducción sin equilibrio de insulina en el constructo lipídico requiere usar un procedimiento que separa el constructo lipídico sólido de los medios tamponados que contienen insulina libre. Puede usarse un procedimiento de filtración con una membrana sintética microporosa muy fina para separar el constructo lipídico de los medios externos. Puede usarse un dispositivo Centricon equipado con un filtro apropiado con una membrana de punto de corte de peso molecular de 100.000, tal como un filtro NanoSep para retirar el constructo lipídico de los medios tamponados que contienen insulina libre. La concentración de insulina en el constructo lipídico se mantiene porque la insulina asociada ya no está en equilibrio con las moléculas de insulina libre ubicadas en los medios de fase principal que se habían retirado del constructo. La insulina libre que estaba en disolución está disponible para introducirse en otros constructos lipídicos. Por tanto, el proceso dirigido por vector de concentrar la insulina dentro del constructo lipídico se logra en una sola etapa en un procedimiento esencialmente independiente del tiempo.

Después de aislarse el constructo lipídico de los medios de fase principal, puede oscilar en tamaño entre aproximadamente 0,0200 micrómetros y 0,4000 micrómetros de diámetro. Los constructos lipídicos comprenden diferentes tamaños de partícula que siguen generalmente una distribución gaussiana. El tamaño apropiado del constructo lipídico necesario para lograr la eficacia farmacológica pretendida puede seleccionarse de constructos lipídicos que comprenden tamaños de partícula en una distribución gaussiana mediante el receptor de unión a hepatocitos.

El constructo lipídico que comprende insulina, lípidos y la molécula de unión a receptor de hepatocitos se prepara usando un proceso de microfluidización que proporciona una alta fuerza de cizallamiento que degrada constructos lipídicos más grandes en constructos más pequeños. Los constituyentes de lípido anfipático del constructo lipídico son 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina, colesterol, fosfato de dicetilo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Cap-biotinilo), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (sal de sodio), fosfato de trietilamonio-2,3-diacetoxipropilo y 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etilo y derivados apropiados de los mismos cuyas estructuras representativas se representan en la tabla 1.

Un constructo puede comprender un complejo de molécula diana que comprende múltiples unidades individuales unidas formadas mediante complejación de un componente de formación de puente con un agente complejante. Normalmente, el complejo de molécula diana se forma combinando el compuesto de metal seleccionado, por ejemplo cloruro de cromo (III) hexahidratado, con una disolución acuosa tamponada del agente complejante. Una disolución acuosa tamponada del agente complejante puede prepararse disolviendo el agente complejante, por ejemplo, ácido N-(2,6-diisopropilfenilcarbamoil-metil)iminodiacético, en una disolución acuosa tamponada, por ejemplo, tampón acetato de sodio 10 mM a un pH final de 3,2-3,3. El compuesto de metal se añade en exceso en una cantidad suficiente para complejarse con una parte aislable del agente complejante, y se lleva a cabo la reacción a una temperatura de 20°C a 33°C durante de 24 a 96 horas, o hasta que el complejo resultante precipita a partir de la disolución acuosa tamponada. El agente complejante precipitado, que demuestra propiedades poliméricas, se aísla entonces para su uso futuro. Este complejo se añade a la mezcla de moléculas de lípido anfipático y un lípido anfipático extendido antes de preparar un constructo lipídico.

A continuación, se facilitan métodos de fabricación de una composición de una insulina en la que se alteró el punto isoeléctrico cambiando la secuencia de aminoácidos que puede incorporarse en un complejo de molécula diana insoluble en agua. Puede incorporarse insulina glargina en un complejo de molécula diana insoluble en agua. La figura 15 demuestra un esquema para un proceso para fabricar una mezcla de insulina glargina libre e insulina glargina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua. La fabricación de la composición puede implicar tres etapas globales: preparar un complejo de molécula diana, incorporar el complejo de molécula diana en

un constructo lipídico, y combinar el complejo de molécula diana con insulina glargina para formar una composición farmacéutica.

5 El complejo de molécula diana comprende múltiples unidades individuales unidas entre sí en una disposición polimérica. Cada unidad comprende un componente de formación de puente y un agente complejante. El complejo de molécula diana puede formarse combinando el compuesto de metal seleccionado, por ejemplo cloruro de cromo (III) hexahidratado, con una disolución acuosa tamponada del agente complejante. Una disolución acuosa tamponada del agente complejante puede prepararse disolviendo un agente complejante, por ejemplo, ácido N-(2,6-diisopropilfenilcarbamoilmetil)iminodiacético, en una disolución acuosa tamponada, por ejemplo, tampón acetato de sodio 10 mM a un pH final de 3,2-3,3. Se añade en exceso un compuesto de metal en una cantidad suficiente para complejarse con una parte aislable del agente complejante, y se lleva a cabo la reacción a una temperatura de aproximadamente 20°C a 33°C durante aproximadamente de 24 a 96 horas, o hasta que el complejo resultante precipita a partir de la disolución acuosa tamponada. Se aísla entonces el complejo precipitado para su uso futuro.

10 Se mezcla entonces el complejo precipitado con los lípidos seleccionados o los lípidos del constructo lipídico y se disuelve en un disolvente orgánico. El disolvente orgánico puede ser cloroformo:metanol (2:1 v/v). Los lípidos están en una concentración suficiente como para disolver e incorporar o bien la totalidad o bien una parte del metal complejo en el mismo. La mezcla del complejo y los lípidos seleccionados que forman el constructo lipídico se mantiene a una temperatura de aproximadamente 60°C cuando se emplea un lípido de alta temperatura de transición, tal como 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina. Pueden usarse menores temperaturas dependiendo de la temperatura de transición de los lípidos seleccionados para la incorporación en el constructo lipídico. Generalmente se requiere un periodo de tiempo de desde 30 minutos hasta 2 horas a vacío para secar los lípidos y eliminar cualquier cantidad de disolvente orgánico residual de la matriz de lípidos para formar el producto intermedio de complejo de molécula diana.

15 Pueden producirse lípidos y someterse a introducción mediante los métodos dados a conocer en el presente documento, y los métodos descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 4.946.787; 4.603.044; y 5.104.661, y las referencias citadas en esos documentos. Normalmente, las formulaciones acuosas de constructo lipídico de la invención comprenderán del 0,1% al 10% de agente activo en peso (es decir, 1-100 mg de fármaco por ml), y del 0,1% al 4% de lípido en peso en una disolución acuosa, que contiene opcionalmente sales y tampones, en una cantidad para componer el 100% en volumen. Se prefieren formulaciones que comprenden del 0,01% al 5% de agente activo. La más preferida es una formulación que comprende del 0,01% al 5% de agente activo en peso y hasta el 2% en peso de un componente lipídico en una cantidad de disolución acuosa suficiente (c. s.) para componer el 100% en volumen.

20 Puede introducirse insulina glargina en el complejo de molécula diana después de ajustarse el pH de una suspensión del complejo de molécula diana y agua para inyección, USP desde aproximadamente pH 4,89 ± 0,2 hasta 5,27 ± 0,5. Se ajustó el pH de una disolución de insulina glargina desde pH 3,88 ± 0,2 hasta aproximadamente pH 4,78 ± 0,5, luego se añadió el complejo molecular diana insoluble en agua. La composición resultante era una mezcla de insulina glargina libre e insulina glargina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua. Una parte de la insulina glargina se asocia con la matriz de constructo lipídico o queda atrapada en el volumen nuclear del constructo lipídico. Esta composición farmacéutica también se denomina HDV-insulina glargina. Puede introducirse una alícuota del complejo de molécula diana en un vial de insulina glargina que contiene 100 unidades internacionales de insulina/ml para proporcionar un sistema de administración específico de hepatocitos que contiene tanto insulina glargina libre como insulina glargina asociada con el complejo de molécula diana.

25 Se preparó una composición farmacéutica que combina insulina glargina libre e insulina glargina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua mediante el siguiente procedimiento. Se ajustó el pH de una muestra de agua para inyección estéril, USP, a pH 3,95 ± 0,2. Se tomó una alícuota de la suspensión de HDV y se ajustó su pH en una serie de etapas hasta que el pH final fue de 5,2 ± 0,5. Se mezcló una alícuota del agua para inyección estéril, USP, a pH 3,95 ± 0,2 con la suspensión del complejo de molécula diana. El pH de la suspensión resultante era de 4,89 ± 0,2. El pH de esta suspensión se ajustó luego a pH 5,27 ± 0,5. El pH de una alícuota de insulina glargina se ajustó desde pH 3,88 ± 0,2 hasta pH 4,78 ± 0,5. Luego se añadió esta disolución a la suspensión del complejo de molécula diana a pH 5,20 ± 0,5. La composición farmacéutica resultante es una mezcla de insulina glargina libre e insulina glargina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua. Esta composición farmacéutica también se denomina HDV-insulina glargina.

30 A continuación, se facilitan métodos de fabricación de una composición de una insulina en la que se alteró el punto isoelectrico mediante la unión de moléculas orgánicas cargadas a insulina que puede incorporarse en un complejo de molécula diana insoluble en agua. La insulina isofana humana recombinante puede incorporarse en un complejo de molécula diana insoluble en agua. La figura 16 demuestra un esquema para un proceso para fabricar una mezcla de insulina isofana humana recombinante libre, insulina regular humana recombinante libre y una mezcla de insulina isofana humana recombinante e insulina regular humana recombinante que están asociadas con un complejo de molécula diana insoluble en agua. La fabricación de la composición puede implicar tres etapas globales: preparar un complejo de molécula diana, incorporar el complejo de molécula diana en un constructo lipídico que contiene insulina regular humana recombinante libre y asociada, y combinar el complejo de molécula diana con insulina isofana

humana recombinante libre y asociada para formar una composición farmacéutica.

El complejo de molécula diana comprende múltiples unidades individuales unidas entre sí en una disposición polimérica. Cada unidad comprende un componente de formación de puente y un agente complejante. El complejo de molécula diana puede formarse combinando el compuesto de metal seleccionado, por ejemplo cloruro de cromo (III) hexahidratado, con una disolución acuosa tamponada del agente complejante. Una disolución acuosa tamponada del agente complejante puede prepararse disolviendo un agente complejante, por ejemplo, ácido N-(2,6-diisopropilfenilcarbamoilmetil)iminodiacético, en una disolución acuosa tamponada, por ejemplo, tampón acetato de sodio 10 mM a un pH final de 3,2-3,3. Se añade en exceso un compuesto de metal en una cantidad suficiente para complejarse con una parte aislable del agente complejante, y se lleva a cabo la reacción a una temperatura de aproximadamente 20°C a 33°C durante aproximadamente de 24 a 96 horas, o hasta que el complejo resultante precipita a partir de la disolución acuosa tamponada. Se aísla entonces el complejo precipitado para su uso futuro.

Se mezcla entonces el complejo precipitado con los lípidos seleccionados o los lípidos del constructo lipídico y se disuelve en un disolvente orgánico. El disolvente orgánico puede ser cloroformo:metanol (2:1 v/v). Los lípidos están en una concentración suficiente como para disolver e incorporar o bien la totalidad o bien una parte del metal complejo en el mismo. La mezcla del complejo y los lípidos seleccionados que forman el constructo lipídico se mantienen a una temperatura de aproximadamente 60°C cuando se emplea un lípido de alta temperatura de transición, tal como 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina. Pueden usarse menores temperaturas dependiendo de la temperatura de transición de los lípidos seleccionados para la incorporación en el constructo lipídico. Generalmente se requiere un periodo de tiempo de desde 30 minutos hasta 2 horas a vacío para secar los lípidos y eliminar cualquier cantidad de disolvente orgánico residual de la matriz de lípidos para formar el producto intermedio de complejo de molécula diana.

Pueden producirse lípidos y someterse a introducción mediante los métodos dados a conocer en el presente documento, y los métodos descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 4.946.787; 4.603.044; y 5.104.661, y las referencias citadas en esos documentos. Normalmente, las formulaciones acuosas de constructo lipídico de la invención comprenderán del 0,1% al 10% de agente activo en peso (es decir, 1-100 mg de fármaco por ml), y del 0,1% al 4% lípido en peso en una disolución acuosa, que contiene opcionalmente sales y tampones, en una cantidad para componer el 100% en volumen. Se prefieren formulaciones que comprenden del 0,01% al 5% de agente activo. La más preferida es una formulación que comprende del 0,01% al 5% de agente activo en peso y hasta el 2% en peso de un componente lipídico en una cantidad de disolución acuosa suficiente (c. s.) para componer el 100% en volumen.

Puede añadirse insulina Humulin NPH a una mezcla formada previamente de insulina regular humana recombinante y un constructo lipídico. La composición resultante era una mezcla de insulina regular humana recombinante libre e insulina isofana humana recombinante libre. Asimismo, una parte de la insulina regular humana recombinante y la insulina isofana humana recombinante está asociada con la matriz de constructo lipídico o atrapada en el volumen nuclear del constructo lipídico. Esta composición farmacéutica también se denomina HDV-insulina NPH. Puede introducirse una alícuota del complejo de molécula diana en un vial de insulina isofana humana recombinante para proporcionar un sistema de administración específico de hepatocitos que contiene tanto insulina isofana humana recombinante libre como insulina isofana humana recombinante asociada con el complejo de molécula diana. La insulina isofana humana recombinante puede combinarse con otras formas de insulina tales como la insulina de acción rápida Humalog y la insulina Novolog, la insulina de acción inmediata Regula®, la insulina de acción intermedia Lente y la insulina de acción prolongada Ultralente y la insulina Lantus, o combinaciones premezcladas de insulina. Puede añadirse una alícuota de la insulina isofana humana recombinante a una mezcla del complejo de molécula diana combinado con una insulina que no es insulina isofana humana recombinante.

#### Descripción - Método de uso

A pacientes con diabetes tipo I o tipo II se les administra una cantidad eficaz de un constructo lipídico dirigido a hepatocitos que comprende un lípido anfipático, un lípido anfipático extendido e insulina. Cuando esta composición se administra por vía subcutánea, una parte de la composición entra en el sistema circulatorio en el que la composición se transporta al hígado y otras zonas en las que el lípido anfipático extendido une el constructo lipídico a receptores de hepatocitos. Una parte de la composición administrada se expone a un gradiente externo *in vivo* en el que puede solubilizarse insulina y luego se mueve desde el constructo lipídico suministrando de ese modo insulina al tejido muscular y adiposo. La insulina que permanece con el constructo lipídico mantiene la capacidad de dirigirse al receptor de unión a hepatocitos en el hígado. Por tanto, se producen dos formas de insulina a partir de este constructo lipídico particular. En una práctica *in vivo*, se generan insulina libre y asociada a lípidos de manera dependiente del tiempo.

La estructura del constructo lipídico de la invención proporciona un agente útil para aplicación farmacéutica para administrar la insulina a un huésped. Por consiguiente, las estructuras de la invención son útiles como composiciones farmacéuticas en combinación con portadores farmacéuticamente aceptables. La administración de las estructuras descritas en el presente documento puede ser mediante cualquiera de los modos de administración aceptados para la insulina que se desee administrar. Estos métodos incluyen formas orales, parenterales, nasales y otras formas sistémicas o en aerosol.

La administración oral de una composición farmacéutica que comprende insulina asociada con un complejo de molécula diana va seguida por la absorción intestinal de la insulina asociada con el complejo de molécula diana en el sistema circulatorio del cuerpo en el que también se expone al pH fisiológico de la sangre. El constructo lipídico se dirige para la administración al hígado. El constructo lipídico puede blindarse mediante la presencia de acetato-hidrogenofalato de celulosa dentro del constructo. En el caso de administración oral, el constructo lipídico blindado atraviesa la cavidad bucal, migra a través del estómago y pasa al interior del intestino delgado en el que el pH alcalino del intestino delgado degrada el blindaje de acetato-hidrogenofalato de celulosa. El constructo lipídico sin blindaje se absorbe en el sistema circulatorio. Esto permite que se administre el constructo lipídico a los sinusoides del hígado. Una molécula de unión a receptor, tal como 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Cap-biotinilo) u otras moléculas específicas de hepatocitos mencionadas anteriormente, proporciona un medio para que el constructo lipídico se una al receptor y luego se envuelvan o sometan a endocitosis por los hepatocitos. La insulina se libera entonces del constructo lipídico en el que, tras acceder al entorno celular, realiza su función designada con respecto a la acción como agente para controlar la diabetes.

La cantidad de insulina administrada dependerá del sujeto que esté tratándose, el tipo y la gravedad de la enfermedad, el modo de administración y la opinión del médico prescriptor. Aunque los intervalos de dosificación eficaz para sustancias biológicamente activas específicas de interés dependen de una variedad de factores, y los conoce generalmente un experto habitual en la técnica, pueden definirse de manera general algunas pautas de dosificación. Para la mayor parte de formas de administración, el componente lipídico se suspenderá en una disolución acuosa y generalmente no superará el 4,0% (p/v) de la formulación total. El componente farmacológico de la formulación será de la manera más probable menos del 20% (p/v) de la formulación y generalmente más del 0,01% (p/v).

A continuación se facilitan métodos de administración de una composición de una insulina en la que se alteró el punto isoeléctrico cambiando la secuencia de aminoácidos que se incorpora en un complejo de molécula diana insoluble en agua. A pacientes con diabetes tipo I o tipo II se les puede administrar una cantidad eficaz de una composición dirigida a hepatocitos que comprende una mezcla de insulina glargina libre e insulina glargina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua. Puede combinarse insulina glargina con otras formas de insulina, tales como insulina lispro, insulina aspart, insulina regular, insulina-zinc, insulina humana-zinc extendida, insulina isofana, insulina regular tamponada humana, insulina glulisina, insulina regular humana recombinante, insulina isofana humana recombinante o combinaciones premezcladas de cualquiera de las insulinas mencionadas anteriormente, un derivado de las mismas, y una combinación de cualquiera de las insulinas mencionadas anteriormente. La composición puede administrarse por vía subcutánea u oral.

La estructura de constructo lipídico de la invención proporciona un agente útil para aplicación farmacéutica para administrar la insulina a un huésped. Por consiguiente, las estructuras de la invención son útiles como composiciones farmacéuticas en combinación con portadores farmacéuticamente aceptables. La administración de las estructuras descritas en el presente documento puede ser mediante cualquiera de los modos de administración aceptados para la insulina que se desee administrar. Estos métodos incluyen formas orales, parenterales, nasales y otras formas sistémicas o en aerosol.

Después de administrarse una composición a un paciente mediante inyección subcutánea, el entorno fisiológico *in situ* en la zona de inyección, la morfología y estructuras químicas de la insulina glargina libre y la insulina glargina asociada con el complejo de molécula diana insoluble en agua comienzan a cambiar. A medida que aumenta el pH del entorno alrededor de la insulina glargina libre y la insulina glargina asociada con el complejo de molécula diana insoluble en agua después de diluirse con medios fisiológicos, el pH alcanza el punto isoeléctrico de la insulina glargina, en el que se producen reacciones de floculación, agregación y precipitación tanto para la insulina glargina libre como para la insulina glargina asociada con el complejo de molécula diana. Las tasas a las que se producen estos procesos difieren entre la insulina glargina libre y la insulina glargina asociada con el complejo de molécula diana. La insulina glargina libre se expone directamente a cambios en el pH y a dilución. La exposición de la insulina glargina asociada con el complejo de molécula diana a pequeños cambios en el pH y a dilución a pH fisiológico se retrasa debido al tiempo requerido para la difusión de fluidos o medios fisiológicos a través de la bicapa lipídica en el complejo de molécula diana insoluble en agua. El retraso en la liberación de insulina desde el constructo lipídico así como el retraso de la liberación de constructo lipídico con la insulina asociada dentro de la matriz de insulina glargina libre precipitada es una característica esencial de la invención puesto que afecta a y aumenta la respuesta biológica y farmacológica *in vivo*.

La administración oral de una composición farmacéutica que combina insulina glargina libre e insulina glargina asociada con un complejo de molécula diana va seguida por la absorción intestinal de la insulina glargina asociada con el complejo de molécula diana en el sistema circulatorio del cuerpo en el que también se expone al pH fisiológico de la sangre. Se administra la totalidad o una parte del constructo lipídico al hígado.

A medida que aumenta la dilución fisiológica *in situ* en el espacio subcutáneo tras entrar en el sistema circulatorio, la insulina glargina libre y la insulina glargina asociada con el complejo de molécula diana se encuentran con un entorno a pH fisiológico normal de pH 7,4. Como resultado, la insulina glargina libre cambia de una forma soluble en la inyección, a una forma insoluble a un pH próximo a su punto isoeléctrico de pH 5,8-6,2, y luego a una forma soluble a pH fisiológico. En la forma soluble, la insulina glargina migra a través del cuerpo hasta sitios en los que

5 puede provocar una respuesta farmacológica. La insulina glargina asociada con el complejo de molécula diana insoluble en agua se solubiliza y se libera del complejo a una tasa diferente que es más lenta que la de la insulina glargina libre. Esto se debe a que la insulina glargina asociada con el complejo de molécula diana insoluble en agua tiene que atravesar el volumen nuclear y los dominios de lípido del complejo de molécula diana insoluble en agua antes de entrar en contacto los medios de fase principal.

10 La cantidad de insulina glargina administrada dependerá del sujeto que esté tratándose, el tipo y la gravedad de la enfermedad, el modo de administración y la opinión del médico prescriptor. Aunque los intervalos de dosificación eficaz para sustancias biológicamente activas específicas de interés dependen de una variedad de factores, y los conoce generalmente un experto habitual en la técnica, pueden definirse de manera general algunas pautas de dosificación. Para la mayor parte de formas de administración, el componente lipídico se suspenderá en una disolución acuosa y generalmente no superará el 4,0% (p/v) de la formulación total. El componente farmacológico de la formulación será de la manera más probable menos del 20% (p/v) de la formulación y generalmente más del 0,01% (p/v).

15 A continuación se facilitan métodos de administración de una composición de una insulina en la que se alteró el punto isoeléctrico mediante la unión de moléculas orgánicas cargadas a la insulina que se incorpora en un complejo de molécula diana insoluble en agua. A pacientes con diabetes tipo I o tipo II se les puede administrar una cantidad eficaz de una composición dirigida a hepatocitos que comprende una mezcla de insulina isofana humana recombinante libre más insulina regular humana recombinante libre junto con insulina isofana humana recombinante e insulina regular humana recombinante que están asociadas ambas con un complejo de molécula diana insoluble en agua. Puede combinarse insulina isofana humana recombinante con otras formas de insulina, tales como insulina lispro, insulina aspart, insulina regular, insulina glargina, insulina-zinc, insulina humana-zinc extendida, insulina isofana, insulina regular tamponada humana, insulina glulisina, insulina regular humana recombinante, insulina isofana humana recombinante o combinaciones premezcladas de cualquiera de las insulinas mencionadas anteriormente, un derivado de las mismas, y una combinación de cualquiera de las insulinas mencionadas anteriormente.

20 Las estructuras de constructo lipídico de la invención proporcionan un agente útil para aplicación farmacéutica para administrar la insulina a un huésped. Por consiguiente, las estructuras de la invención son útiles como composiciones farmacéuticas en combinación con portadores farmacéuticamente aceptables. La administración de las estructuras descritas en el presente documento puede ser mediante cualquiera de los modos de administración aceptados para la insulina que se desee administrar. Estos métodos incluyen formas orales, parenterales, nasales y otras formas sistémicas o en aerosol.

25 Después de administrarse una composición a un paciente mediante inyección subcutánea, el entorno fisiológico *in situ* en la zona de inyección, la morfología y estructuras químicas de la insulina isofana humana recombinante libre y la insulina isofana humana recombinante asociada con el complejo de molécula diana insoluble en agua comienzan a cambiar. A medida que el pH del entorno alrededor de la insulina isofana humana recombinante libre y la insulina isofana humana recombinante asociada con el complejo de molécula diana insoluble en agua se diluye con medios fisiológicos, se produce cierta solubilización para ambas insulinas. Como resultado de las condiciones de solubilización y equilibrio, puede asociarse insulina isofana humana recombinante con el complejo de molécula diana. Las tasas a las que se producen estos procesos de equilibrio difieren entre la insulina isofana humana recombinante libre y la insulina isofana humana recombinante asociada con el complejo de molécula diana. La insulina isofana humana recombinante libre se expone directamente a cambios en el pH y a dilución fisiológica. La exposición de la insulina isofana humana recombinante asociada con el complejo de molécula diana a pequeños cambios en el pH y a dilución a pH fisiológico se retrasa debido al tiempo requerido para la difusión de fluidos o medios fisiológicos a través de la bicapa lipídica en el complejo de molécula diana insoluble en agua. El retraso en la liberación de insulina desde el constructo lipídico así como el retraso de la liberación de constructo lipídico ya que existe dentro de la matriz de insulina isofana humana recombinante libre precipitada es un descubrimiento esencial de la invención puesto que afecta a y aumenta la respuesta biológica y farmacológica *in vivo*.

30 La administración oral de una composición farmacéutica que combina insulina isofana humana recombinante libre e insulina isofana humana recombinante asociada con un complejo de molécula diana va seguida por la absorción intestinal de la insulina isofana humana recombinante asociada con el complejo de molécula diana en el sistema circulatorio del cuerpo en el que también se expone al pH fisiológico de la sangre. Se administra la totalidad o una parte del constructo lipídico al hígado.

35 A medida que aumenta la dilución fisiológica *in situ* en el espacio subcutáneo o tras entrar en el sistema circulatorio, la insulina isofana humana recombinante libre y la insulina isofana humana recombinante asociada con el complejo de molécula diana se encuentran con un entorno de pH fisiológico normal de pH 7,4. Como resultado de la dilución, la insulina isofana humana recombinante libre cambia de una forma insoluble en la inyección, a una forma soluble a pH fisiológico. En la forma soluble, la insulina isofana humana recombinante migra a través del cuerpo hasta sitios en los que puede provocar una respuesta farmacológica. La insulina isofana humana recombinante asociada con el complejo de molécula diana insoluble en agua se solubiliza y se libera del complejo a una tasa diferente que es más lenta que la de la insulina isofana humana recombinante libre. Esto se debe a que la insulina isofana humana recombinante asociada con el complejo de molécula diana insoluble en agua tiene que atravesar el volumen nuclear

y los dominios de lípido del complejo de molécula diana insoluble en agua antes de entrar en contacto con los medios de fase principal.

5 La estructura de constructo lipídico de la invención proporciona un agente útil para aplicación farmacéutica para administrar la insulina isofana humana recombinante a un huésped. Por consiguiente, las estructuras de la invención son útiles como composiciones farmacéuticas en combinación con portadores farmacéuticamente aceptables. La administración de las estructuras descritas en el presente documento puede ser mediante cualquiera de los modos de administración aceptados para la insulina isofana humana recombinante que se desea administrar. Estos métodos incluyen formas orales, parenterales, nasales y otras formas sistémicas o en aerosol.

10 La cantidad de insulina isofana humana recombinante e insulina regular humana recombinante administrada dependerá del sujeto que esté tratándose, el tipo y la gravedad de la enfermedad, el modo de administración y la opinión del médico prescriptor. Aunque los intervalos de dosificación eficaz para sustancias biológicamente activas específicas de interés dependen de una variedad de factores, y los conoce generalmente un experto habitual en la técnica, pueden definirse de manera general algunas pautas de dosificación. Para la mayor parte de formas de administración, el componente lipídico se suspenderá en una disolución acuosa y generalmente no superará el 4,0% (p/v) de la formulación total. El componente farmacológico de la formulación será de la manera más probable menos del 20% (p/v) de la formulación y generalmente más del 0,01% (p/v).

15 La cantidad de insulina administrada dependerá del sujeto que esté tratándose, el tipo y la gravedad de la enfermedad, el modo de administración y la opinión del médico prescriptor. Aunque los intervalos de dosificación eficaz para sustancias biológicamente activas específicas de interés dependen de una variedad de factores, y los conoce generalmente un experto habitual en la técnica, pueden definirse de manera general algunas pautas de dosificación. Para la mayor parte de formas de administración, el componente lipídico se suspenderá en una disolución acuosa y generalmente no superará el 4,0% (p/v) de la formulación total. El componente farmacológico de la formulación será de la manera más probable menos del 20% (p/v) de la formulación y generalmente más del 0,01% (p/v).

20 Pueden prepararse formas de dosificación o composiciones que contienen principio activo en el intervalo del 0,005% al 5%, componiéndose el resto de portadores no tóxicos.

25 La composición exacta de estas formulaciones variará ampliamente dependiendo de las propiedades particulares del fármaco en cuestión. Sin embargo, comprenderán generalmente desde el 0,01% hasta el 5%, y preferiblemente desde el 0,05% hasta el 1% de principio activo para fármacos sumamente potentes, y desde el 2%-4% para fármacos moderadamente activos.

30 El porcentaje de principio activo contenido en tales composiciones parenterales depende enormemente de la naturaleza específica del mismo, así como de la actividad del principio activo y las necesidades del sujeto. Sin embargo, pueden emplearse porcentajes de principio activo del 0,01% al 5% en disolución, y serán mayores si la composición es un sólido que se diluirá posteriormente hasta los porcentajes anteriores. Preferiblemente, la composición comprenderá el 0,2%-2,0% del agente activo en disolución.

35 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado más adelante en la técnica de la farmacología. En general, tales métodos de preparación incluyen la etapa de poner el principio activo en asociación con un portador o uno o más de otros componentes, y luego, si es necesario o se desea, conformar o envasar el producto en una unidad de dosis única o múltiple deseada.

40 Aunque las descripciones de composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración ética a seres humanos, el experto en la técnica entenderá que tales composiciones son adecuadas en general para la administración a animales de todas clases. La modificación de composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos para hacer que las composiciones sean adecuadas para la administración a diversos animales se entiende bien, y el farmacólogo veterinario experto habitual puede diseñar y realizar tal modificación con experimentación habitual meramente, si la necesitara. Los sujetos para los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a, seres humanos y otros primates, mamíferos incluyendo mamíferos con relevancia comercial tales como ganado, cerdos, caballos, ovejas, gatos y perros.

45 Las composiciones farmacéuticas que son útiles en los métodos de la invención pueden prepararse, envasarse o venderse en formulaciones adecuadas para administración oral, parenteral, pulmonar, intranasal, bucal, o por otra vía.

50 Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o venderse a granel, como dosis unitaria individual, o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Tal como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad diferenciada de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo es generalmente igual a la dosificación del principio activo que se administraría a un sujeto o una fracción conveniente de tal dosificación tal como, por ejemplo,

la mitad o una tercera parte de tal dosificación. Sin embargo, la administración del agente activo tal como se expone en la invención puede ser de tan solo 1/10, 1/100 o 1/1.000 o menor de la dosis administrada normalmente debido a la naturaleza dirigida del agente terapéutico de insulina.

5 Las cantidades relativas del principio activo, el portador farmacéuticamente aceptable, y cualquier componente adicional en una composición farmacéutica de la invención variarán, dependiendo de la identidad, la talla y el estado del sujeto tratado y dependiendo además de la vía mediante la que vaya a administrarse la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1% y el 100% (p/p) de principio activo.

10 Una formulación de una composición farmacéutica de la invención adecuada para administración oral puede prepararse, envasarse o venderse en forma de una unidad de dosis sólida diferenciada incluyendo, pero sin limitarse a, un comprimido, una cápsula dura o blanda, un sello, un trocisco o una pastilla para chupar, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del principio activo. Otras formulaciones adecuadas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, una formulación en polvo o granular, una suspensión acuosa u oleosa, una disolución acuosa u oleosa, o una emulsión.

15 Tal como se usa en el presente documento, un líquido "oleoso" es uno que comprende una molécula líquida que contiene carbono y que presenta un carácter menos polar que el agua.

20 Un comprimido que comprende el principio activo puede producirse, por ejemplo, mediante compresión o moldeo del principio activo, opcionalmente con uno o más componentes adicionales. Pueden prepararse comprimidos sometidos a compresión mediante compresión, en un dispositivo adecuado, del principio activo en una forma de flujo fluido tal como una preparación de polvo o granular, opcionalmente mezclado con uno o más de un aglutinante, un lubricante, un excipiente, un agente tensioactivo y un agente dispersante. Pueden producirse comprimidos moldeados mediante moldeo, en un dispositivo adecuado, de una mezcla del principio activo, un portador farmacéuticamente aceptable, y al menos suficiente líquido como para humedecer la mezcla. Los excipientes farmacéuticamente aceptables usados en la fabricación de comprimidos incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, agentes de granulación y disgregación, agentes de unión y agentes lubricantes. Los agentes dispersantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata y glicolato sódico de almidón. Los agente tensioactivos conocidos incluyen, pero no se limitan a, lauril-sulfato de sodio. Los diluyentes conocidos incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de calcio, hidrogenofosfato de calcio y fosfato de sodio. Los agentes de granulación y disgregación conocidos incluyen, pero no se limitan a, almidón de maíz y ácido alginico. Los agentes de unión conocidos incluyen, pero no se limitan a, gelatina, goma arábiga, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona e hidroxipropil-metilcelulosa. Los agentes lubricantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, ácido esteárico, sílice y talco.

35 Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse usando métodos conocidos para lograr la disgregación retardada en el tracto gastrointestinal de un sujeto, proporcionando de ese modo la liberación y absorción sostenidas del principio activo. A modo de ejemplo, un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo puede usarse para recubrir comprimidos. Además a modo de ejemplo, pueden recubrirse comprimidos usando métodos descritos en las patentes estadounidenses números 4.256.108; 4.160.452; y 4.265.874 para formar comprimidos de liberación controlada de manera osmótica. Los comprimidos pueden comprender además un agente edulcorante, un agente saborizante, un agente colorante, un conservante, o alguna combinación de estos para proporcionar una preparación farmacéuticamente elegante y agradable.

40 Pueden prepararse cápsulas duras que comprenden el principio activo usando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Tales cápsulas duras comprenden el principio activo, y pueden comprender además componentes adicionales incluyendo, por ejemplo, un diluyente sólido inerte tal como carbonato de calcio, fosfato de calcio, caolín o acetato-hidrogenoftalato de celulosa.

45 Pueden prepararse cápsulas de gelatina blanda que comprenden el principio activo usando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Tales cápsulas blandas comprenden el principio activo, que puede mezclarse con agua o un medio de aceite tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Pueden prepararse, envasarse y venderse formulaciones líquidas de una composición farmacéutica de la invención que son adecuadas para administración oral o bien en forma líquida o bien en forma de un producto seco destinado para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

50 Pueden prepararse suspensiones líquidas usando métodos convencionales para lograr la suspensión del principio activo en un vehículo acuoso u oleoso. Los vehículos acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica. Los vehículos oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales tales como aceite de maní, oliva, sésamo o coco, aceites vegetales fraccionados y aceites minerales tales como parafina líquida. Las suspensiones líquidas pueden comprender además uno o más componentes adicionales incluyendo, pero sin limitarse a, agentes de suspensión, agentes dispersantes o humectantes, agentes emulsionantes, demulcentes, conservantes, tampones, sales, saborizantes, agentes colorantes y agentes edulcorantes. Las suspensiones oleosas pueden comprender además un agente espesante. Los agentes de suspensión conocidos incluyen, pero no se limitan a, jarabe de sorbitol, grasas comestibles hidrogenadas, alginato

de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto, goma arábica, y derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa. Los agentes dispersantes o humectantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, fosfátidos que se producen de manera natural tales como lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso, con un alcohol alifático de cadena larga, con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol, o con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo estearato de polioxietileno, heptadecaetilenoxicetanol, monooleato de polioxietileno-sorbitol y monooleato de polioxietileno-sorbitano, respectivamente). Los agentes emulsionantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, lecitina y goma arábica. Los conservantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, para-hidroxibenzoatos de metilo, etilo o n-propilo, ácido ascórbico y ácido sórbico. Los agentes edulcorantes conocidos incluyen, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol, sacarosa y sacarina. Los agentes espesantes para suspensiones oleosas conocidos incluyen, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura y alcohol cetílico.

Pueden prepararse disoluciones líquidas del principio activo en disolventes acuosos u oleosos sustancialmente de la misma manera que las suspensiones líquidas, siendo la principal diferencia que el principio activo se disuelve, en vez de suspenderse en el disolvente. Las disoluciones líquidas de la composición farmacéutica de la invención pueden comprender cada uno de los componentes descritos con respecto a las suspensiones líquidas, entendiéndose que los agentes de suspensión no ayudarán necesariamente a la disolución del principio activo en el disolvente. Los disolventes acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica. Los disolventes oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales tales como aceite de maní, oliva, sésamo o coco, aceites vegetales fraccionados, y aceites minerales tales como parafina líquida.

Pueden prepararse formulaciones en polvo y granulares de una preparación farmacéutica de la invención usando métodos conocidos. Tales formulaciones pueden administrarse directamente a un sujeto, usarse, por ejemplo, para formar comprimidos, para llenar cápsulas, o para preparar una suspensión o disolución acuosa u oleosa mediante la adición de un vehículo acuoso u oleoso a las mismas. Cada una de estas formulaciones puede comprender además uno o más de un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y un conservante. También pueden incluirse excipientes adicionales, tales como cargas y agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes, en estas formulaciones.

Una composición farmacéutica de la invención también puede prepararse, envasarse o venderse en forma de emulsión de aceite en agua o emulsión de agua en aceite. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal tal como aceite de oliva o maní, un aceite mineral tal como parafina líquida, o una combinación de estos. Tales composiciones pueden comprender además uno o más agentes emulsionantes tales como gomas que se producen de manera natural tales como goma arábica o goma tragacanto, fosfátidos que se producen de manera natural tales como fosfátido de soja o lecitina, ésteres o ésteres parciales derivados de combinaciones de ácidos grasos y anhídridos de hexitol tales como monooleato de sorbitano, y productos de condensación de tales ésteres parciales con óxido de etileno tales como monooleato de polioxietileno-sorbitano. Estas emulsiones también pueden contener componentes adicionales incluyendo, por ejemplo, agentes edulcorantes o saborizantes.

Tal como se usa en el presente documento, "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la formación de una brecha física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la brecha en el tejido. Por tanto, la administración parenteral incluye, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica penetrante de tejido, y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluya, pero no se limite a, técnicas de inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal, e infusión de diálisis renal.

Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral comprenden el principio activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Tales formulaciones pueden prepararse, envasarse o venderse en una forma adecuada para la administración en bolo o para administración continua. Pueden prepararse formulaciones inyectables, envasarse o venderse en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en envases de múltiples dosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, disoluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y formulaciones biodegradables o de liberación sostenida implantables. Tales formulaciones pueden comprender además uno o más componentes adicionales incluyendo, pero sin limitarse a, agentes de suspensión, estabilización o dispersión. Se da a conocer una formulación para administración parenteral en la que se proporciona el principio activo en forma seca (es decir, de polvo o granular) para su reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse, envasarse o venderse en forma de una suspensión o disolución acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión o disolución puede formularse según la técnica conocida, y puede comprender, además del principio activo, componentes adicionales tales como los agentes dispersantes, agentes humectantes o agentes de suspensión descritos en el presente documento. Tales formulaciones inyectables estériles pueden prepararse usando un diluyente o disolvente aceptable por vía

parenteral, no tóxico, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero no se limitan a, solución de Ringer, disolución isotónica de cloruro de sodio y aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones que pueden administrarse por vía parenteral que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación de constructo lipídico, o como componente de un sistema de polímero biodegradable. Las composiciones para liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero moderadamente soluble o una sal moderadamente soluble.

Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o venderse en una formulación adecuada para administración pulmonar por la cavidad bucal. Una formulación de este tipo puede comprender partículas secas que comprenden el principio activo y que tienen un diámetro en el intervalo de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 7 micrómetros, y preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6 micrómetros. Tales composiciones están convenientemente en forma de polvos secos para administración usando un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al que puede dirigirse una corriente de propelente para dispersar el polvo o usando un recipiente de dispensación de polvo/disolvente autopropelente tal como un dispositivo que comprende el principio activo disuelto o suspendido en un propelente de bajo punto de ebullición en un recipiente sellado. Preferiblemente, tales polvos comprenden partículas en las que al menos el 98% de las partículas en peso tienen un diámetro mayor de 0,5 micrómetros y al menos el 95% de las partículas mediante número tienen un diámetro menor de 7 micrómetros. Más preferiblemente, al menos el 95% de las partículas en peso tienen un diámetro mayor de 1 nanómetro y al menos el 90% de las partículas en número tienen un diámetro menor de 6 micrómetros. Las composiciones de polvo seco incluyen preferiblemente a un diluyente de polvo fino sólido tal como azúcar y se proporcionan convenientemente en una forma de dosis unitaria.

Los propelentes de bajo punto de ebullición incluyen generalmente propelentes líquidos que tienen un punto de ebullición inferior a 65°F a presión atmosférica. Generalmente, el propelente puede constituir del 50 al 99,9% (p/p) de la composición, y el principio activo puede constituir del 0,1 al 20% (p/p) de la composición. El propelente puede comprender además componentes adicionales tales como un surfactante líquido no iónico o sólido aniónico o un diluyente sólido (preferiblemente que tiene un tamaño de partícula del mismo orden que las partículas que comprenden el principio activo).

Las composiciones farmacéuticas de la invención formuladas para administración pulmonar también pueden proporcionar el principio activo en forma de gotas de una disolución o suspensión. Tales formulaciones pueden prepararse, envasarse o venderse como disoluciones o suspensiones acuosas o diluidas alcohólicas, opcionalmente estériles, que comprenden el principio activo, y pueden administrarse convenientemente usando cualquier dispositivo de nebulización o atomización. Tales formulaciones pueden comprender además uno o más componentes adicionales incluyendo, pero sin limitarse a, un agente saborizante tal como sacarina sódica, un aceite volátil, un agente tamponante, un agente tensioactivo o un conservante tal como hidroxibenzoato de metilo. Las gotas proporcionadas por esta vía de administración tienen preferiblemente un diámetro promedio en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 200 micrómetros.

Las formulaciones descritas en el presente documento como útiles para administración pulmonar son también útiles para administración intranasal de una composición farmacéutica de la invención.

Otra formulación adecuada para administración intranasal es un polvo grueso que comprende el principio activo y que tiene una partícula promedio de desde aproximadamente 0,2 hasta 500 micrómetros. Una formulación de este tipo se administra de manera que se toma una aspiración, es decir mediante inhalación rápida a través de las fosas nasales desde un recipiente del polvo mantenido cerca de los orificios nasales.

Las formulaciones adecuadas para administración nasal pueden comprender, por ejemplo, desde aproximadamente tan solo el 0,1% (p/p) y hasta el 75% (p/p) del principio activo, y pueden comprender además uno o más de los componentes adicionales descritos en el presente documento.

Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o venderse en una formulación adecuada para administración bucal. Tales formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos o pastillas para chupar producidos usando métodos convencionales, y pueden comprender, por ejemplo, del 0,1 al 20% (p/p) de principio activo, comprendiendo el resto una composición que puede disolverse o degradarse por vía oral y, opcionalmente, uno o más de los componentes adicionales descritos en el presente documento. Alternativamente, las formulaciones adecuadas para administración bucal pueden comprender un polvo o una disolución o suspensión aerosolizada o atomizada que comprende el principio activo. Tales formulaciones en polvo, aerosolizadas, o aerosolizadas, cuando se dispersan, tienen preferiblemente un tamaño de partícula o gota promedio en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 200 micrómetros, y pueden comprender además uno o más de los componentes adicionales descritos en el presente documento.

Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o venderse en una formulación adecuada para administración oftálmica. Tales formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de colirios que incluyen, por ejemplo, una disolución o suspensión al 0,1%-1,0% (p/p) del principio activo en un portador líquido

acuoso u oleoso. Tales gotas pueden comprender además agentes tamponantes, sales, o uno o más de otros de los componentes adicionales descritos en el presente documento. Otras formulaciones que pueden administrarse por vía oftálica que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina o en una preparación de constructo lipídico.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, "componentes adicionales" incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes de granulación y disgregación; agentes de unión; agentes lubricantes; agentes edulcorantes; agentes saborizantes; agentes colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos y disolventes acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de suspensión; agentes dispersantes o humectantes; agentes emulsionantes, demulcentes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables. Otros "componentes adicionales" que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas de la invención se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo en Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.
- 10
- 15 Normalmente, las dosificaciones del principio activo en la composición de la invención que pueden administrarse a un animal, preferiblemente un ser humano, oscilan en cuanto a cantidad entre 1 microgramo y aproximadamente 100 g por kilogramo de peso corporal del animal. Aunque la dosificación precisa administrada variará dependiendo de cualquiera de varios factores, incluyendo pero sin limitarse a, el tipo de animal y tipo de estado patológico que esté tratándose, la edad del animal y la vía de administración. Preferiblemente, la dosificación del principio activo
- 20 variará entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 10 g por kilogramo de peso corporal del animal. Más preferiblemente, la dosificación variará entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 1 g por kilogramo de peso corporal del animal.

La composición puede administrarse a un animal con una frecuencia de varios veces al día, o puede administrarse con menor frecuencia, tal como una vez a día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o incluso con menor frecuencia, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. La frecuencia de la dosis resultará fácilmente evidente para el médico experto y dependerá de cualquiera de varios factores, tales como, pero sin limitarse a, el tipo y la gravedad de la enfermedad que esté tratándose, el tipo y la edad del animal, etc.

25

Se da a conocer un kit que comprende la composición de la invención y un material de instrucciones que describe la administración de la composición a un tejido de un mamífero. Este kit puede comprender un disolvente (preferiblemente estéril) adecuado para disolver o suspender la composición de la invención antes de administrar la composición al mamífero.

30

Tal como se usa en el presente documento, un "material de instrucciones" incluye una publicación, un registro, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de la proteína de la invención en el kit para obtener el alivio de diversas enfermedades o trastornos citados en el presente documento. Opcionalmente, o de manera alternativa, el material de instrucciones puede describir uno o más métodos de alivio de las enfermedades o los trastornos en una célula o un tejido de un mamífero. El material de instrucciones del kit puede fijarse, por ejemplo, a un recipiente que contiene los componentes de la invención o enviarse junto con un recipiente que contiene los componentes de la invención. Alternativamente, el material de instrucciones puede enviarse por separado del recipiente con la intención de que el material de instrucciones y la composición se usen de manera conjunta por el receptor.

35

40

Las composiciones farmacéuticas útiles para poner en práctica la invención pueden administrarse para suministrar una dosis equivalente a las dosis convencionales de insulina.

Aunque las descripciones de composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración ética a seres humanos, el experto en la técnica entenderá que tales composiciones son adecuadas en general para administración a animales de todas clases. La modificación de composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos para hacer que las composiciones sean adecuadas para administración a diversos animales se entiende bien, y el farmacólogo veterinario experto habitual puede diseñar y realizar tal modificación con experimentación habitual meramente, si la necesitara. Los sujetos para los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a, seres humanos y otros primates, animales de compañía y otros mamíferos.

45

50

Las composiciones farmacéuticas que son útiles en los métodos de la invención pueden prepararse, envasarse o venderse en formulaciones adecuadas para vías de administración oral o inyectable.

Las cantidades relativas del principio activo, el portador farmacéuticamente aceptable, y cualquier componente adicional en una composición farmacéutica de la invención variarán, dependiendo de la identidad, la talla y el estado del sujeto tratado y dependiendo además de la vía mediante la que vaya a administrarse la composición.

55

### Ejemplos experimentales

A continuación se describen los materiales y métodos usados en los experimentos presentados en este ejemplo experimental.

#### Ejemplo experimental 1. Composición farmacéutica 1

5 Un constructo lipídico comprende una mezcla de los lípidos 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol, fosfato de dicetilo, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (sal de sodio), la molécula de unión a receptor 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Cap-biotinilo) e insulina.

#### Ejemplo experimental 2. Composición farmacéutica 2

10 Un constructo lipídico comprende una mezcla de los lípidos 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol, fosfato de dicetilo, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (sal de sodio), insulina, la molécula de unión a receptor 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Cap-biotinilo) y/o policromo-poli(bis)-[ácido N-(2,6-(diisopropilfenil)carbamoilmetil)imino]diacético]. Se habían añadido la molécula de unión al receptor de hepatocitos y de anclaje lipídico 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Cap-biotinilo) y policromo-poli(bis)-[ácido N-(2,6-(diisopropilfenil)carbamoil-metil)iminodiacético] al constructo lipídico a un nivel del  $1,68\% \pm 0,5\%$  en peso y del  $1,2\% \pm 0,5\%$  en peso, respectivamente.

#### Ejemplo experimental 3. Composición farmacéutica 3

20 Un constructo lipídico comprende una mezcla de los lípidos anfipáticos 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (12,09 g), colesterol (1,60 g), fosfato de dicetilo (3,10 g), policromo-poli(bis)-[ácido N-(2,6-(diisopropilfenil)carbamoilmetil)imino]diacético] (0,20 g) e insulina. Se añadió la mezcla a un medio acuoso y la masa total fue de 1200 g.

#### Ejemplo experimental 4. Preparación de un constructo lipídico que contiene insulina

25 Se formó el constructo lipídico preparando una mezcla de moléculas de lípido anfipático y un lípido anfipático extendido, preparando un constructo lipídico a partir de la mezcla de moléculas de lípido anfipático y un lípido anfipático extendido, y combinando insulina en el constructo lipídico.

30 Se produjo una mezcla de moléculas de lípido anfipático y un lípido anfipático extendido usando el siguiente procedimiento. Se preparó una mezcla de los componentes lipídicos [masa total de 8,5316 g] del constructo lipídico combinando alícuotas de los lípidos 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (5,6881 g), colesterol cristalino (0,7980 g), fosfato de dicetilo (1,5444 g), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Cap-biotinilo) (0,1436 g), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (0,1144 g), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo) (0,1245 g) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (sal de sodio) (0,1186 g).

35 Se deshidrató una disolución de 100 ml de cloroformo:metanol (2:1 v:v) sobre 5,0 gramos de tamices moleculares. Se colocó la mezcla de los componentes lipídicos de constructo lipídico en un matraz de 3 litros y se añadieron 45 ml de la disolución de cloroformo/metanol a la mezcla de lípidos. Se colocó la disolución en matraz en un rotoevaporador con un baño de agua a  $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y se giró lentamente. Se eliminó la disolución de cloroformo/metanol a vacío en un evaporador rotatorio usando un aspirador durante aproximadamente 45 minutos, seguido por una bomba de vacío durante aproximadamente dos horas para eliminar disolvente residual, y se formó la mezcla sólida de los lípidos. Puede almacenarse la mezcla secada de lípidos en un congelador a aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ - $0^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de tiempo indefinido.

40 Se preparó el constructo lipídico a partir de la mezcla de moléculas de lípido anfipático y un lípido anfipático extendido usando el siguiente procedimiento. Se mezcló la mezcla de lípidos con aproximadamente 600 ml de tampón fosfato de sodio (monobásico-dibásico) 28,4 mM a pH 7,0. Se agitó la mezcla de lípidos, luego se colocó en un baño de agua calentada a  $80^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  durante 30 mientras se giraba lentamente para hidratar los lípidos.

45 Se precalentó un microfluidizador M-110 EHI hasta  $70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  usando SWI con un pH entre 6,5 - 7,5. Se transfirió la suspensión del complejo diana hidratado al microfluidizador y se microfluidizó a aproximadamente 9000 psig usando un pase de la suspensión del complejo de molécula diana hidratado a través del fluidizador. Después de pasar a través del microfluidizador, se recogió una muestra no filtrada (2,0 - 5,0 ml) de la suspensión fluidizada para análisis de tamaño de partícula usando datos de distribución unimodal de un analizador de tamaño de partícula N-4 plus de Coulter. Antes de todas las determinaciones de tamaño de partícula, se diluyó la muestra con SWI filtrada en filtro de 0,2 micrómetros a la que se le ha ajustado el pH a entre 6,5 - 7,5. Se requirió que el tamaño de partícula oscilara entre 0,020 - 0,40 micrómetros. Si el tamaño de partícula no estaba dentro de este intervalo, se hizo pasar la suspensión a través del microfluidizador de nuevo a aproximadamente 9000 psig, y se analizó el tamaño de partícula de nuevo hasta que se alcancen los requisitos de tamaño de partícula. Se recogió el complejo de molécula diana microfluidizado en un recipiente estéril.

55 Se mantuvo el complejo de molécula diana microfluidizado a  $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  mientras se filtraba dos veces a través de

un filtro Gang de 0,8 micrómetros + 0,2 micrómetros estéril unido a una jeringa de 5,0 ml. Se analizó una alícuota de la suspensión filtrada para determinar el intervalo de tamaño de partícula de las partículas en la suspensión. El intervalo de tamaño de partícula de la muestra final filtrada con filtro de 0,2 micrómetros debe estar en el intervalo de desde 0,0200 - 0,2000 micrómetros tal como se determina a partir de la impresión de la distribución unimodal del analizador de tamaño de partícula.

Se introduce insulina en el constructo mediante introducción inversa del constructo usando los métodos descritos en el documento U.S. 5.104.661.

Ejemplo experimental 5. Método de uso

Se evaluó la eficacia de la vesícula de direccionamiento hepático (HDV)-insulina sobre el glucógeno hepático en un modelo de rata. Se dividió un total de 60 ratas Sprague-Dawley macho (de 8 semanas de edad; 250 g) en cinco grupos de tratamiento tal como se describe a continuación.

Para el primer día del estudio, se sometieron a ayuno todas las ratas durante 24 horas con agua a voluntad. En el segundo día, a las ratas se les inyectó por vía intraperitoneal una mezcla de aloxano y estreptozotocina (AS). Se preparó la mezcla de aloxano y estreptozotocina en tampón fosfato 0,01 M pH 7 pesando 5 mg por ml de cada material de modo que la concentración final es de 5 mg de aloxano por ml y 5 mg de estreptozotocina por ml. A la mezcla de AS se le administraron 0,5 ml de la mezcla de aloxano y estreptozotocina mediante inyección intraperitoneal a 20 mg/kg de peso corporal (10 mg/kg de aloxano y 10 mg/kg de estreptozotocina). AS provocará una liberación masiva de insulina, lo que da como resultado una hipoglucemia profunda y transitoria unas pocas horas después de inyectar AS. Se inyectó una disolución de glucosa en agua al 10% por vía subcutánea según fuera necesario para prevenir la hipoglucemia y mantener a las ratas hidratadas de manera adecuada durante el segundo día. Estaban disponibles a voluntad una dieta de comida normal y agua.

En el tercer día, se toma una muestra de glucemia de la vena de la cola de nivel inicial a los 0 minutos, seguido inmediatamente por una inyección subcutánea de una de las siguientes disoluciones a 0,32 U de insulina/rata, correspondiente al grupo al que se asignó la rata.

(1) HDV-insulina con un control (positivo) de molécula dirigida a hepatocitos (HTM) de Cr-disofenina [policromo-poli(bis)-[ácido N-(2,6-(diisopropilfenil)carbamoil-metil)iminodiacético]]. No hubo lípido anfipático extendido presente. La cantidad de lípidos anfipáticos presentes proporcionó una dosis de aproximadamente 14,5 microgramos de lípidos anfipáticos por kilogramo de rata.

(2) Control (negativo) de insulina regular;

(3) Material de prueba 1 de HDV-insulina, en el que el lípido anfipático extendido era biotina-X-DHPE [fosfato de trietilamonio-2,3-diacetoxipropilo y 2-(6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)etilo]. La cantidad de lípidos anfipáticos presentes proporcionó una dosis de aproximadamente 14,5 microgramos de lípidos anfipáticos por kilogramo de rata. La cantidad de lípido anfipático extendido presente proporcionó una dosis de aproximadamente 191 nanogramos de lípido anfipático extendido por kilogramo de rata.

(4) Material de prueba 2 de HDV-insulina, en el que el lípido anfipático extendido era biotina-DHPE [fosfato de trietilamonio-2,3-diacetoxipropilo y 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etilo]. La cantidad de lípidos anfipáticos presentes proporcionó una dosis de aproximadamente 7,25 microgramos de lípidos anfipáticos por kilogramo de rata. La cantidad de lípido anfipático extendido presente proporcionó una dosis de aproximadamente 95,5 nanogramos de lípido anfipático extendido por kilogramo de rata.

(5) Material de prueba 3 de HDV-insulina, en el que el lípido anfipático extendido era biotina-DHPE [fosfato de trietilamonio-2,3-diacetoxipropilo y 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etilo]. La cantidad de lípidos anfipáticos presentes proporcionó una dosis de aproximadamente 14,5 microgramos de lípidos anfipáticos por kilogramo de rata. La cantidad de lípido anfipático extendido presente proporcionó una dosis de aproximadamente 191 nanogramos de lípido anfipático extendido por kilogramo de rata.

Para los grupos de tratamiento 1 y 3-5, los lípidos anfipáticos eran una mezcla de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol y fosfato de dicetilo.

A los "0" minutos, a cada rata también se le proporcionaron por sonda 375 mg de glucosa en 3,75 ml de agua (glucosa al 10%).

Se anestesiaron la mitad de los animales de cada grupo y se sacrificaron usando ketamina (150 mg/kg)/xilazina (15 mg/kg) a una hora minutos y las ratas restantes a las 2 horas por vía i.p. Estudios previos con HTM de Cr-disofenina han mostrado el efecto estadísticamente significativo a lo largo de 2 horas. Se extirpó todo el hígado y se almacenó en nitrógeno líquido a -80°C hasta que se analizó para determinar el glucógeno hepático.

Se determinó el glucógeno hepático mediante el siguiente procedimiento que lo describen Ong KC y Kho HE, Life

Sciences 67 (2000) 1695-1705. Se homogeneizaron cantidades pesadas (0,3-0,5 g) de tejido de hígado congelado en 10 volúmenes de KOH al 30% enfriado con hielo y luego se llevaron a ebullición a 100°C durante 30 minutos. Se precipitó el glucógeno con etanol, se granuló, se lavó y se resolubilizó en agua destilada. Se determinó el contenido de glucógeno tratando la disolución acuosa con reactivo de antrona (1 g de antrona disuelto en 500 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc.). Se midió la absorbancia de la disolución a 625 nm en un espectrómetro y se calculó la cantidad de glucógeno presente.

Se muestran los resultados en la figura 17, que compara la concentración de glucógeno presente en el hígado para los cinco grupos de tratamiento. Los valores son el promedio de los valores a una y dos horas, que fueron similares entre sí. Se usó insulina regular, que se ha mostrado que es ineficaz como estimulante para el almacenamiento de glucógeno y glucosa hepática, como control negativo. HDV-insulina con la HTM de Cr-disofenina era el control positivo y tenía un contenido de glucógeno significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el que tenía el control negativo de insulina regular. Por tanto, se observaron las diferencias estadísticas y biológicamente significativas esperadas entre los controles negativo y positivo tras la dosificación.

Los materiales de prueba 1 y 3, que tenían los lípidos anfipáticos extendidos biotina-DHPE [fosfato de trietilamonio-2,3-diacetoxipropilo y 2-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etilo] y biotina-X-DHPE [fosfato de trietilamonio-2,3-diacetoxipropilo y 2-(6-(5-((3aS,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)etilo] tenían niveles de glucógeno estadísticamente mayores ( $p = 0,05$ ) que los que tenía la insulina regular. El material de prueba 2, que también tenía biotina-X-DHPE, pero con concentraciones de lípidos que eran la mitad de las que había en el material de prueba 3, tenía niveles de glucógeno que eran mayores, pero la variabilidad dentro del grupo era lo suficientemente grande como para proporcionar un valor  $p = 0,08$ .

#### Ejemplo experimental 6. Composición farmacéutica de HDV-insulina glargina

Una composición dirigida a hepatocitos comprende una mezcla de insulina glargina libre e insulina glargina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua. El complejo comprende múltiples unidades individuales unidas y una matriz de constructo lipídico, que comprende una mezcla de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina, colesterol, fosfato de dicetilo. El agente de formación de puente policromo-poli(bis)[ácido N-(2,6-diisopropilfenilcarbamoilmetil)iminodiacético] está presente dentro del complejo.

#### Ejemplo experimental 7. Preparación de HDV-insulina glargina

Se produjo una mezcla intermedia de los componentes de un complejo de molécula diana mediante el siguiente procedimiento. Se preparó una mezcla de los componentes [masa total de 2,830 g] de un complejo de molécula diana añadiendo alícuotas de los lípidos 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina (2,015 g), colesterol cristalino (0,266 g) y fosfato de dicetilo (0,515 g) al agente de formación de puente, policromo-poli(bis)[ácido N-(2,6-diisopropilfenilcarbamoilmetil)iminodiacético] (0,034 g). Se había deshidratado una disolución de cloroformo (50 ml) y metanol (25 ml) sobre tamices moleculares. Se añadió la mezcla de los componentes del complejo de molécula diana a la disolución de cloroformo/metanol, que luego se colocó en un baño de agua a  $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para formar una disolución. Se eliminó la disolución de cloroformo/metanol a vacío en un evaporador rotatorio usando un aspirador, seguido por una bomba de vacío, y se formó la mezcla intermedia sólida.

Se produjo un complejo de molécula diana mediante el siguiente procedimiento. Se ajustó el pH de 530 ml de agua estéril para inyección, USP (SWI) a entre pH 6,5 - 7,5 mediante la adición de 105  $\mu\text{l}$  de una disolución de NaOH 0,1 N. Se añadió suficiente agua para producir 200 g de producto. Se añadió SWI, a la que se le ajustó el pH, a la mezcla intermedia (2,830 g) y se hidrató la mezcla intermedia colocando la mezcla en un baño de agua a  $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  mientras se hacía rotar la mezcla durante aproximadamente 30 minutos  $\pm$  15 minutos, o hasta que la mezcla era una suspensión que parecía uniforme. Durante el proceso anterior, el pH de la suspensión disminuyó. Entonces se ajustó el pH de la suspensión hasta  $\text{pH } 5,44 \pm 0,5$  unidades de pH mediante la adición de aproximadamente 1,0 ml de NaOH 0,1 N.

Se transfirió la suspensión del complejo diana hidratado a un microfluidizador modelo M-110 EHI que se precalentó hasta  $70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  con tampón fosfato de sodio 28 mM a pH 7,0. Se microfluidizó la suspensión a 9.000 psig usando un pase de la suspensión del complejo de molécula diana hidratado a través del fluidizador. Después de pasar a través del microfluidizador, se recogió una muestra no filtrada (2,0 - 5,0 ml) de la suspensión fluidizada para análisis de tamaño de partícula usando datos de distribución unimodal de un analizador de tamaño de partícula N-4 plus de Coulter. Antes de todas las determinaciones de tamaño de partícula, se diluyó la muestra con SWI filtrada en filtro de 0,2 micrómetros a la que se le ha ajustado el pH a entre 6,5 - 7,5. Se requirió que el tamaño de partícula oscilara entre 0,020 - 0,40 micrómetros. Si el tamaño de partícula no estaba dentro de este intervalo, se hizo pasar la suspensión a través del microfluidizador de nuevo, y se analizó el tamaño de partícula de nuevo hasta que se alcanzaron los requisitos de tamaño de partícula. Se recogió el complejo de molécula diana microfluidizado en un recipiente estéril.

Se mantuvo la suspensión del complejo de molécula diana microfluidizado a  $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  mientras se filtraba dos veces a través de un filtro Gang de 0,8 micrómetros + 0,2 micrómetros estéril unido a una jeringa de 5,0 ml. Se analizó una alícuota de la suspensión filtrada para determinar el intervalo de tamaño de partícula de las partículas en

la suspensión. El tamaño de partícula de la muestra final filtrada en filtro de 0,2 micrómetros estaba en el intervalo de desde 0,0200 - 0,2000 micrómetros, tal como se determina a partir de la impresión de la distribución unimodal del analizador de tamaño de partícula. El pH de la suspensión filtrada del complejo de molécula diana era de  $3,74 \pm 0,2$  unidades de pH antes del ajuste del pH. Se almacenaron las muestras en una nevera a entre  $2^{\circ}$ - $8^{\circ}$ C hasta su uso posterior.

Se produjo la composición farmacéutica que comprendía una mezcla de insulina glargina libre e insulina glargina asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua, también denominada HDV-insulina glargina, mediante el siguiente proceso. Se ajustó el pH de una alícuota de 5,0 ml de la suspensión filtrada dos veces del complejo de molécula diana desde un pH inicial de  $pH 3,74 \pm 0,2$  hasta  $pH 5,2 \pm 0,5$  mediante la adición secuencial de NaOH 0,1 estéril según el siguiente procedimiento:

pH 3,74 + 10  $\mu$ l de NaOH 0,1 N  $\rightarrow$  pH 3,96

pH 3,96 + 20  $\mu$ l de NaOH 0,1 N  $\rightarrow$  pH 4,52

pH 4,52 + 10  $\mu$ l de NaOH 0,1 N  $\rightarrow$  pH 4,69

pH 4,69 + 10  $\mu$ l de NaOH 0,1 N  $\rightarrow$  pH 5,01

pH 5,01 + 10  $\mu$ l de NaOH 0,1 N  $\rightarrow$  pH 5,20

Se combinó una alícuota de 1,6 ml de la suspensión de complejo de molécula diana a  $pH 5,20 \pm 0,5$  con 18,4 ml de SWI, que se había ajustado a  $pH 3,95 \pm 0,2$ . Se ajustó el pH de la suspensión resultante desde  $pH 4,89$  hasta  $pH 5,27 \pm 0,5$  mediante la adición de  $10 \mu$ l  $\pm 1,0 \mu$ l de NaOH 0,1 N.

Se aumentó el pH de una alícuota de 5,0 ml de insulina glargina Lantus® - insulina U-100 desde  $pH 3,88 \pm 0,2$  hasta  $pH 4,78 \pm 0,5$  mediante la adición de  $60 \mu$ l  $\pm 2 \mu$ l de NaOH 0,1 N estéril con mezclado. Se añadió una alícuota de  $2,5 \text{ ml} \pm 0,1 \text{ ml}$  de la suspensión del complejo de molécula diana a  $pH 5,27 \pm 0,5$  a  $5,0 \text{ ml} \pm 0,1 \text{ ml}$  de la disolución de insulina glargina a  $pH 4,78 \pm 0,5$  para producir la composición farmacéutica que contiene una mezcla de insulina glargina libre e insulina glargina asociada con el complejo de molécula diana insoluble en agua. El producto contenía 66,1 U.I. de insulina glargina/ml de suspensión. Puede producirse la mezcla de insulina glargina libre e insulina glargina asociada con el complejo en un vial de insulina glargina *in situ* con el fin de fabricar formas de dosificación individuales.

#### Ejemplo 8. Método de uso de HDV-insulina glargina para el control de la glucemia en pacientes con diabetes mellitus tipo

Se administró HDV-insulina glargina a pacientes para determinar la capacidad de HDV-insulina glargina para controlar la glucemia posprandial. Se seleccionaron siete pacientes con diabetes mellitus tipo I. Se examinaron y se seleccionaron los pacientes cuidadosamente según los criterios indicados en el protocolo del estudio. Se trataron los pacientes con insulina glargina basal y una insulina de acción inmediata en las horas de las comidas antes de entrar en el periodo de tratamiento con HDV-insulina glargina. Se monitorizaron los pacientes (mediante diarios y contacto con el centro) durante cuatro días antes de la administración de HDV-insulina glargina para garantizar que tenían un control aceptable de su glucemia. Se estableció que los niveles de glucosa en ayunas por la mañana estaban en el intervalo de 100-150 mg/dl.

Durante el estudio, la dosis de HDV-insulina glargina para cada paciente fue 1,2 veces su dosis diaria habitual de insulina glargina basal para compensar la cantidad de insulina de acción inmediata que no recibirían en los días de prueba. Se tomaron muestras de sangre según un programa establecido a lo largo de 13 horas. Se añadió HDV a insulina glargina usando el método descrito previamente para producir una suspensión con una concentración final de 66,1 U.I. de glargina/ml y 0,37 mg de HDV/ml. A los pacientes se les inyectó HDV-insulina glargina una hora antes del desayuno por la mañana. En cada una de las tres comidas diarias, desayuno, almuerzo y cena, un especialista en dietética prescribió una comida con 60 gramos de hidratos de carbono.

A continuación se describen los resultados de los experimentos presentados en este ejemplo experimental. Los pacientes toleraron bien la HDV-insulina glargina y no se observaron reacciones adversas en los sitios de inyección. No se observaron reacciones hipoglucémicas en pacientes que recibieron este tratamiento. Los valores de glucemia de pacientes tratados con HDV-insulina glargina se presentan gráficamente en la figura 18. La figura 18 muestra que las concentraciones de glucemia aumentaron, tal como se anticipaba, tras las comidas y las concentraciones de glucosa disminuyeron a lo largo del tiempo hasta que se ingirió la siguiente comida. Se observó este patrón para los cuatro pacientes. La figura 19 muestra el efecto de una dosis única de HDV-insulina glargina sobre las concentraciones de glucemia promedio en pacientes que consumen tres comidas durante el día. Como con los pacientes individuales, las concentraciones de glucemia aumentaron tras las comidas y las concentraciones de glucosa disminuyeron a lo largo del tiempo hasta que se ingirió la siguiente comida. Las concentraciones de glucemia promedio estaban por encima del valor inicial en todos los puntos de tiempo. La curva sugiere que la eficacia de HDV-insulina glargina mejoró durante todo el día dado que hubo menos variación entre las

concentraciones altas y bajas después de las comidas del almuerzo y la cena que el desayuno. El efecto de HDV-insulina glargina sobre las concentraciones de glucemia a lo largo del tiempo con relación a las concentraciones de glucemia en estado de ayuno se muestran en la figura 20. Las concentraciones de glucemia aumentaron tras las comidas, luego disminuyeron a lo largo del tiempo hacia la concentración de glucosa en estado de ayuno hasta que se ingirió la siguiente comida. Las concentraciones de glucemia estaban por encima de las concentraciones en estado de ayuno en la totalidad del estudio. El tratamiento de pacientes con HDV-insulina glargina dio como resultado un cierto grado de control de la glucemia posprandial, lo que indica HDV podía transportar cantidades suficientes de insulina glargina al hígado en las horas de las comidas para proporcionar este control. La glucemia fue la típica de pacientes con diabetes tipo I que reciben habitualmente terapia con insulina basal más insulinas de acción inmediata en las horas de las comidas.

#### Ejemplo experimental 9. Composición farmacéutica de HDV-insulina Humulin NPH n.º1

Una composición dirigida a hepatocitos comprende una mezcla de insulina isofana humana recombinante libre e insulina isofana humana recombinante asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua. El complejo comprende múltiples unidades individuales unidas y una matriz de constructo lipídico que comprende una mezcla de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol, fosfato de dicetilo. El agente de formación de puente policromo-poli(bis)[ácido N-(2,6-diisopropilfenilcarbamoilmetil)iminodiacético] está presente dentro del complejo.

#### Ejemplo experimental 10. Composición farmacéutica de HDV-insulina Humulin NPH n.º2

Una composición dirigida a hepatocitos comprende una mezcla de insulina isofana humana recombinante libre, insulina libre regular humana recombinante, e insulina isofana humana recombinante e insulina regular humana recombinante asociada con un complejo de molécula diana insoluble en agua. El complejo comprende múltiples unidades individuales unidas y una matriz de constructo lipídico que comprende una mezcla de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol, fosfato de dicetilo. El agente de formación de puente policromo-poli(bis)[ácido N-(2,6-diisopropilfenilcarbamoilmetil)iminodiacético] está presente dentro del complejo.

#### Ejemplo experimental 11. Preparación de HDV-insulina Humulin NPH

Se produjo una mezcla intermedia de los componentes de un complejo de molécula diana mediante el siguiente procedimiento. Se preparó una mezcla de los componentes [masa total de 2,830 g] de un complejo de molécula diana añadiendo alícuotas de los lípidos 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (2,015 g), colesterol cristalino (0,266 g) y fosfato de dicetilo (0,515 g) al agente de formación de puente, policromo-poli(bis)[ácido N-(2,6-diisopropilfenilcarbamoilmetil)iminodiacético] (0,034 g). Se había deshidratado una disolución de cloroformo (50 ml) y metanol (25 ml) sobre tamices moleculares. Se añadió la mezcla de los componentes del complejo de molécula diana a 25,0 ml de la disolución de cloroformo/metanol, que luego se colocó en un baño de agua a  $60^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  para formar una disolución. Se eliminó la disolución de cloroformo/metanol a vacío en un evaporador rotatorio usando un aspirador, seguido por una bomba de vacío, y se formó la mezcla intermedia sólida.

Se produjo un complejo de molécula diana mediante el siguiente proceso. Se añadieron aproximadamente 200 ml de tampón fosfato de sodio 28 mM a pH 7,0 a la mezcla intermedia para formar una suspensión acuosa. Se hidrató la suspensión acuosa en un baño de agua a  $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  mientras se hacía rotar la mezcla durante aproximadamente 30 minutos  $\pm$  15 minutos o hasta que la mezcla era una suspensión que parecía uniforme.

Se transfirió la suspensión del complejo diana hidratado a un microfluidizador modelo M-110 EHI que se precalentó hasta  $70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  con tampón fosfato de sodio 28 mM a pH 7,0. Se microfluidizó la suspensión a 9.000 psig usando un pase de la suspensión del complejo de molécula diana hidratado a través del fluidizador. Después de pasar a través del microfluidizador, se recogió una muestra no filtrada (2,0 - 5,0 ml) de la suspensión fluidizada para análisis de tamaño de partícula usando datos de distribución unimodal de un analizador de tamaño de partícula N-4 plus de Coulter. Antes de todas las determinaciones de tamaño de partícula, se diluyó la muestra con tampón fosfato de sodio 28 mM pH 7,0. Si el tamaño de partícula no estaba dentro del intervalo de 0,020 - 0,40 micrómetros, se hizo pasar la suspensión a través del microfluidizador de nuevo, y el tamaño de partícula se analizó de nuevo. Esto se repite hasta que el tamaño de partícula está dentro del intervalo de 0,020 - 0,40 micrómetros. Se recogió la suspensión del complejo de molécula diana microfluidizado en un recipiente estéril.

Se mantuvo la suspensión del complejo de molécula diana microfluidizado a  $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  mientras se filtraba a través de un filtro Gang de 0,8 micrómetros + 0,2 micrómetros estéril unido a una jeringa de 5,0 ml. Se analizó una alícuota de la suspensión filtrada para determinar el intervalo de tamaño de partícula de partículas en la suspensión. El tamaño de partícula de la muestra final filtrada en filtro de 0,2 micrómetros estaba en el intervalo de desde 0,0200 - 0,2000 micrómetros, tal como se determina a partir de la impresión de la distribución unimodal del analizador de tamaño de partícula. El pH de la suspensión filtrada del complejo de molécula diana era de  $7,0 \pm 0,5$  unidades de pH. Se almacenaron las muestras en una nevera a entre  $2^{\circ}\text{-}8^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

La suspensión de HDV-lípido filtrada contenía 14,15 mg de HDV-lípido/ml. Se añadió una alícuota de 0,8 ml de esta suspensión a un vial de 10,0 ml de insulina Humulin R y se permitió que incubara durante varios días a  $2^{\circ}\text{-}8^{\circ}\text{C}$ . Luego, se retiraron 5,0 ml de la suspensión de HDV-insulina Humulin R de 10,0 ml con una jeringa estéril. A los 5,0

5 ml restantes de insulina Humulin R en el vial, se añadieron 5,0 ml de insulina Humulin NPH para formar el producto de HDV final. La composición de HDV final contenía 93,6 unidades de HDV-insulina Humulin R y HDV-insulina Humulin NPH combinadas/ml de suspensión y 0,52 mg de HDV-lípido/ml. Esta composición, que puede producirse *in situ* para fabricar formas de dosificación individuales, comprendía una mezcla de insulina Humulin R libre, insulina Humulin NPH libre y tanto insulina Humulin R como insulina Humulin NPH asociadas con un constructo lipídico.

Ejemplo 12. Método de uso de HDV-insulina Humulin R y HDV-insulina Humulin NPH combinadas para el control de la glucemia en pacientes con diabetes mellitus tipo I

10 Se administró HDV-insulina Humulin NPH a pacientes para determinar la capacidad de HDV-insulina Humulin NPH para controlar la glucemia posprandial. Se seleccionaron siete pacientes con diabetes mellitus tipo I. Se examinaron y se seleccionaron los pacientes cuidadosamente según los criterios indicados en el protocolo del estudio. Se trataron los pacientes con insulina basal Humulin NPH y una insulina de acción inmediata en las horas de las comidas antes de entrar en el periodo de tratamiento con HDV-insulina Humulin NPH. Se monitorizaron los pacientes (mediante diarios y contacto con el centro) durante cuatro días antes de la administración de HDV-insulina Humulin NPH para garantizar que tenían un control aceptable de su glucemia. Se estableció que la glucemia en estado de ayuno por la mañana tenía que estar en el intervalo de 100-150 mg/dl.

15 Durante el estudio, la dosis de HDV-insulina Humulin NPH para cada paciente fue 1,2 veces su dosis diaria habitual de insulina basal Humulin NPH para compensar la cantidad de insulina de acción inmediata que no recibirían en los días de prueba. Se tomaron muestras de sangre según un programa establecido a lo largo de 13 horas. Se añadió HDV a la insulina Humulin NPH usando el método descrito previamente para producir una suspensión con una concentración final de 93,6 unidades de HDV-insulina Humulin R y HDV-insulina Humulin NPH combinadas/ml. La suspensión final contenía 0,52 mg de HDV-lípido/ml. A los pacientes se les inyectaron las HDV-insulinas combinadas una hora antes del desayuno por la mañana. En cada una de las tres comidas diarias, desayuno, almuerzo y cena, un especialista en dietética prescribió una comida con 60 gramos de hidratos de carbono.

20 A continuación se describen los resultados de los experimentos presentados en este ejemplo experimental. Los pacientes toleraron bien la HDV-insulina Humulin NPH y no se observaron reacciones adversas en los sitios de inyección. No se observaron reacciones hipoglucémicas en pacientes que recibieron este tratamiento. Los valores de glucemia de pacientes tratados con HDV-insulina Humulin NPH se presentan gráficamente en la figura 21. La figura 21 muestra que las concentraciones de glucemia aumentaron, tal como se anticipaba, tras las comidas y las concentraciones de glucosa disminuyeron a lo largo del tiempo hasta que se ingirió la siguiente comida. Se observó este patrón para los cuatro pacientes. La figura 22 muestra el efecto de una dosis única de HDV-insulina Humulin NPH sobre las concentraciones de glucemia promedio en pacientes que consumen tres comidas durante el día. Como con los pacientes individuales, las concentraciones de glucemia aumentaron tras las comidas y las concentraciones de glucosa disminuyeron a lo largo del tiempo hasta que se ingirió la siguiente comida. Las concentraciones de glucemia promedio estaban por encima del valor inicial en todos los puntos de tiempo. La curva sugiere que la eficacia de HDV-insulina Humulin NPH mejoró durante todo el día dado que hubo menos variación entre las concentraciones altas y bajas después de las comidas del almuerzo y la cena que el desayuno. El efecto de HDV-insulina Humulin NPH sobre las concentraciones de glucemia a lo largo del tiempo con relación a las concentraciones de glucemia en estado de ayuno se muestra en la figura 23. Las concentraciones de glucemia aumentaron tras las comidas, luego disminuyeron a lo largo del tiempo hacia la concentración de glucosa en estado de ayuno hasta que se ingirió la siguiente comida. Las concentraciones de glucemia estaban por encima de las concentraciones en estado de ayuno en la totalidad del estudio. El tratamiento de pacientes con HDV-insulina Humulin NPH dio como resultado cierto grado de control de glucemia posprandial, lo que indica que HDV podía transportar cantidades suficientes de insulina Humulin NPH al hígado en las horas de las comidas para proporcionar este control. La glucemia fue la típica de pacientes con diabetes tipo I que reciben habitualmente terapia con insulina basal más insulinas de acción inmediata en las horas de las comidas.

**Lista de secuencias**

- <110> SDG, Inc.
- <120> Constructo lipídico para la administración de insulina a un mamífero
- <130> EP55374HV121pau
- 50 <140> Documento EP 06 760 032.0
- <141> 16-05-2006
- <150> Documento PCT/US2006/019119
- <151> 16-05-2006
- <150> Documento US 11/384.728

<151> 20-03-2006

<150> Documento US 11/384.659

<151> 20-03-2006

<150> Documento US 60/683.878

5 <151> 23-05-2005-05

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 53

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de insulina glargina humana sintetizado de manera recombinante

<400> 1

Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu  
20 25 30

Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Arg Arg Thr Lys  
35 40 45

15 Pro Thr Tyr Phe Phe  
50

<210> 2

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia de protamina artificial

<400> 2

Met Pro Arg Arg Arg Arg Ser Ser Ser Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg  
1 5 10 15

Arg Pro Arg Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg  
20 25 30

Arg

## REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una insulina libre y un constructo lipídico que comprende una insulina asociada con el constructo lipídico, un lípido anfipático y un lípido anfipático extendido, en la que el lípido anfipático extendido comprende restos proximal, medio y distal, en la que el resto proximal conecta el lípido anfipático extendido al constructo, el resto distal dirige el constructo a un receptor presentado por un hepatocito, y el resto medio conecta los restos proximal y distal, en la que el lípido anfipático comprende al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol, fosfato de dicetilo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-[3-fosfo-rac-(1-glicero)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo), derivados de los mismos, y mezclas de cualquiera de los compuestos anteriores; y en la que el lípido anfipático extendido se selecciona del grupo que consiste en N-hidroxisuccinimida (NHS)-biotina; sulfo-NHS-biotina; N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga; sulfo-N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga; D-biotina; biocitina; sulfo-N-hidroxisuccinimida-S-S-biotina; biotina-BMCC; biotina-HPDP; yodoacetil-LC-biotina; hidrazida de biotina; hidrazida de biotina-LC; hidrazida de biocitina; biotina-cadaverina; carboxibiotina; fotobiotina; trifluoroacetato de  $\rho$ -aminobenzoil-biocitina;  $\rho$ -diazobenzoil-biocitina; biotina-DHPE; biotina-X-DHPE; ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; éster succinidimílico del ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; S-biotinil-homocisteína; biocitina-X; hidrazida de biocitina X; biotina-etilendiamina; biotina-XL; biotina-X-etilendiamina; hidrazida de biotina-XX; biotina-XX-SE; biotina-XX, SSE; biotina-X-cadaverina;  $\alpha$ -(t-BOC)biocitina; N-(biotinil)-N'-(yodoacetil)etilendiamina; DNP-X-biocitina-X-SE; hidrazida de biotina-X; clorhidrato de norbiotinamina; 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina; ARP; sulfóxido de biotina-I; éster metílico de biotina; biotina-maleimida; biotina-poli(etilenglicol)amina; sal de sodio del ácido (+)-biotina-4-amidobenzoico; 2-N-acetilamino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido de biotina; biotina- $\alpha$ -D-N-acetilneuraminida;  $\alpha$ -L-fucósido de biotina; lacto-N-biócido de biotina; trisacárido de biotina-Lewis-A; tetrasacárido de biotina-Lewis-Y;  $\alpha$ -D-manopiranosido de biotina; y 6-O-fosfo- $\alpha$ -D-manopiranosido de biotina.
 

5

10

15

20
2. Composición según la reivindicación 1, en la que la insulina y/o la insulina libre se seleccionan del grupo que consiste en insulina lispro, insulina aspart, insulina regular, insulina glargina, insulina-zinc, insulina humana-zinc extendida, insulina isofana, insulina regular tamponada humana, insulina glulisina, insulina regular humana recombinante, insulina isofana humana recombinante, combinaciones premezcladas de cualquiera de las insulinas mencionadas anteriormente y una combinación de cualquiera de las insulinas mencionadas anteriormente.
 

25

30
3. Composición según la reivindicación 1, en la que el constructo comprende una carga positiva, una carga negativa o combinaciones de las mismas.
4. Composición según la reivindicación 1, que comprende además acetato-hidrogenoftalato de celulosa.
5. Composición según la reivindicación 1, que comprende además al menos una molécula orgánica cargada unida a la insulina.
 

35
6. Composición según la reivindicación 5, en la que la molécula orgánica cargada se selecciona del grupo que consiste en protaminas, derivados de polilisina, polímeros de aminoácidos altamente básicos, poli(Arg-Pro-Thr)<sub>n</sub> en una razón molar de 1:1:1, poli(DL-Ala-poli-L-Lys)<sub>n</sub> en una razón molar de 6:1, histonas, polímeros de azúcar que contienen una carga positiva a la que contribuye un grupo amino primario, polinucleótidos con grupos amino primarios, polímeros carboxilados y aminoácidos poliméricos, fragmentos de proteínas que contienen grandes cantidades de residuos de aminoácido con grupos funcionales carboxilo (COO<sup>-</sup>) o sulfhidrilo (S<sup>-</sup>), derivado de proteínas con grupos carboxilo ácidos terminales cargados negativamente, polímeros ácidos, polímeros de azúcar que contienen grupos carboxilo cargados negativamente, un derivado de los mismos, y cualquier combinación de los compuestos mencionados anteriormente.
 

40
7. Método de fabricación de una composición que comprende insulina libre y un constructo lipídico que comprende una insulina asociada con el constructo lipídico, un lípido anfipático y un lípido anfipático extendido, en el que el lípido anfipático extendido comprende restos proximal, medio y distal, en el que el resto proximal conecta el lípido anfipático extendido al constructo, el resto distal dirige el constructo a un receptor presentado por un hepatocito, y el resto medio conecta los restos proximal y distal, en el que el lípido anfipático comprende al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol, fosfato de dicetilo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-[3-fosfo-rac-(1-glicero)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-[3-fosfo-rac-(1-glicero)], derivados de los mismos, y mezclas de cualquiera de los compuestos anteriores; y en el que el lípido anfipático extendido se selecciona del grupo que consiste en N-hidroxisuccinimida (NHS)-biotina; sulfo-NHS-biotina; N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga; sulfo-N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga; D-biotina; biocitina; sulfo-N-hidroxisuccinimida-S-S-biotina; biotina-BMCC; biotina-HPDP; yodoacetil-LC-biotina; hidrazida de biotina; hidrazida de biotina-LC; hidrazida de biocitina; biotina-cadaverina; carboxibiotina; fotobiotina; trifluoroacetato de  $\rho$ -aminobenzoil-biocitina;  $\rho$ -diazobenzoil-biocitina; biotina-DHPE; biotina-X-DHPE; ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; éster succinidimílico del ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; S-biotinil-homocisteína; biocitina-X; hidrazida de biocitina X; biotina-
 

45

50

55

60

- etilendiamina; biotina-XL; biotina-X-etilendiamina; hidrazida de biotina-XX; biotina-XX-SE; biotina-XX, SSE; biotina-X-cadaverina;  $\alpha$ -(t-BOC)biocitina; N-(biotinil)-N'-(yodoacetil)etilendiamina; DNP-X-biocitina-X-SE; hidrazida de biotina-X; clorhidrato de norbiotinamina; 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina; ARP; sulfóxido de biotina-I; éster metílico de biotina; biotina-maleimida; biotina-poli(etilenglicol)amina; sal de sodio del ácido (+)-biotina-4-amidobenzoico; 2-N-acetilamino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido de biotina; biotina- $\alpha$ -D-N-acetilneuraminida;  $\alpha$ -L-fucósido de biotina; lacto-N-biósido de biotina; trisacárido de biotina-Lewis-A; tetrasacárido de biotina-Lewis-Y;  $\alpha$ -D-manopiranosido de biotina; y 6-O-fosfo- $\alpha$ -D-manopiranosido de biotina; comprendiendo el método las etapas de:
- a. crear una mezcla que comprende el lípido anfipático y un lípido anfipático extendido;
  - b. formar una suspensión del constructo lipídico en medios acuosos; y
  - c. introducir la insulina en el constructo lipídico.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la etapa de introducir la insulina en el constructo lipídico comprende introducción en equilibrio e introducción sin equilibrio.
9. Método según la reivindicación 7, en el que la etapa de introducir la insulina en el constructo lipídico comprende añadir una disolución que contiene insulina libre a una mezcla del constructo lipídico en medios acuosos y permitir que la insulina permanezca en contacto con la mezcla hasta que se alcance el equilibrio.
10. Método según la reivindicación 7, que comprende además la etapa de:
- d. introducir de manera terminal la insulina en el constructo lipídico después de que la mezcla alcance el equilibrio, en el que la disolución que contiene insulina libre se retira del constructo, en el que además el constructo comprende insulina.
11. Método según la reivindicación 10, que comprende además la etapa de:
- e. retirar la disolución que contiene insulina libre del constructo lipídico que contiene insulina asociada con el constructo mediante un proceso seleccionado del grupo que consiste en un procedimiento de filtración rápida, centrifugación, centrifugación por filtración y cromatografía usando una resina de intercambio iónico o gel de resina de afinidad de estreptavidina-agarosa que tiene afinidad por biotina, iminobiotina o derivados de las mismas.
12. Método según la reivindicación 7, que comprende además la etapa de:
- g. añadir acetato-hidrogenofalato de celulosa al constructo lipídico.
13. Método según la reivindicación 7 que comprende además la etapa de:
- h. recuperar del proceso al menos un material seleccionado del grupo que consiste en insulina, resina de intercambio iónico y gel de afinidad de estreptavidina-agarosa.
14. Método según la reivindicación 7, en el que la etapa de introducir la insulina en el constructo lipídico comprende la etapa de añadir al menos una molécula orgánica cargada a la insulina antes de introducirse la insulina en el constructo lipídico.
15. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de una composición para aumentar la administración de insulina a los hepatocitos en el hígado de un paciente aquejado de diabetes.
16. Uso según la reivindicación 15, en el que la insulina está protegida dentro del constructo lipídico frente a la degradación hidrolítica por una red estructural tridimensional de moléculas de lípido que impiden el acceso a la insulina por enzimas hidrolíticas.
17. Uso según la reivindicación 15, en el que se añade acetato-hidrogenofalato de celulosa al constructo lipídico para que reaccione con moléculas de lípido individuales.
18. Uso según la reivindicación 15, en el que una forma de dosificación no solubilizada de insulina está comprendida dentro del constructo lipídico.
19. Kit para su uso en el tratamiento de un mamífero aquejado de diabetes, comprendiendo el kit:
- una composición que comprende insulina libre y un constructo lipídico,
  - una disolución tampón fisiológica,
  - un aplicador, y

- un material de instrucciones para el uso del mismo,

- 5 en el que el constructo lipídico comprende una insulina asociada con el constructo lipídico, un lípido anfipático y un lípido anfipático extendido, en el que el lípido anfipático extendido comprende restos proximal, medio y distal, en el que el resto proximal conecta el lípido anfipático extendido al constructo, el resto distal dirige el constructo a un receptor presentado por un hepatocito, y el resto medio conecta los restos proximal y distal, en el que el lípido anfipático comprende al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina, colesterol, fosfato de dicetilo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-[3-fosfo-rac-(1-glicero)], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo), derivados de los mismos, y mezclas de cualquiera de los compuestos anteriores; y en el que el lípido anfipático extendido se selecciona del grupo que consiste en N-hidroxisuccinimida (NHS)-biotina; sulfo-NHS-biotina; N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga; sulfo-N-hidroxisuccinimida-biotina de cadena larga; D-biotina; biocitina; sulfo-N-hidroxisuccinimida-S-S-biotina; biotina-BMCC; biotina-HPDP; yodoacetil-LC-biotina; hidrazida de biotina; hidrazida de biotina-LC; hidrazida de biocitina; biotina-cadaverina; carboxibiotina; fotobiotina; trifluoroacetato de *p*-aminobenzoil-biocitina; *p*-diazobenzoil-biocitina; biotina-DHPE; biotina-X-DHPE; ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; éster succinidilico del ácido 12-((biotinil)amino)dodecanoico; S-biotinil-homocisteína; biocitina-X; hidrazida de biocitina X; biotina-etilendiamina; biotina-XL; biotina-X-etilendiamina; hidrazida de biotina-XX; biotina-XX-SE; biotina-XX, SSE; biotina-X-cadaverina;  $\alpha$ -(t-BOC)biocitina; N-(biotinil)-N'-(yodoacetil)etilendiamina; DNP-X-biocitina-X-SE; hidrazida de biotina-X; clorhidrato de norbiotinamina; 3-(N-maleimidilpropionil)biocitina; ARP; sulfóxido de biotina-I; éster metílico de biotina; biotina-maleimida; biotina-poli(etilenglicol)amina; sal de sodio del ácido (+)-biotina-4-amidobenzoico; 2-N-acetilamino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido de biotina; biotina- $\alpha$ -D-N-acetilneuraminida;  $\alpha$ -L-fucósido de biotina; lacto-N-biósido de biotina; trisacárido de biotina-Lewis-A; tetrasacárido de biotina-Lewis-Y;  $\alpha$ -D-manopiranosido de biotina; y 6-O-fosfo- $\alpha$ -D-manopiranosido de biotina.
- 10
- 15
- 20
- 25 20. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el aumento de la administración de insulina a los hepatocitos en el hígado de un paciente aquejado de diabetes.

Figura 1.

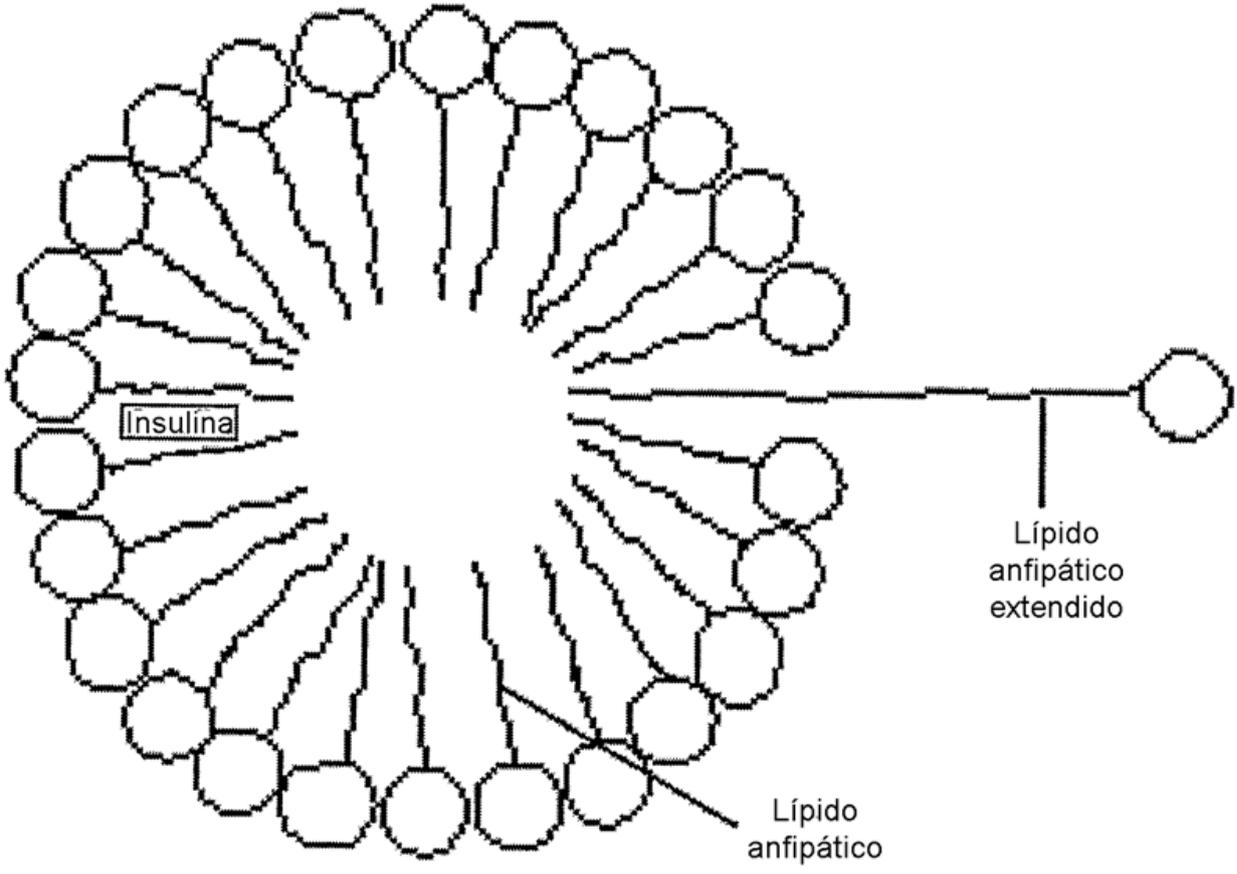


Figura 2.

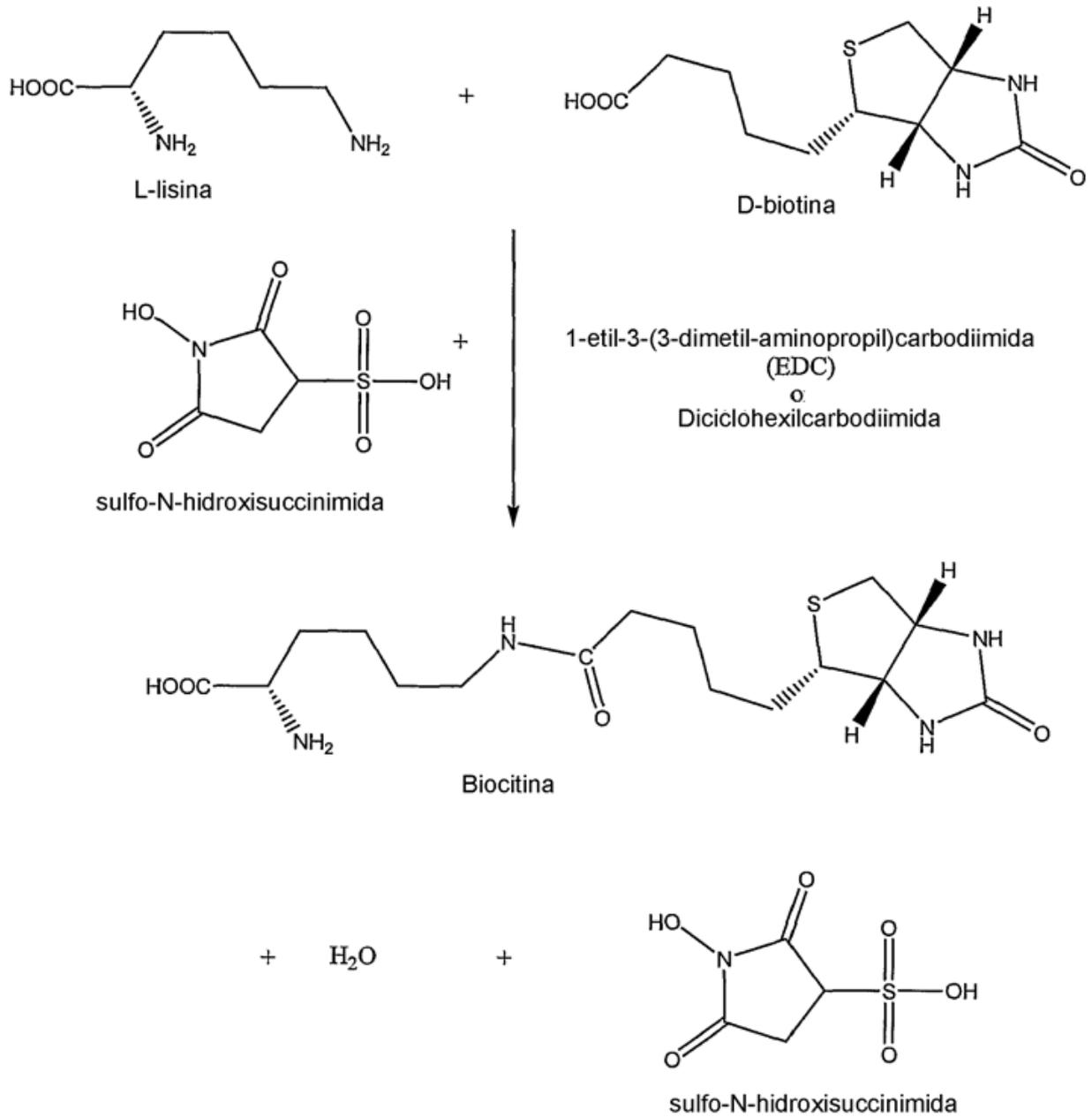


Figura 3.

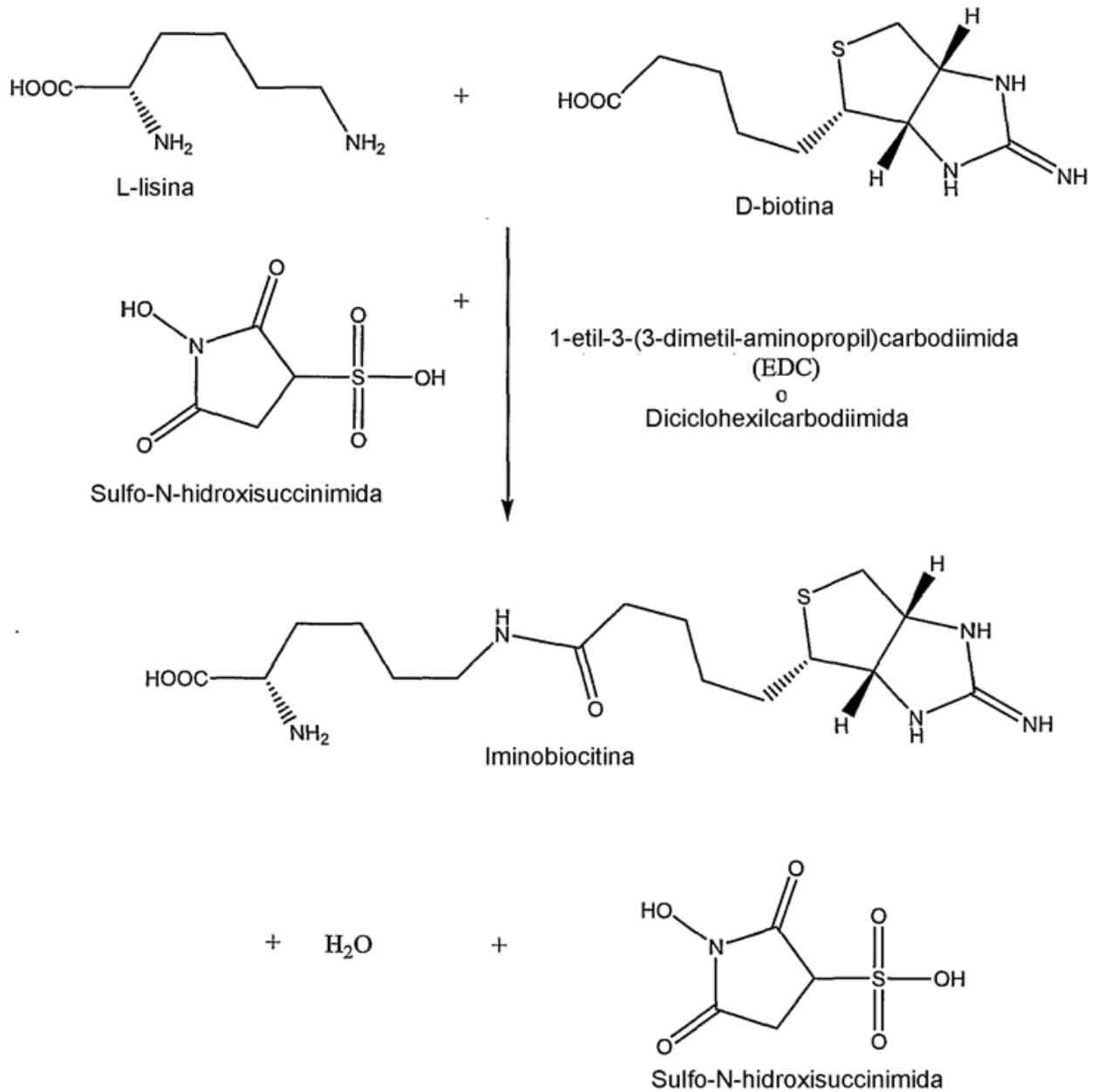


Figura 4.

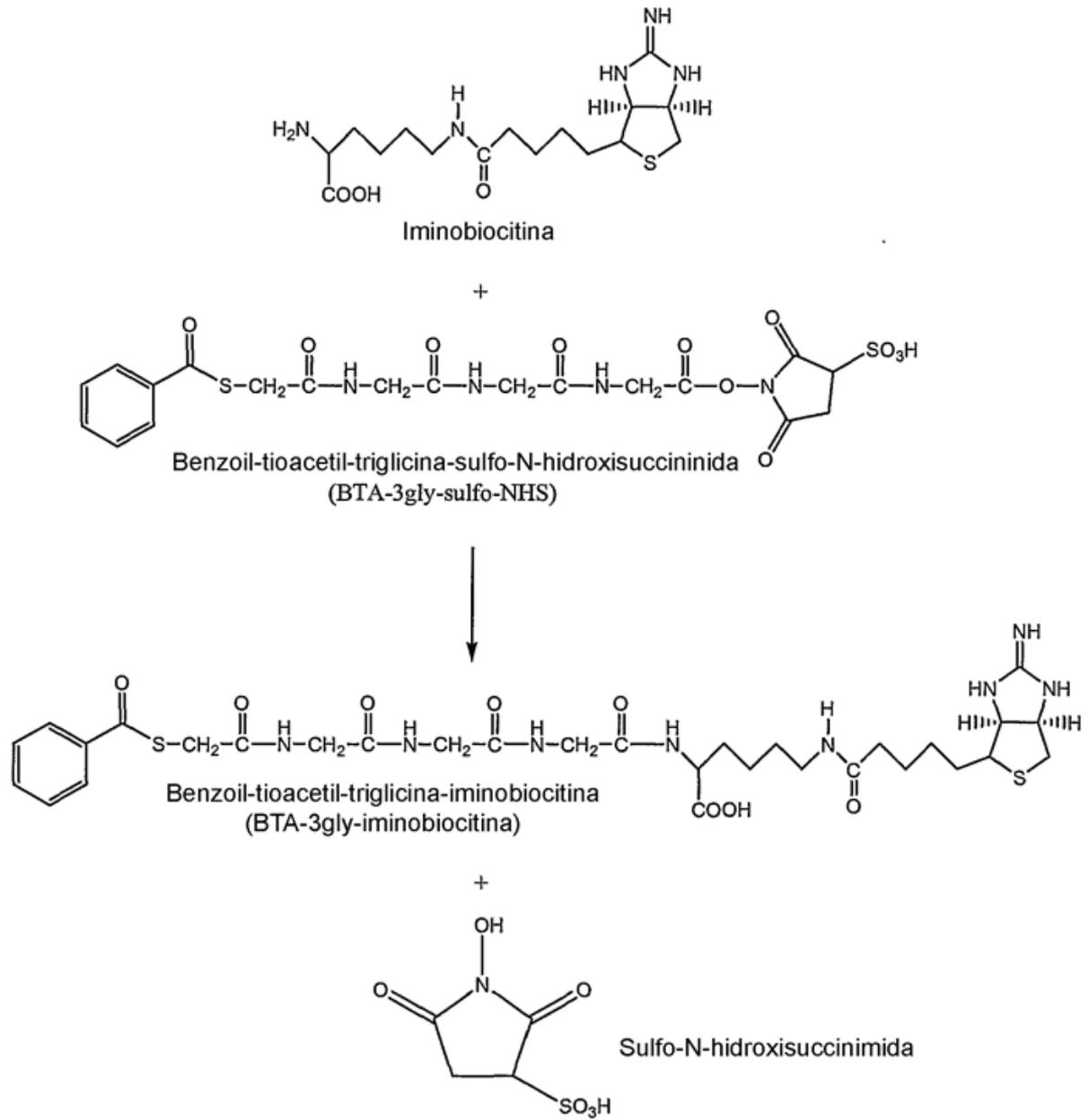


Figura 5.

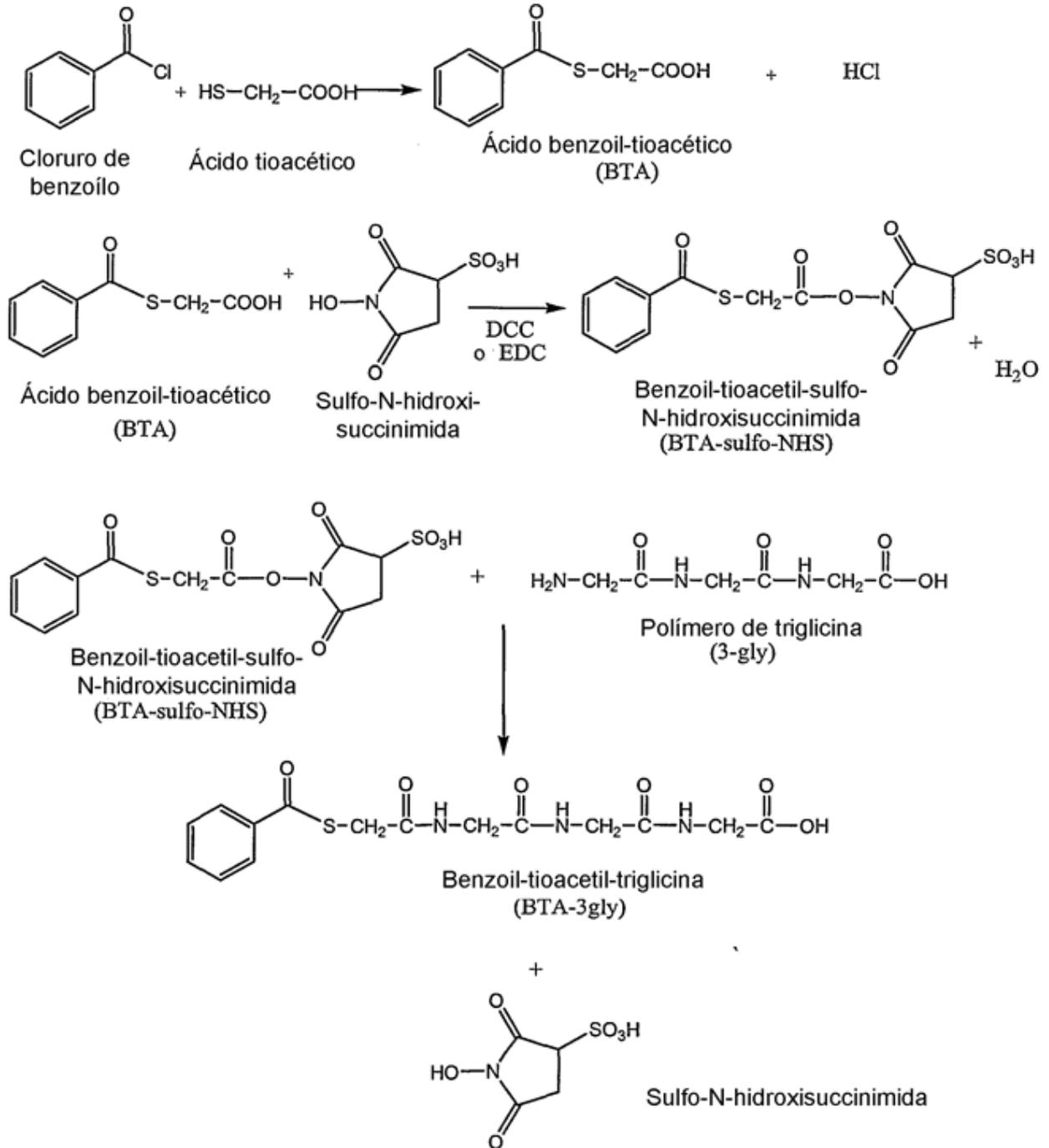


Figura 6.

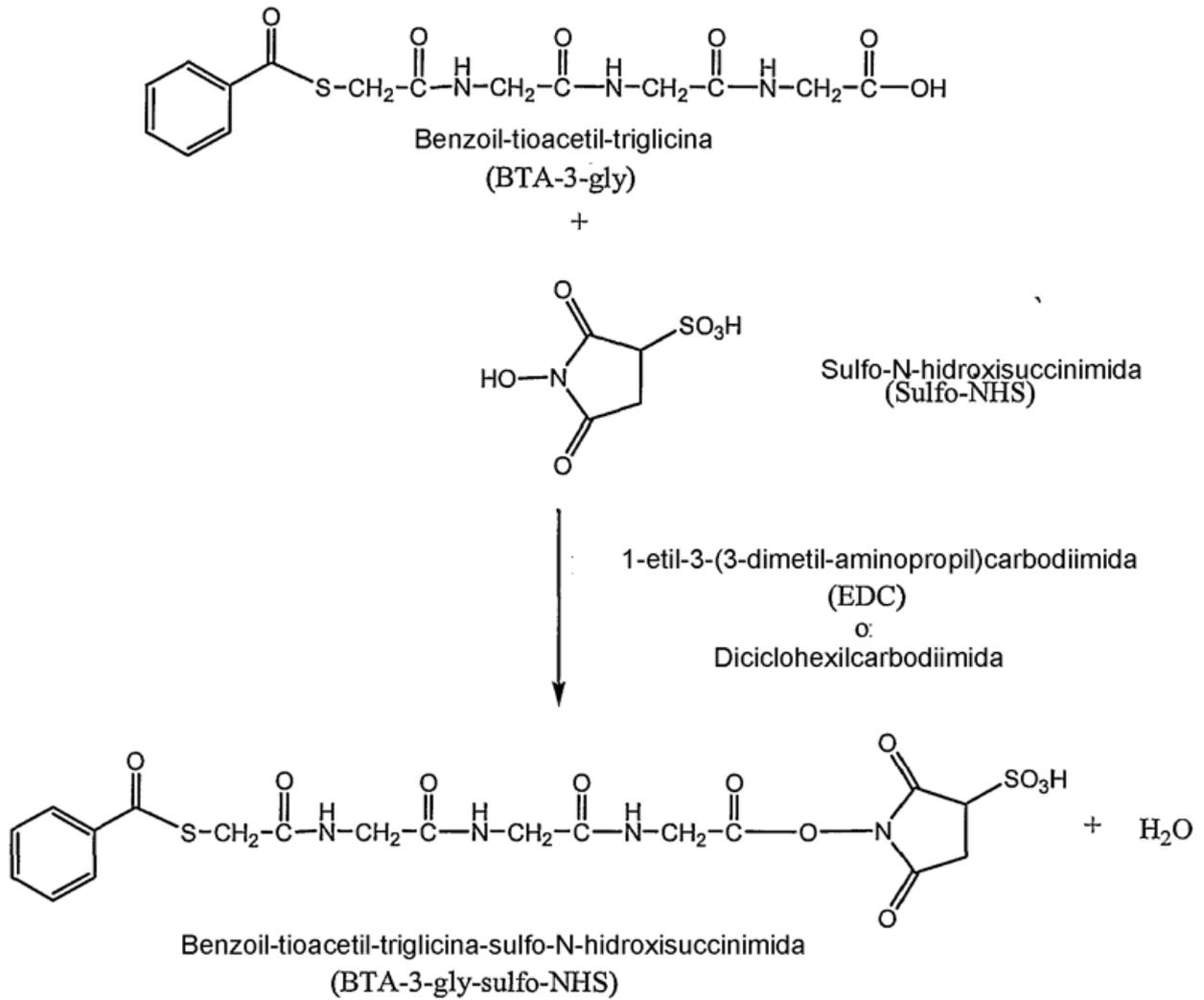


Figura 7.

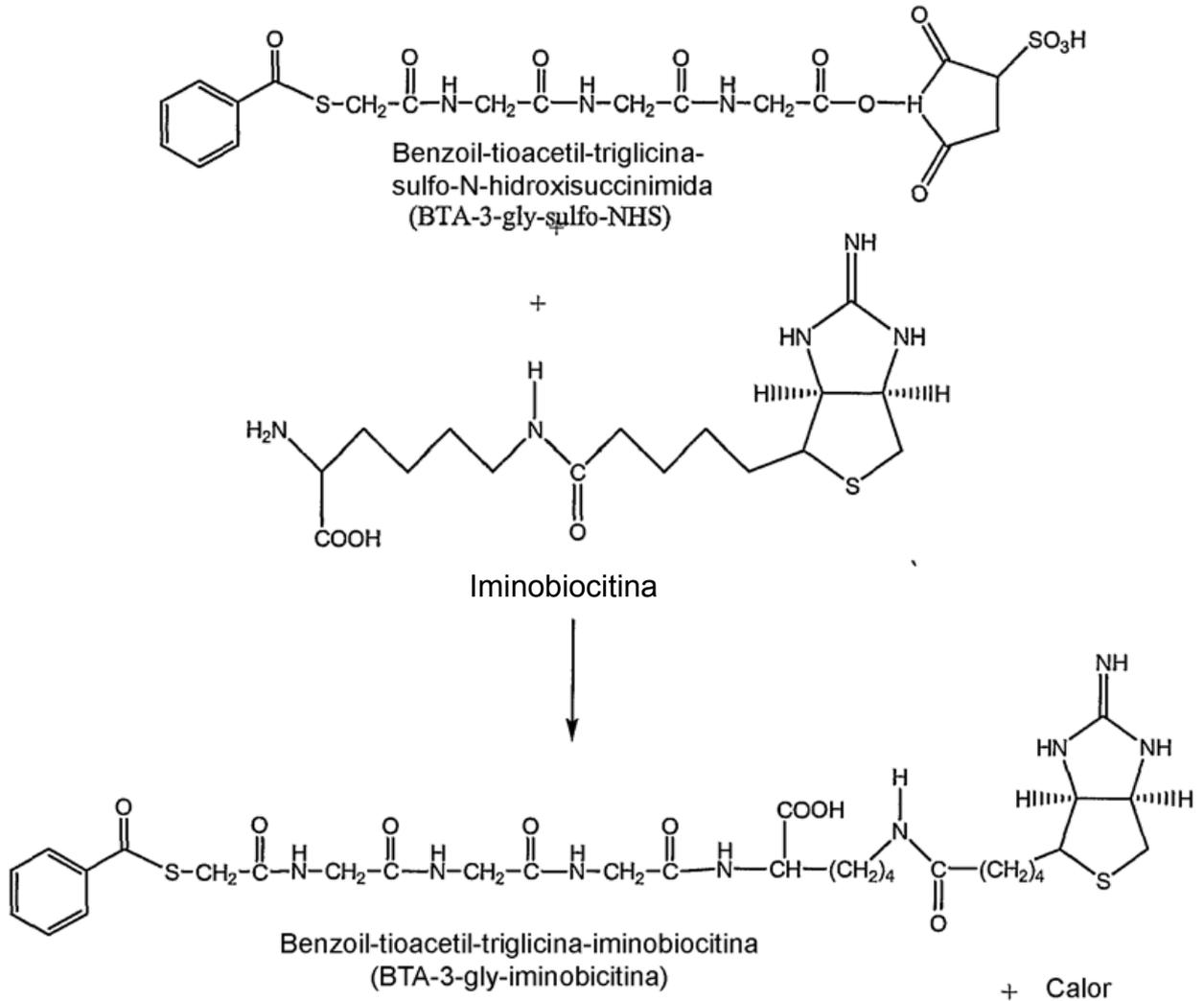






Figura 10.

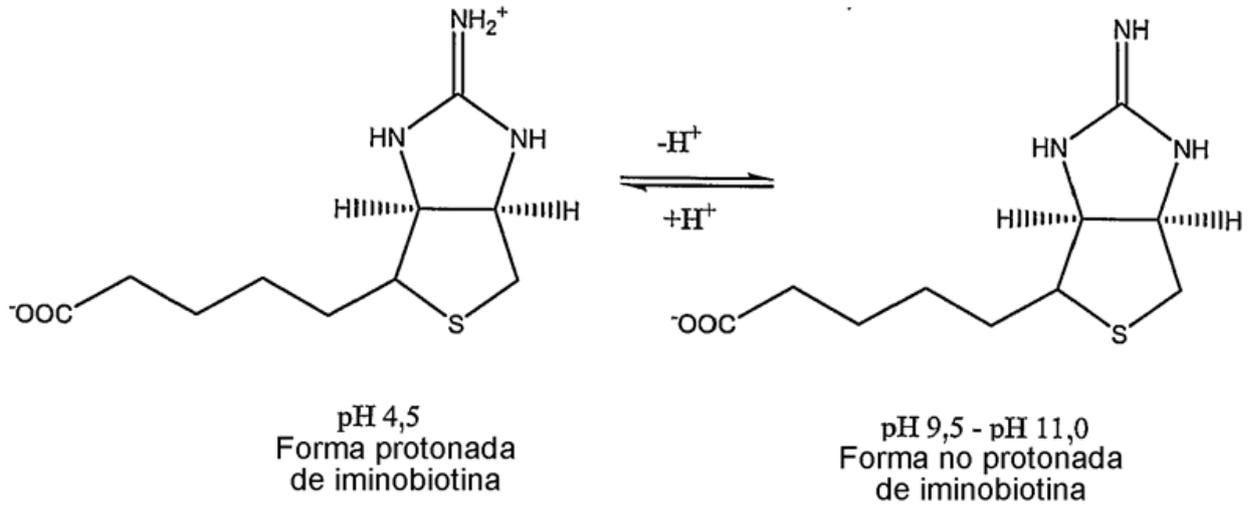


Figura 11.

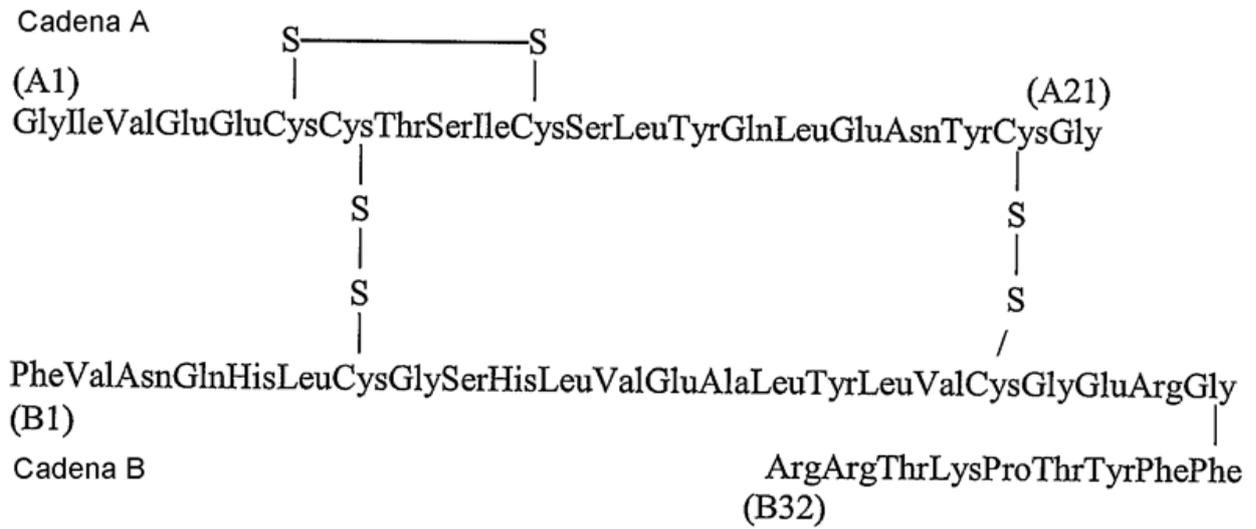




Figura 13.

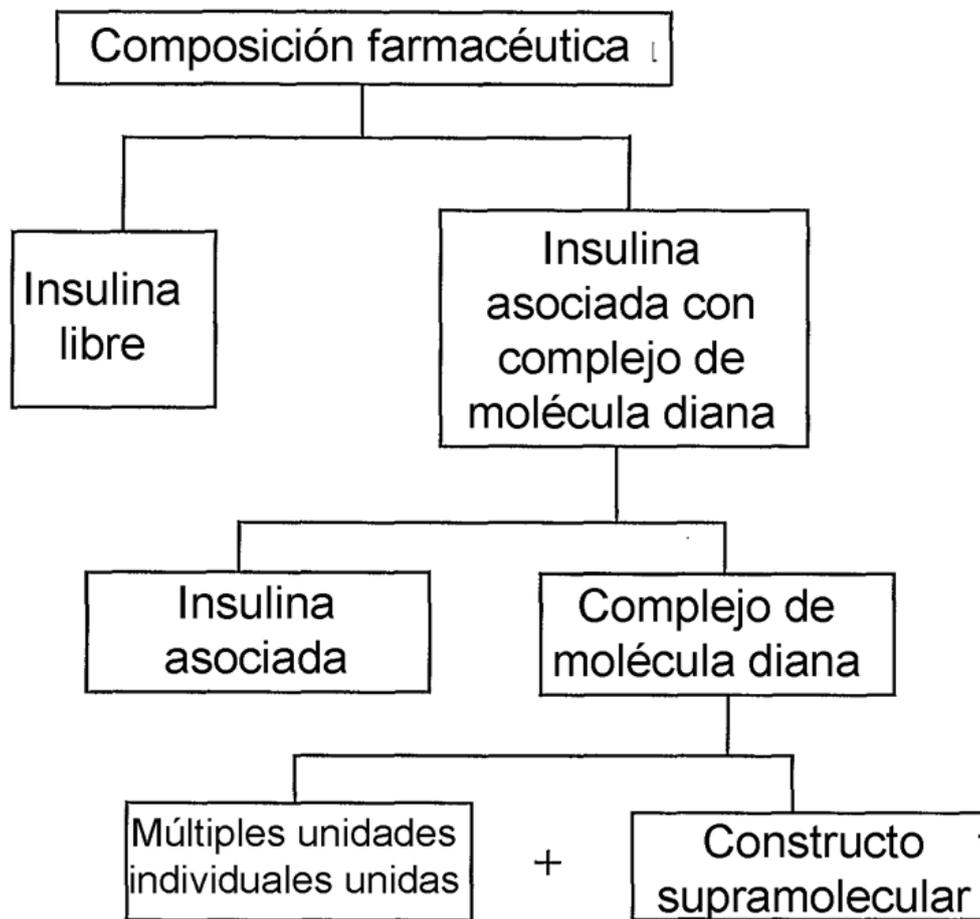
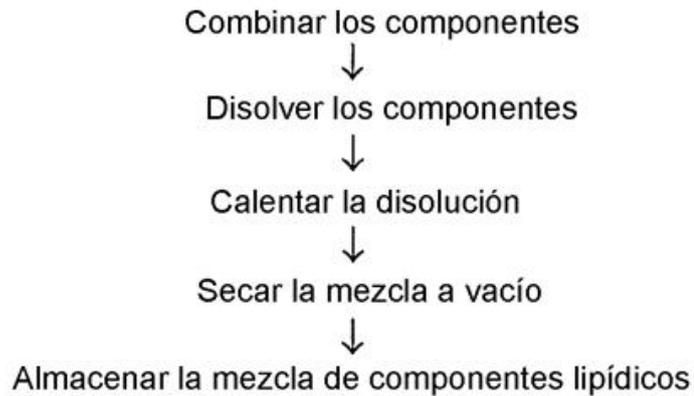


Figura 14.

Preparar mezcla de componentes lipídicos



Formar constructo lipídico a partir de mezcla de componentes lipídicos

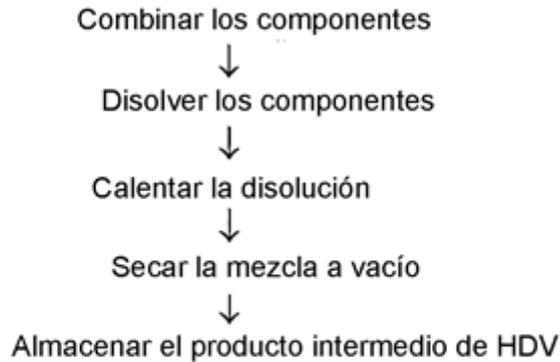


Preparar constructo lipídico que contiene insulina

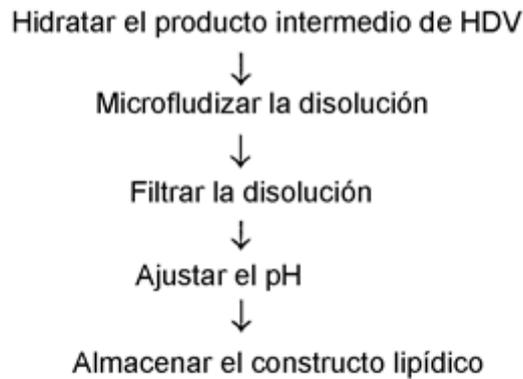
Añadir insulina al constructo lipídico

Figura 15.

Preparar complejo de molécula diana



Incorporar complejo en constructo lipídico



Preparar HDV-insulina glargina

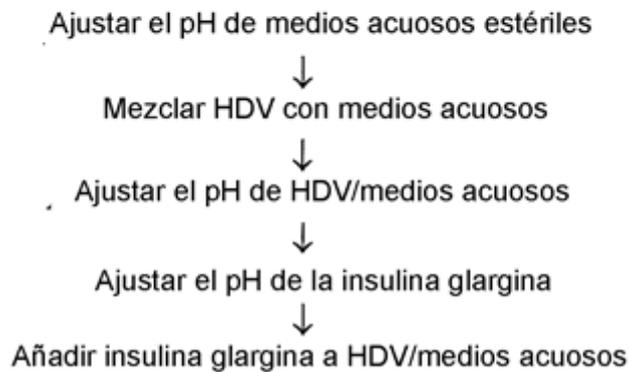
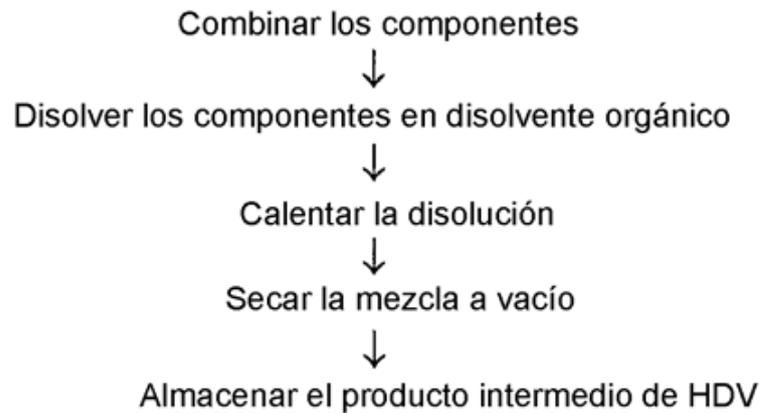
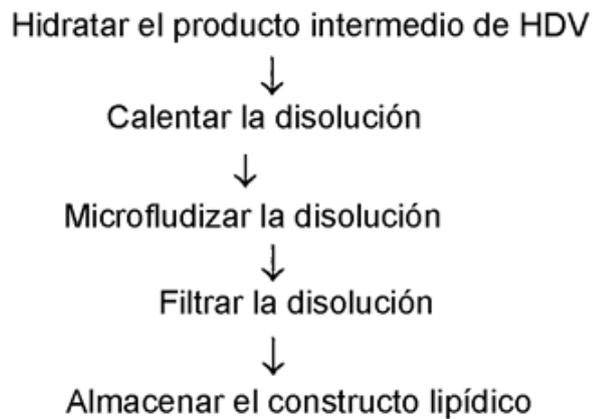


Figura 16.

Preparar complejo de molécula diana



Incorporar complejo en constructo lipídico



Preparar HDV-insulina Humulin R con insulina Humulin NPH



Figura 17.

Bioensayo de glucógeno de hígado de rata en HDV-insulina  
Eficacia de molécula diana

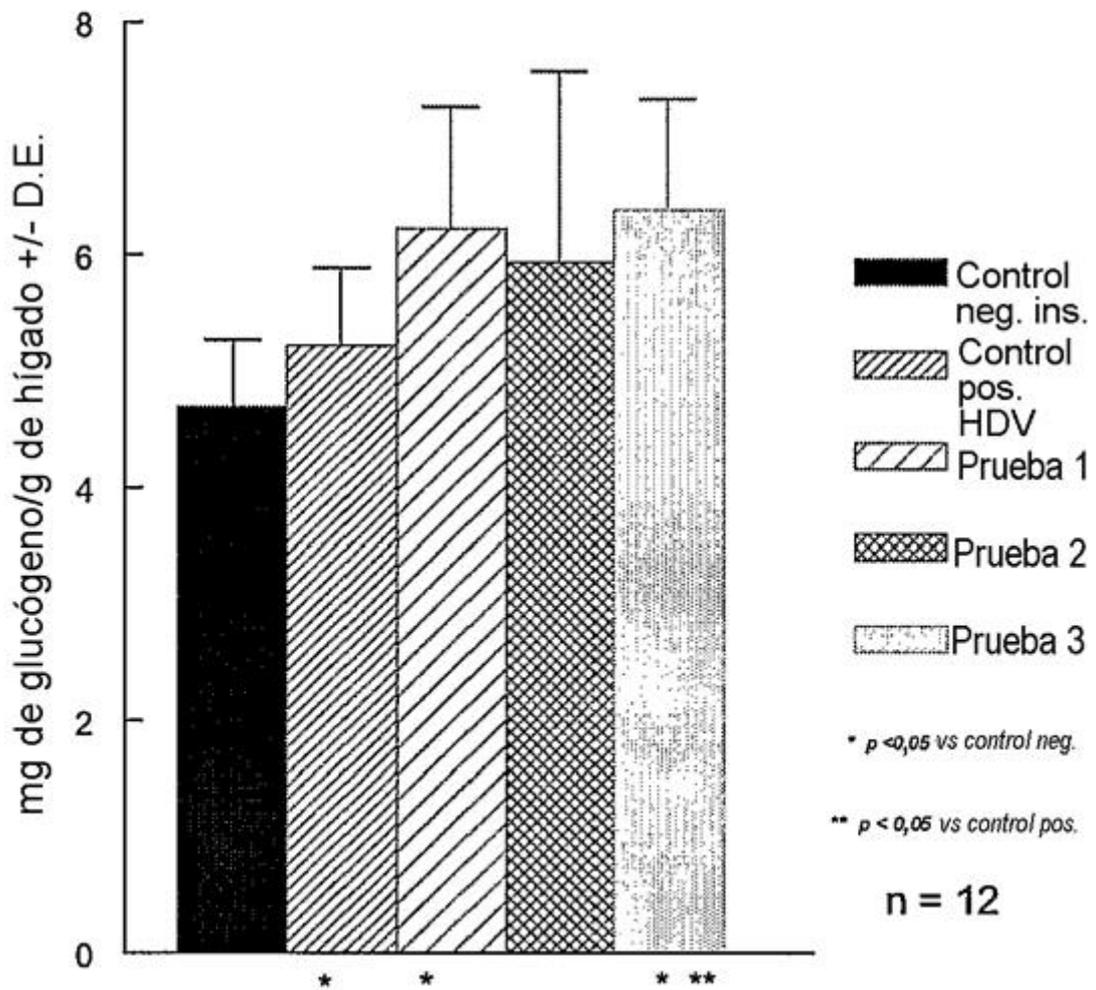


Figura 18.

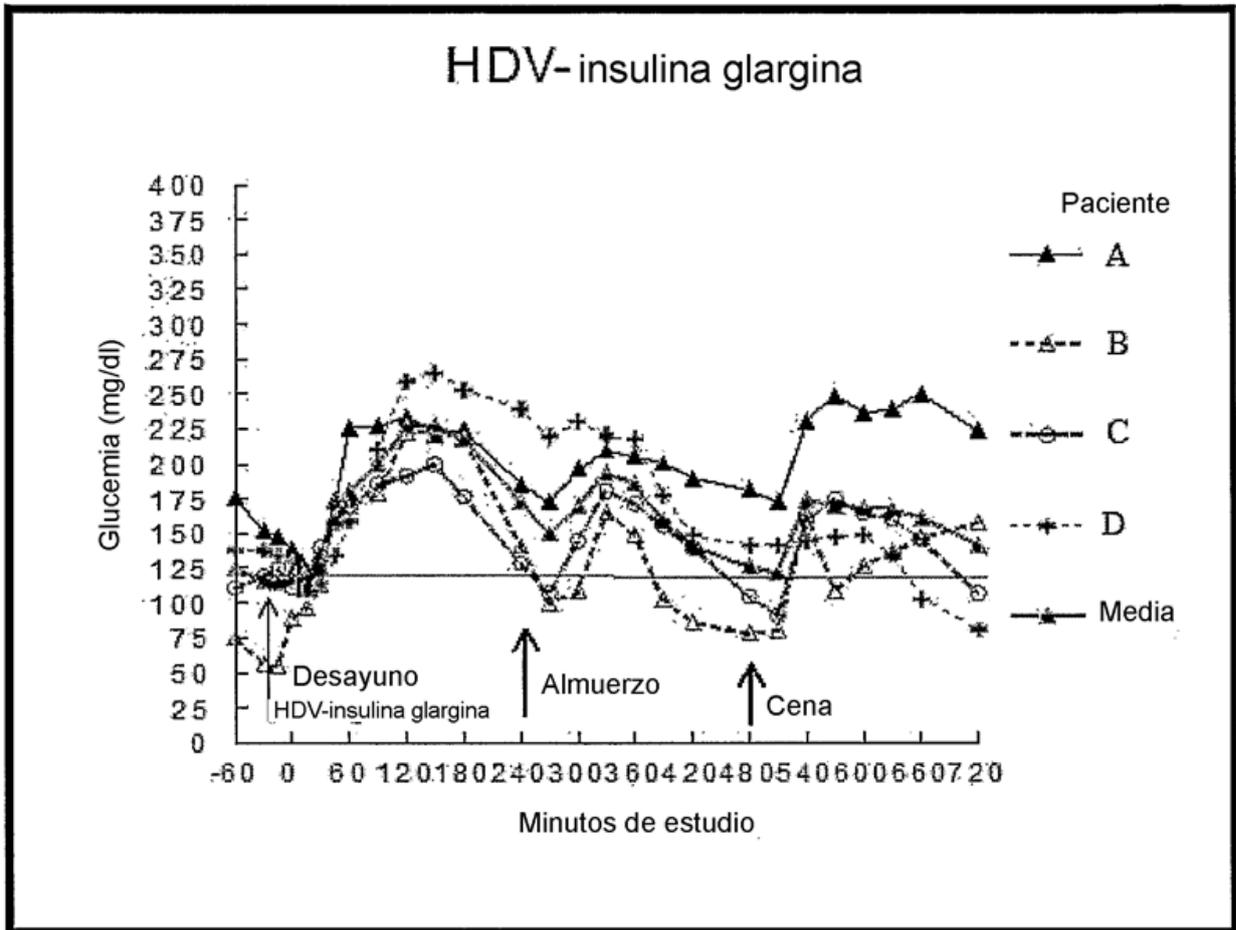


Figura 19.

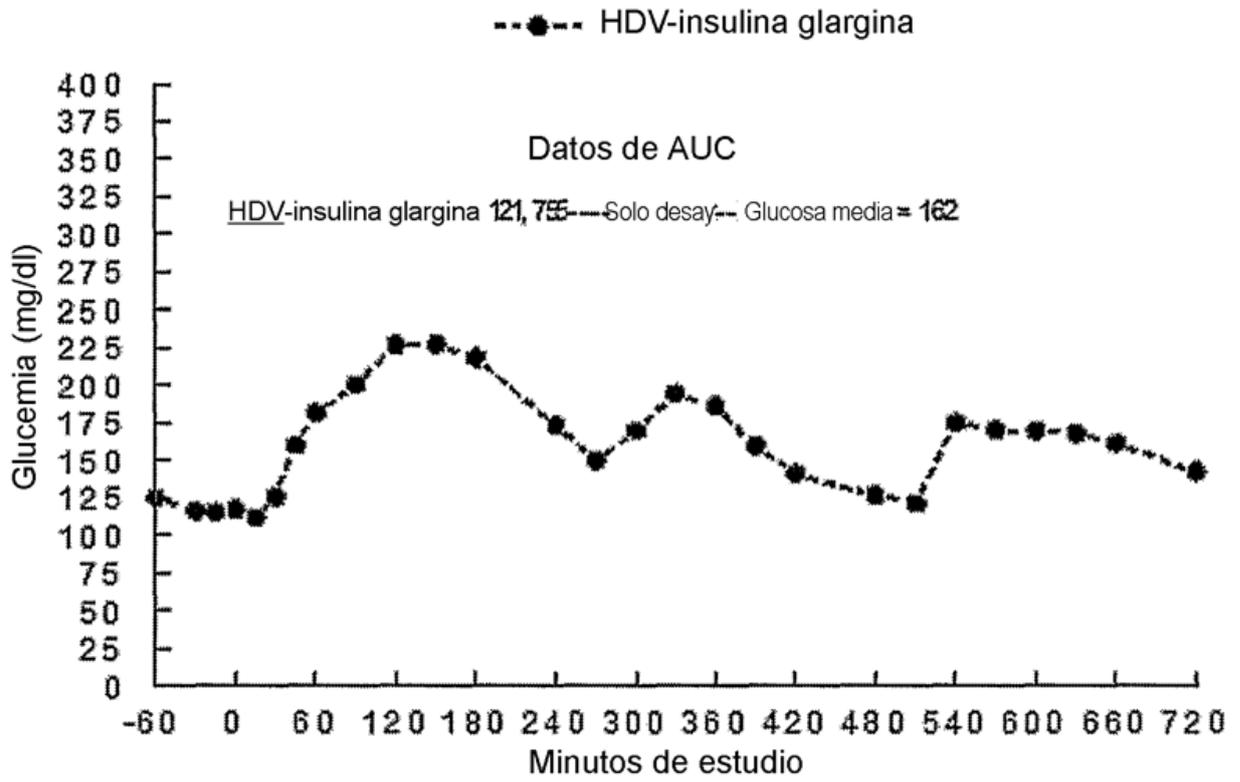


Figura 20.

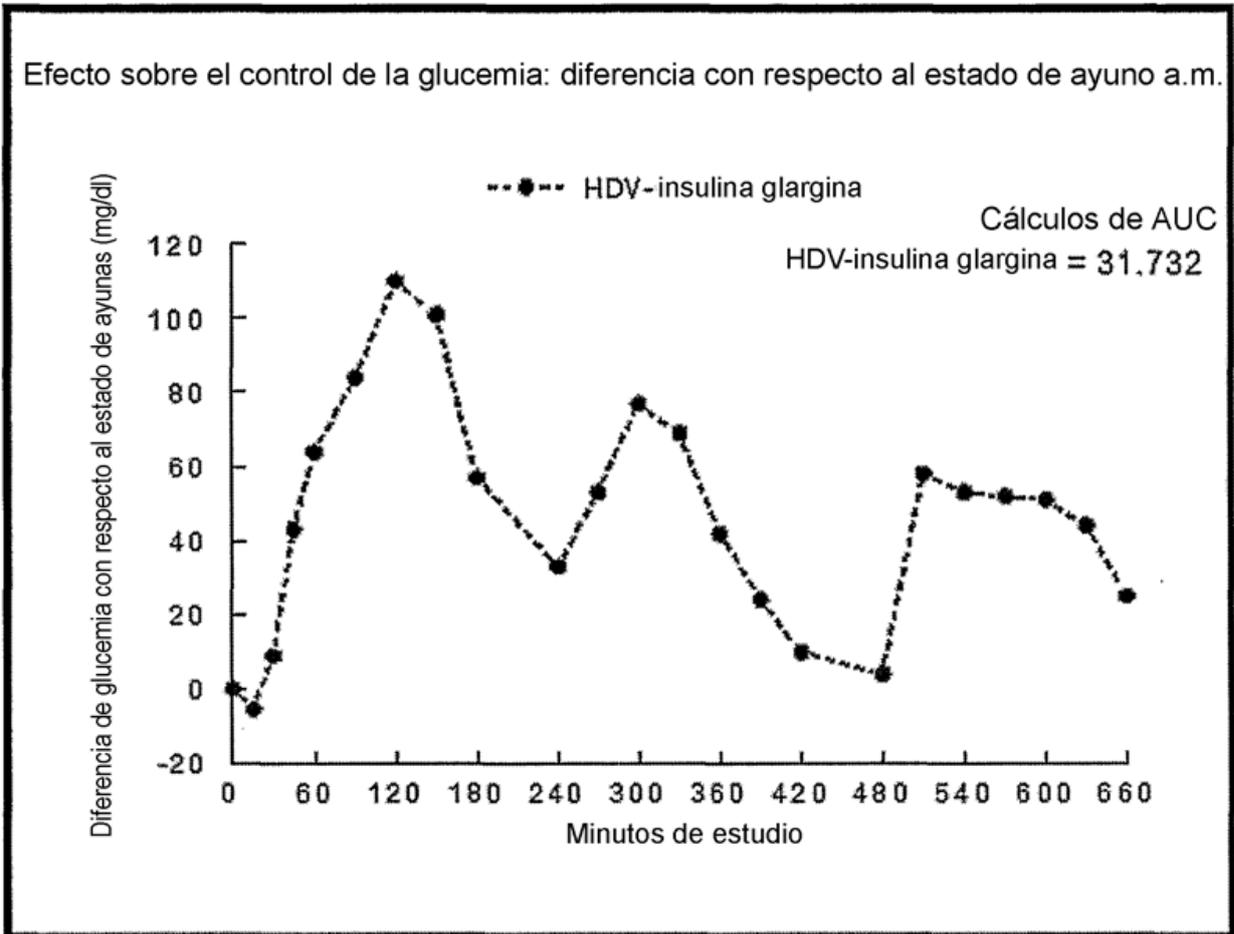


Figura 21.

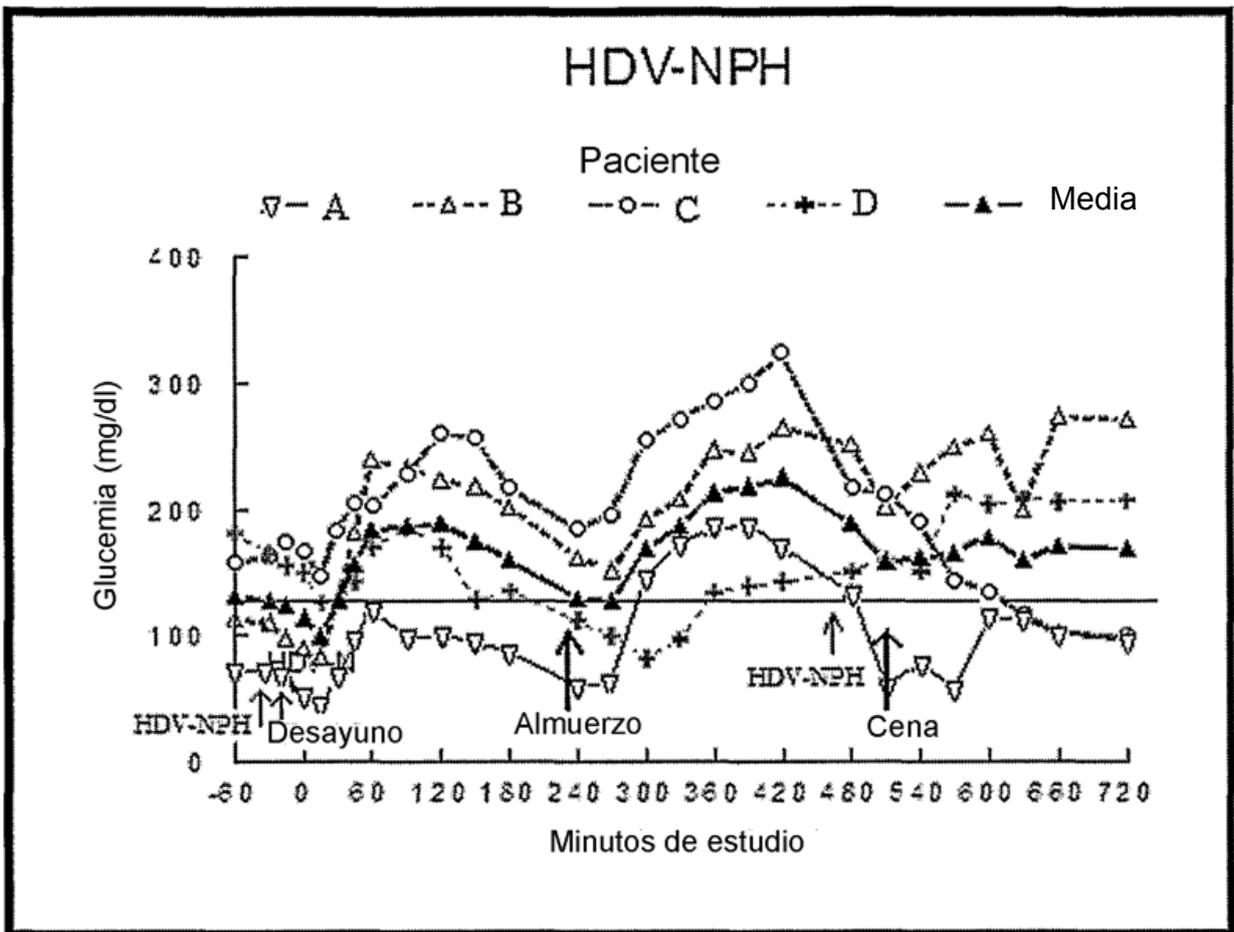


Figura 22.

Efecto sobre el control de la glucemia a lo largo de 3 comidas

—▲— HDV-NPH

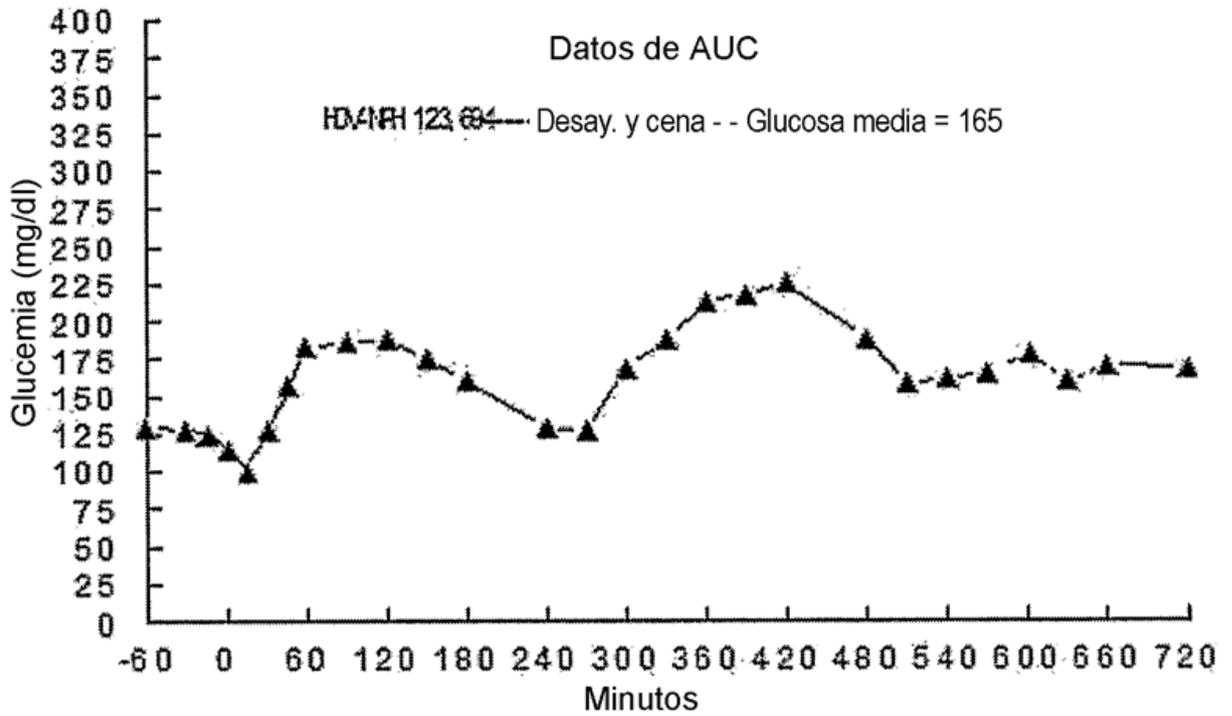


Figura 23.

